

Elazığ İlinde Yetiştirilen *Morus nigra* L. Ekstraktlarının Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Antibiyotiklerle Sinerjistik Etkisinin Belirlenmesi

Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Synergistic effect with Antibiotics of Morus nigra L. Extracts Grown in Elazığ Province

Osman AKMEŞE^{1,a}, Tuba ACET^{*2,b}, Kadriye ÖZCAN^{3,c}

¹ Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, 29100, Gümüşhane

² Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 29100, Gümüşhane

³ Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 28200, Giresun

• Geliş tarihi / Received: 27.04.2020 • Düzeltilecek geliş tarihi / Received in revised form: 27.08.2020 • Kabul tarihi / Accepted: 31.08.2020

Öz

Antimikrobiyal ajan olarak kullanılan ilaçların olası yan etkileri ve mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanması, insan sağlığı için büyük tehlike oluşturmaktadır. Bu durum bilim çevrelerini yeni arayışlara itmiştir. Gıda olarak tüketilen pek çok bitkisel ürünün aynı zamanda hastalıklardan korunma amacıyla da halk tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Ancak, bunlardan pek çoğu halen bilimsel verilerle doğrulanmamıştır. Bu bakımdan, mevcut çalışmada Elazığ ilinden toplanan ve yöre halkı tarafından geleneksel olarak pek çok rahatsızlığın hafifletilmesinde kullanılan *Morus nigra* L. (karadut) taze meyve ekstraktlarının (etanol, metanol ve etil asetat) pomolojik özellikleri, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik değerleri ile toplam antioksidan kapasiteleri belirlendi. Bununla birlikte, etanol ekstraktının fitokimyasal içeriği RP-HPLC ile değerlendirildi. Ayrıca bunların, antimikrobiyal özellikleri ve antibiyotiklerle (kloramfenikol, novobiosin ve nalidiksik asit) olan sinerjileri test edildi. Etanol ekstraktının toplam fenolik içerik değeri ve antioksidan özellikleri diğerlerine göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu ekstraktın major bileşeni ise klorojenik asit olarak tespit edildi. Ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı düşük etkinlik gösterdiği, bununla beraber metanol ekstraktı/kloramfenikol kombinasyonu haricinde tüm ekstrakt antibiyotik karışımlarının ciddi bir patojen olan *P. aeruginosa* üzerine tam sinerjik etki gösterdiği tespit edildi. Tam sinerji olması ise, antibiyotiğin daha düşük dozda daha etkili olmasını sağlaması açısından oldukça önemlidir. Sonuç olarak, *M. nigra* meyve ekstraktlarının sahip olduğu biyolojik aktiviteleri nedeniyle, gıda ve ilaç endüstrilerinde doğal ve alternatif bir kaynak olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal, Antioksidan, HPLC, *Morus nigra* L., Sinerjik Etki

Abstract

Possible side effects of drugs used as antimicrobial agents and microorganisms' resistance to these drugs pose a great danger to human health. This situation led to the scientific community to new searches. It is known that many herbal products consumed as food are also used by the public for the protection of diseases. However, many of these are still not confirmed by scientific data. In this regard, in the current study, *Morus nigra* L. (black mulberry) fresh fruit extracts (ethanol, methanol and ethyl acetate) collected from Elazığ province and used by local people to alleviate many diseases, total antioxidant content of total phenolic and total flavonoids capacities were determined. However, the phytochemical content of the ethanol extract was evaluated by RP-HPLC. In addition, their antimicrobial properties and synergies with antibiotics (chloramphenicol, novobiosin and nalidixic acid) were tested. The total phenolic content value and antioxidant properties of ethanol extract were significantly higher than the others. The major component of this extract was determined as chlorogenic acid. It was determined that the extracts showed low efficacy against the test microorganisms, however, all extract antibiotic mixtures exhibited a full synergistic effect on *P. aeruginosa*, a serious pathogen, except for the methanol extract / chloramphenicol combination. The full synergy is important in terms of ensuring that the antibiotic is more effective at a lower dose. As a result, due to the biological activities of *M. nigra* fruit extracts, it is thought to have the potential to be used as a natural and alternative source in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Antimicrobial, Antioxidant, HPLC, *Morus nigra* L., Synergistic Effect

*^b Tuba ACET; tubaacet@hotmail.com, Tel: (0456) 233 1000 (dâhili:1881), orcid.org/0000-0002-0981-9413

^a orcid.org/0000-0001-9300-8324

^c orcid.org/0000-0002-4913-6035

1. Giriş

Genellikle dut olarak adlandırılan *Morus* cinsi, 16'dan fazla tür içerir ve Moraceae familyasına mensuptur (Ercişli ve Orhan, 2007). Dut ağaçları dünya genelinde tropikal, subtropikal ve ılımlı olmak üzere farklı iklimsel koşullarda yaşayabilirler ve deniz seviyesinden itibaren 4000 metreyi aşan yüksekliklere kadar geniş bir yayılım göstermektedirler (Vijayan vd., 2011). Bunlardan özellikle *Morus nigra* L. (karadut), sahip olduğu zengin antioksidan içerik ve lezzetinden dolayı hem gıda olarak hem de pek çok rahatsızlığın hafifletilmesi amacıyla insanlar tarafından sıklıkla tüketilmektedir (Kostic vd., 2013). Örneğin, karadutun çeşitli kısımları (meyve, kök ve kabuk gibi) boğaz ağrısı, anemi, demir eksikliği, bademcik iltihabı, yara iyileştirme, hipertansiyon, diyabet ve artrit tedavisinde; ateş düşürücü ve diüretik olarak karaciğeri koruma amaçlı, görme güçlüğüne tedavi edici, kan basıncını azaltma ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Jiang, 2011). Bu bitkinin önemli miktarlarda biyoaktif maddeler barındırdığı ve antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidatif, antidiyabetik, antiaterojenik, antiaging, antiobezite ve nöroprotektif gibi farklı pek çok biyolojik aktiviteler sergilediği bilimsel çalışmalarla da ortaya konmuştur (Hojjatpanah vd., 2011; Diab vd., 2020). Sergilemiş olduğu çeşitli farmakolojik aktiviteleri, gıda katkı maddesi olarak güvenli kullanımı ve buna bağlı olarak ulusal ekonomide yüksek değere sahip oluşu ile, *Morus* cinsi bitkiler son yıllarda giderek daha fazla dikkat çekmektedir (Yan vd., 2020).

Küresel iklim değişikliği ve yaşam biçimlerinin değişmesiyle pek çok problem ortaya çıkmıştır. Bunların başında da dünya genelinde halk sağlığını ciddi biçimde tehdit eden, antibiyotik dirençli organizmaların neden olduğu enfeksiyonlar gelmektedir (Özcan ve Acet, 2018). Bu problemin çözümünde de ne yazık ki mevcut antibiyotikler yetersiz kalmaktadır ve bu durum acil olarak çözülmesi gereken bir hal almıştır. Bilim insanları yeni antibiyotikler keşfetme veya doz artırımı gibi birtakım çabalar içinde olsalar da, bunlar patojen suşlar üzerinde ya yetersiz kalmakta ya da insanlar üzerinde ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Rehman vd., 2020). Bu bakımdan, bilinen antibiyotiklerin doğal bileşenlerle zenginleştirilerek etkinliğinin artırılması yaklaşımı doğmuştur (Wang vd., 2020). Özellikle bitki ekstraktları ile antibiyotiklerin sinerjistik etkilerinin bilinmesi, doğal, ucuz ve daha az yan etkiye sahip alternatif bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Böylelikle

daha düşük dozda antibiyotik kullanılarak daha etkili sonuçlar elde etmek mümkün olabilmektedir. *Morus nigra*'nın başta antioksidan ve antimikrobiyal özellikler olmak üzere, pek çok biyolojik aktiviteler sergilediği bilinmektedir (Budiman vd., 2020; Thakur vd., 2020). Ancak, literatürde Elazığ ilinden toplanan karadut ile yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bölgenin özelliği farklı iklim ve yükseltiye sahip olmasıdır. Bitkilerin bu zorlu koşullarda hayatta kalabilmek için, onların biyolojik aktivitelerinden sorumlu olan, sekonder metabolit kompozisyonlarını değiştirdiği bilinmektedir (Alhaithloul vd., 2020). Bu yüzden mevcut çalışmamızda, Elazığ ilinin yüksek kesimlerinden toplanan ve yerel halk tarafından geleneksel olarak tedavi amaçlı kullanılan, *Morus nigra* L. (karadut) taze meyvelerinin: *i-*) pomolojik, *ii-*) toplam fenolik, toplam flavonoid içerik değerleri ve antioksidan, *iii-*) antimikrobiyal ve *iv-*) antibiyotiklerle sergilediği sinerjik aktivitelerinin belirlenmesi ve *v-*) fenolik bileşenlerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örneklerin Toplanması

Morus nigra L. meyve örnekleri 2018 tarihinin Temmuz ayında Elazığ ilinden toplandı (lokasyonu 38.77082° kuzey-38.91900° güney ve rakımı ise 1242 m olarak belirlendi). Örnekler toplanırken meyvelerin ezilmemesi amacıyla porsiyonlara ayrıldı ve hava geçirmeyen kilitli poşetlere konarak sonraki analizler için -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2. Örneklerin Pomolojik Özellikleri

Meyve örnekleri toplanırken pomolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen 10 adet meyvenin boy ve en ölçümleri 0.05 mm hassasiyete sahip kumpas ile yapıldı ve daha sonra hassas terazide (Kern, ABJ-NM/ABS-N, Balingen-Almanya) meyvelerin ağırlıkları ölçüldü. Meyvelerin nem oranının belirlenmesi amacıyla örnekler 40 °C'ye ayarlanmış etüve (Daihan Scientific, ThermoStable IG-105, Güney Kore) yerleştirilip belirlenen zaman aralıklarında ağırlık ölçümleri yapıldı ve ağırlığın değişmediği ardışık tartımla birlikte işlem sonlandırılarak kuru ağırlık hesaplaması yapıldı. *Morus nigra* L. meyve örneklerinin pH değerinin belirlenmesi amacıyla meyve homojenize edilerek kaba filtre kâğıdından geçirildi. Elde edilen meyve suyunun pH'sı pH metre cihazı (Metler Toledo, SevenCompact S210, ABD) ile ölçüldü. Son

olarak örneklerin renk ölçümleri renk ölçer cihazı ile ölçüldü.

2.3. Örneklerin Ekstraksiyonu

Meyve örneklerinin ekstraksiyonu bazı modifikasyonlar uygulanarak [Sánchez-Salcedo vd., \(2015\)](#)'e göre yapıldı. Ekstraksiyon çözeltisi olarak etanol, metanol ve etil asetat çözeltileri kullanıldı. Ekstraksiyon için örnekler önce oda sıcaklığında homojenize edildi ve ardından 2.5 g örneklerin üzerine 10 ml ekstraksiyon çözücüleri eklendi ve örnekler 1 saat boyunca 25 °C'de ultrasonik su banyosunda (Wisd Laboratory Instruments, WUC-D10H, Almanya) sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra karışım, 5 dakika boyunca 2500 rpm'de santrifüjlendi (Beckman Coulter, Allegra X-30R Centrifuge, ABD) ve süpernatant kısım alındı. Pellet kısım üzerine 5 ml çözücü ilave edildi ve iki ek ekstraksiyon daha yapıldı. Son ekstraksiyon öncesi ekstraksiyon çözeltisi eklenen pellet kısım bir gece boyunca +4 °C'de soğutucuda bekletildi ve tekrar 1 saat süreyle sonike edilip ardından santrifüj işlemine tabii tutuldu. Toplanan üç süpernatant kısmının son hacmi 25 ml olacak biçimde kendi çözücüleri ile tamamlandı. Ekstraktlar 0.45 µm por çapına sahip şırınga ucu filtreden geçirildikten sonra 5 ml hacimdeki porsiyonlara ayrıldı ve sonraki analizler için -20 °C'de muhafaza edildi. Ekstraksiyon sonrasında örnek ekstraktları; MN1 (etanol *Morus nigra* L. meyve ekstraktı), MN2 (metanol *M.nigra* L. meyve ekstraktı), MN3 (etil asetat *M. nigra* L. meyve ekstraktı) olmak üzere kodlandı.

2.4. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi

Ekstraktların toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu yönteminde küçük uyarlamalarla 96 kuyucuklu plakalarda yapıldı ([Beara vd., 2014](#)). Dut ekstraktları kendi çözücüleri ile 10 kat seyreltildi. Ekstraksiyon ve standart çözeltilerinden 25 µl alınarak üzerine 125 µl, 1/10 yoğunluktaki Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklendi. 10 dakika beklendikten sonra karışıma 100 µl Na₂CO₃ (%7.5) çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat reaksiyonun tamamlanması beklendi, 760 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Sonuçlar gallik asit eşdeğeri/taze meyve (mgGAE/gTM) olarak hesaplandı.

2.5. Toplam Flavonoid İçeriğin Belirlenmesi

Dut ekstraktlarının toplam flavonoid içeriğini belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu plakaya

uyarlanan alüminyum klorür kolorimetrik yöntem kullanıldı ([Beara vd., 2014](#)). Ekstraktlardan ve gerekli seyreltmeler yapılan standart çözeltilerden 30 µl alınarak üzerine sırasıyla 80 µl metanol, 6 µl %10'luk alüminyum klorür, 6 µl 1 mol/l potasyum asetat ve 125 µl ultra saf su ilave edildi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için beklendi. Mikroplaka okuyucuda, 415 nm dalga boyunda köre karşı okuma yapıldı. Sonuçlar kuersetin eşdeğeri/taze meyve (mg QE/g TM) olarak verildi.

2.6. Antioksidan Aktivite Analizleri

2.6.1. DPPH Radikali Süpürme Yöntemi

Dut ekstraktlarının, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürücü etkisi, [Soler-Rivas vd., \(2000\)](#)'nin 96-kuyucuklu mikroplakalar için metoda göre yapıldı. Ekstraktlardan ve gerekli seyreltmeler yapılan standart çözeltilerden 10 µl alınarak üzerine 100 µl DPPH çözeltisi eklendi ve karışım metanol ile 190 µl'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekleme süresinden sonra 515 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda köre karşı okundu. Sonuçlar hem standart eğri grafiği oluşturularak hem de IC₅₀ yöntemiyle değerlendirildi. Standart ve pozitif kontrol olarak sentetik ve doğal antioksidan kimyasallar kullanıldı. Doğal antioksidan olarak askorbik asit, sentetik antioksidan olarak troloks tercih edildi. Sonuçlar hem eşdeğerlik hem de IC₅₀ olarak verildi.

2.6.2. ABTS Radikali Süpürme Yöntemi

Dut ekstraktlarının ABTS giderme aktiviteleri, [Silva vd., \(2007\)](#)'e göre 96-kuyucuklu mikroplakalarda gerçekleştirildi. Ekstraktlardan ve gerekli seyreltmeler yapılan standart çözeltilerden 8 µl alınarak, üzerine 230 µl ABTS (saf su ile seyreltilerek 734 nm dalga boyunda 0.7 Abs olarak ayarlandı) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karanlıkta, 30 °C'de 6 dakika reaksiyonun bitmesi beklendi. Reaksiyonun bitişiyile birlikte örnekler ve standart çözeltiler 734 nm dalga boyuna ayarlanmış olan mikroplaka okuyucuda köre karşı okundu. Sonuçlar hem standart eğri grafiği oluşturularak hem de IC₅₀ yöntemiyle değerlendirildi. Standart ve pozitif kontrol olarak sentetik ve doğal antioksidan kimyasallar kullanıldı. Doğal antioksidanları temsilen askorbik asit, sentetik antioksidanları temsilen troloks tercih edildi. Sonuçlar hem eşdeğerlik hem de IC₅₀ olarak verildi.

2.6.3. Toplam Antioksidan Kapasite (Fosfomolibdat) Yöntemi

Ekstraktların toplam antioksidan kapasitesi, fosfomolibdat test yönteminde küçük değişiklikler yapılarak 96 kuyucuklu mikrolakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Zengin vd., 2014). Bunun için önce, 300 µl numune üzerine 300 µl fosfomolibdik asit kompleksi ilave edildi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için deney tüpleri daha önceden ayarlanan 95 °C'deki su banyosunda (Memmert, WNE 10, Almanya) 90 dakika bekletildi. Ardından, soğumuş karışım otomatik pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakaya 250 µl hacimde enjekte edildi ve mikrolakaya okuyucuda 695 nm'de köre karşı (distile su) okundu. Toplam antioksidan kapasite askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstrakt) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g TM) olarak hesaplandı.

2.6.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarı en yüksek olan etil asetat ekstraktının fenolik bileşen analizi Özcan vd., (2019)'a göre gerçekleştirildi. Analiz kapsamında, Shimadzu Marka HPLC cihazı ile dut bitkilerinde yaygın olarak görülen 23 adet fenolik bileşiğin varlığı araştırıldı. Gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, şiringik asit, vanilin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapnik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, rutin, hesperidin, rosmarinik asit, eriodiktiol, sinnamik asit, kuersetin, luteolin, kaemferol ve apigenin fenolik bileşiklerinin miktarları µg/g ekstrakt olarak verildi.

Analiz için pompa (LC-10 ADvp), degazör ünitesi (DGU-14A), otosampler (SIL-10 ADvp) ve detektör (DAD, λ max=278) içeren Shimadzu Marka HPLC sistemi ve Agilent Eclipse XDB-C18 (250×4.60 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) kolonu, CTO-10Avp kolon fırını kullanıldı. Mobil faz %3'lük asetik asit çözeltisi (Mobil faz A) ve metanol (Mobil faz B), faz akış hızı 0.8 ml/dk., akış tipi gradient elüsyonu ve enjeksiyon hacmi ise 20 µl olarak belirlendi.

2.7. Dut Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin ve Antibiyotiklerle Olan Sinerjisinin Belirlenmesi

2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Dut ekstraktlarının antimikrobiyal etkinlikleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi (CLSI, 2007). Gram pozitif bakteriler olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* DSMZ 13590, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; gram negatif bakteriler olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Proteus vulgaris* FMC 1 ve maya- küf olarak *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Aspergillus flavus* ATCC 46283 test organizmaları olarak kullanıldı.

Test organizmalarının taze kültürleri hazırlandı ve 0.5 McFarland bulanıklığına (1.5×10^8 mikroorganizma/ml) seyreltildi. Daha sonra her bir mikroorganizmanın Müller-Hinton agar besiyeriye inokülasyonu gerçekleştirildi. Test mikroorganizması uygulanmış petrilerin üzerine 6 mm çapında steril boş disk yerleştirildi ve disklere 60 mg/ml konsantrasyondaki 20 µl ekstrakt solüsyonu emdirildi. Petriler 2 saat 4°C'de bekletilerek ekstraktlarının agara difüzyonu sağlandı. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol, novobiosin, nalidiksik asit; negatif kontrol olarak DMSO kullanıldı. Bakteriler için 37 °C'de 24 saat, mayalar için 28 °C'de 48 saat inkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşan zon çapları dijital kumpasla ölçüldü.

2.7.2. Dut Ekstraktlarının MİK ve MBK Değerlerinin Belirlenmesi

Dut ekstraktlarının MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri broth dilüsyon metodu kullanılarak 96-kuyucuklu mikrolakalar ile belirlendi (CLSI, 2007). Besiyeri olarak Müller-Hinton Broth kullanıldı. Öncelikle tüm kuyucuklara 100 µl sıvı besiyeri dağıtıldı. Daha sonra ise dut ekstraktlarından 100 µl alınarak ilk kuyucuğa eklendi ve seri dilüsyonla seyreltme işlemi gerçekleştirildi. Seri seyreltme ile 0.016-8.2 mg/ml aralığında 10 farklı konsantrasyon elde edildi. Aynı şekilde novobiosin, nalidiksik asit, kloroform ve kloramfenikol için seri seyreltmeyle 0.25-128 µg/ml aralığında 10 farklı konsantrasyon elde edildi. Son olarak, 10 µl mikroorganizmaların süspansiyonları (0.5 MacFarland bulanıklığı) mikrolakalara inoküle edildi. Bakteriler için 37 °C'de 24 saat boyunca, mayalar için 28 °C'de 48 saat boyunca inkübasyondan sonra mikroorganizmaların

üremesi kontrol edildi. Dut ekstraktları ve seçilen antibiyotiklerin, mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen en düşük konsantrasyonları MIC değerleri olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol, novobiosin, nalidiksik asit; negatif kontrol olarak DMSO kullanıldı.

MBK (minimal bakterisidal konsantrasyon) değerlerinin belirlenmesi için ise her kuyudan 10 µl broth alındı, Müller-Hinton agarı aşılandı ve 37 ° C'de 24 saat boyunca bakteriler için, 28 ° C'de 48 saat boyunca mayalar için inkübasyona bırakıldı. Dut ekstraktlarının bakterilerin %99.9'unu öldürdüğü en düşük konsantrasyon MBC değeri olarak belirlendi.

2.7.3. Dut Ekstraktlarının Antibiyotiklerle Olan Sinerjisinin Belirlenmesi

Checkboard yöntemi; dut ekstraktları ile seçilen antibiyotikler arasındaki sinerji checkboard yöntemi ile incelendi (Fadli vd., 2012). Ekstrakt ve antibiyotik kombinasyonlarının sinerjilerinin belirlenmesi amacıyla Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* DSMZ 13590, MRSA ATCC 43300 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test mikroorganizmaları olarak seçildi. Novobiosin, nalidiksik asit, kloramfenikol ve dut ekstraktlarının başlangıç konsantrasyonu 16xMIC olarak hazırlandı. Ekstrakt ve antibiyotik kombinasyonlarını oluşturmak için her seyreltik 1:1 oranında karıştırıldı ve elde edilen kombinasyon karışımları 100 µl hacimde olacak şekilde ilk kuyucuklara pipetlendi. Seri iki kat seyreltme ile 4xMIC'den MIC/128'e kadar 10 farklı dilüsyon elde edildi. Daha sonra ise 10 µl 0.5 MacFarland bulanıklığına ayarlanan mikroorganizmalar kuyucuklara inoküle edildi. Son olarak mikropalakalar 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Mikroorganizmal büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon, kombinasyonların MIC değeri olarak belirlendi.

Kombinasyon analiz sonuçları aşağıdaki denklemden faydalanılarak, FICI (fraksiyon inhibitör konsantrasyon indeksi) değerleri hesaplanarak elde edildi (Didry vd., 1993).

$$FICI = (MICA/B / MICA) + (MICB/A / MICB)$$

Bu eşitlikte;

MICA; sadece dut ekstraktlarının,

MICB; sadece antibiyotiklerin,

MICA/B; dut ekstraktlarının kombinasyon içindeki,

MICB/A; antibiyotiklerin kombinasyon içindeki MIC değerlerini temsil etmektedir.

$FICI \leq 0.5$ tam sinerji, $0.5 < FICI \leq 0.75$ kısmi sinerji, $0.76 < FICI \leq 1$ sinerjistik etkileşimin olmaması ve $FICI > 2$ antagonistik etkileşim olarak yorumlandı (Kuok vd., 2017).

2.8. İstatistiksel Analizler

Yapılan analizler 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve elde edilen sonuçlar IBM SPSS Statistics 21 programında, One-way ANOVA ile hesaplandı ve önemli farklılıklar Duncan'ın çoklu sıra testleri ile belirlenip $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. *Morus nigra* L. Meyve Örneklerine Ait Pomolojik Özellikler

Rastgele seçilen meyvelerin boy-en, ağırlık ve renk ölçümleri yapılmıştır (Tablo 1-2). Elde edilen sonuçlara göre, örneklerinin ortalama ağırlığının (4.61 g), karadut üzerine yapılan benzer çalışmalara oranla, daha yüksek olduğu görülmüştür (Güneş ve Çekiç, 2004; Ercişli ve Orhan, 2007).

Tablo 1. Meyve örneklerinin boy-en ve ağırlık ölçümleri

	Ortalama
Boy ölçümleri (cm)	2.51±0.18
En ölçümleri (cm)	1.69±0.14
Ağırlık ölçümleri (g)	4.61±0.33

Tablo 2. Meyve örneklerinin renk ölçüm değerleri

	Ortalama
L*	15.79±0.94
a*	13.50±2.59
b*	-2.32±0.78
ΔL^*	7.48±0.94
Δa^*	17.07±2.62
Δb^*	-5.11±0.78
ΔE^*	19.43±2.19

Sonuçlar ortalama ± standart sapma ile gösterildi. L*: Rengin açıklığı, a*: Kırmızı-yeşil renk eksenini, b*: Sarı-mavi renk eksenini. L*, a*, b*: Mutlak değer; ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^* : Renk farkı.

Yapılan analizler sonucunda karadut meyve örneklerinin toplam kuru ağırlığı %24.17±0,71 olarak hesaplanmıştır. Benzer çalışmalarla kıyaslandığında, çalışmada kullanılan karadut meyvelerinin kuru ağırlık bakımından ortalamasının üzerinde bir değere sahip olduğu söylenebilir (Güneş ve Çekiç, 2004; Ercişli ve Orhan, 2007).

Meyvelerin pH değeri ise $3.66 \pm 0,8$ olarak belirlenmiştir. [Yılmaz vd., \(2012\)](#)'nin Erzincan bölgesindeki karadutlar üzerine yapmış oldukları çalışmada, benzer pH değerleri rapor edilmiştir.

Bir meyvenin pomolojik özellikleri onun kalitesini gösteren parametrelerdendir. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, çalışmada kullanılan karadut meyvesinin literatüre göre daha yüksek kalitede olduğu söylenebilir.

3.2. Toplam Fenolik-Flavonoid İçerikleri

Morus nigra L.'nin farklı ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid içerik değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Buna göre, MN1 (2.54 mg GAE/g TM) en yüksek toplam fenolik ve flavonoid (0.35 mg QE/g TM) içeriğe sahipken, her iki analizde de benzer biçimde $MN2 > MN3$ sıralaması gözlenmiştir ($p < 0.05$). Dört farklı karadut genotipi üzerinde yapılan bir çalışmada, toplam fenolik içerik 1.83-2.49 mg/g (GAE/TM) aralığında bulunmuştur ([Ercişli vd., 2010](#)). Buna göre, çalışmada kullanılan etanolik meyve ekstraktlarının fenolik içerik bakımından ortalama bir değerle, literatüre uygun olduğu görülmüştür. Ancak, flavonoid içerik bakımından literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslandığında, tüm ekstraktların daha düşük değere sahip olduğu ortaya çıkmıştır ([Ercişli ve Orhan, 2007](#); [Mahmoud vd., 2014](#)). Bu durumun, kullanılan ekstraksiyon metodundan veya bitkinin yetiştirme koşullarından kaynaklanması muhtemeldir.

Tablo 3. Ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerik analiz sonuçları

Ekstraktlar	Toplam Fenolik Miktarı mg/g (GAE/TM)	Toplam Flavonoid Miktarı (QE/TM)
MN1	2.54 ± 0.11^a	0.35 ± 0.002^a
MN2	1.79 ± 0.09^b	0.23 ± 0.01^b
MN3	1.54 ± 0.04^c	0.15 ± 0.01^c

GAE: Gallik asit eşdeğeri, QE: Kuersetin eşdeğeri, TM: Taze meyve, MN1: *M. nigra* L. etanol ekstraktı, MN2: *M. nigra* L. metanol ekstraktı, MN3: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma ile gösterildi ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Aynı sütunda yer alan küçük harfler (^a, ^b, ^c) istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.3. Antioksidan Aktivite Analizleri

Karadut meyve örneklerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan DPPH, ABTS ve Fosfomolibdat metotları tercih edilmiştir. DPPH radikali süpürme

aktivitesi sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Buna göre, MN2'nin IC_{50} (bu değer düşük olması aktivitenin yüksek olduğunu belirtmektedir) değerinin ($143 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$) en düşük olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca, askorbik asit eşdeğeri bakımından ise MN1 ($6.96 \pm 0.36 \text{ mg AAE/g TM}$), troloks eşdeğeri olarak MN2'nin ($7.25 \pm 0.49 \text{ mg TE/g TM}$) en yüksek değere sahip olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). MN3'ün radikal süpürme etkinliğinin de diğerlerine oranla en düşük olduğu tespit edilmiştir ($IC_{50}: 722.7 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0.05$). Bütün bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, antioksidan içerikleri yüksek olan ekstraktların antioksidan aktivite bakımından da yüksek olduğu gibi bir çıkarım yapılabilir. [Ercişli vd., \(2010\)](#) dört farklı karadut genotipi üzerinde yaptıkları çalışmada örneklerin DPPH analiz sonuçlarını $4.06-5.30 \text{ mg TE/g TM}$ olarak rapor etmişlerdir. [Li vd., \(2018\)](#)'e göre ise karadut örneklerinin antioksidan kapasiteleri benzer yöntemle 6.43 mg AAE/g TM olarak bulunmuştur. [Jelled vd., \(2017\)](#) ise aynı iklimik etmenler altında fakat farklı bölgelerde yetişen dört karadut örneğinin antioksidan kapasitelerini IC_{50} parametresine göre değerlendirmiş ve DPPH radikali yakalama analizi için, $1.1-6.11 \text{ mg/ml}$ olarak rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, çalışmada kullanılan karadut meyvelerinin yüksek bir radikal süpürücü etkisi olduğu söylenebilir.

Karadut meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ABTS radikali süpürücü aktivitesi sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. Buna göre, sırasıyla ekstraktların aktiviteleri $MN1 > MN2 > MN3$ olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer yandan, MN1 ve MN2'nin ABTS radikali süpürme kapasitesinin, standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asitin kapasitesine yakın olduğu belirlenmiştir. 14 karadut çeşidi üzerine yapılan bir çalışmada ABTS radikali süpürme aktivitesinin $1.7-3.6 \text{ mg TE/g TM}$ olduğu rapor edilmiştir ([Kafkas vd., 2008](#)). Benzer yöntemin kullanıldığı başka bir çalışmada ise, karadut örneklerinin aktivitesi 2.51 mg AAE/g TM olarak belirlenmiştir ([Li vd., 2018](#)). [Jelled vd., \(2017\)](#) ise aynı iklimik etmenler altında fakat farklı bölgelerde yetişen dört karadut örneğinin IC_{50} değerlerinin $3.0-6.5 \text{ mg/ml}$ olduğunu rapor etmişlerdir. Sonuçlar kendi içinde de kıyaslandığında, ekstraktların DPPH aktiviteleri ile de uyumlu olduğu ve radikal süpürme aktivitesi bakımından etanol ekstraktının ön plana çıktığı görülmektedir ($p < 0.05$). Ayrıca, elde edilen sonuçlar antioksidan aktivite ile toplam biyoaktif madde içerikleri arasında bir ilişki olduğuna dikkat çekmektedir.

Karadut meyve örneklerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan diğer bir yöntem olan fosfomolibden analiz sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. MN1 ve MN2 toplam antioksidan kapasite açısından daha yakın sonuçlar sergilerken, MN3'ün anlamlı bir biçimde diğerlerinden düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Literatürde, benzer yöntemin kullanıldığı kısıtlı çalışmalar bulunmaktadır.

Örneğin, bir çalışmada *M. nigra* L. meyvelerinin toplam antioksidan kapasitesi 1.8 mg AAE/ g TM olarak tespit edilmiştir (Özden ve Özden, 2014). Buna göre, mevcut çalışmadan elde edilen sonuçların (MN1: 21.70, MN2: 20.83, MN3: 15.41 mg AAE/g TM) literatürle karşılaştırıldığında hayli yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 4. Ekstraktların antioksidan özellikleri

	DPPH			ABTS		TAK	
	mgAAE /gTM	mgTE /gTM	IC ₅₀ (µg/ml)	mgAAE /gTM	mgTE /gTM	IC ₅₀ (µg/ml)	mgAAE /gTM
MN1	6.96±0.36 ^a	6.63±0.36 ^b	172.5±0.19 ^b	5.22±0.01 ^a	4.36±0.15 ^a	218.2±0.17 ^c	21.70±0.21 ^a
MN2	6.47±0.22 ^a	7.25±0.49 ^a	143±0.2 ^c	3.93±0.07 ^b	3.45±0.24 ^b	295.1±0.4 ^b	20.83±0.06 ^b
MN3	1.08±0.01 ^b	1.03±0.02 ^c	722.7±0.3 ^a	1.05±0.03 ^c	1.09±0.08 ^c	622.2±0.3 ^a	15.41±0.10 ^c
AA			64.2±0.16 ^d			72.8±0.18 ^d	
T			52.7±0.17 ^e			64.1±0.1 ^e	

Sonuçlar ortalama ± standart sapma ile gösterildi. TAK: Toplan antioksidan kapasite, A.A: Askorbik asit, T: Troloks, AAE: Askorbik asit eşdeğeri, TE: Troloks eşdeğeri, TM: Taze meyve, MN1: *M. nigra* L. etanol ekstraktı, MN2: *M. nigra* L. metanol ekstraktı, MN3: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı. Meyve ekstraktlarının analiz sonuçları arasındaki farklılıklar Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile analiz edildi ve $p<0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Aynı sütunda yer alan küçük harfler (a, b, c, d, e) istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4. Fenolik Bileşik İçerik Analiz Sonuçları (HPLC)

Total fenolik, total flavonoid ve toplam antioksidan analizleri sonucunda en yüksek içeriğe sahip olan MN1 (etanol ekstraktı)'in HPLC ile fenolik içerik analizi yapılmış ve sonuçlar Tablo 5'te belirtilmiştir. Kromatogramlar ise Şekil 1'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, etanol ekstraktında 23 fenolik bileşik taranmış ve bunlardan 11 tanesinin bulunduğu görülmüştür. Bununla birlikte, ekstraktta en fazla bulunan bileşenin klorojenik asit (405.9 µg/g ekstrakt) olduğu ve bunu rutin (313.3 µg/g ekstrakt), protokatekuik asit (133.0 µg/g ekstrakt), apigenin (112.4 µg/g ekstrakt), kuersetin (108.5 µg/g ekstrakt), sinnamik asit (57.0 µg/g ekstrakt), kaemferol (47.9 µg/g ekstrakt), *p*-hidroksi benzoik asit (43.0 µg/g ekstrakt), gallik asit (37.4 µg/g ekstrakt), kafeik asit (17.4 µg/g ekstrakt) ve *p*-kumarik asit (14.7 µg/g ekstrakt)'in takip ettiği görülmüştür. Bunlardan özellikle, klorojenik asit'in bitkilerde antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler başta olmak üzere, pek çok biyolojik aktiviteden sorumlu olduğu bilinmektedir (Özcan, 2019; Acet, 2020). Yine, klorojenik asit'in dut meyvelerinde bulunan başlıca fenolik bileşenlerden biri olduğu ve bu durumun bitkinin

geniş çaplı teropatik kullanımları ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Dhiman vd., 2020). Gundogdu vd., (2011)'nin kara dut üzerine yapmış olduğu bir çalışmada, klorojenik asit'in 3.106 mg/g TM olduğu bulunmuştur. Bu sonucun mevcut çalışmaya göre yüksek olduğu görülmektedir ancak bu farklılığın ekstraksiyon metodundaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, *M. nigra* meyve ekstraktlarının HPLC ile fenolik içeriğinin aydınlatıldığı başka bir çalışmada klorojenik asit'in 358 µg/g TA olduğu bulunmuştur (Pehluvan vd., 2015). Bununla birlikte, Turan vd., (2017) karadut üzerine yapmış oldukları çalışmalarında, klorojenik asit miktarını 309.6 µg/g ekstrakt olarak tespit etmişleridir. Bununla kıyaslandığında, mevcut çalışmadaki meyve ekstraktının fenolik miktarının (405.9 µg/g ekstrakt), daha yüksek olduğu ve elde edilen sonuçların literatürle kıyaslanabilir olduğu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, ekstrede tespit edilen diğer bileşenlerin pek çok biyolojik aktiviteden sorumlu oldukları daha önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (Özcan vd., 2019; Dhiman vd., 2020). Dolayısıyla, ekstrakttaki majör ve minör fenolik bileşenlerin mevcut antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 5. Etanol ekstraktının fenolik bileşen analizi

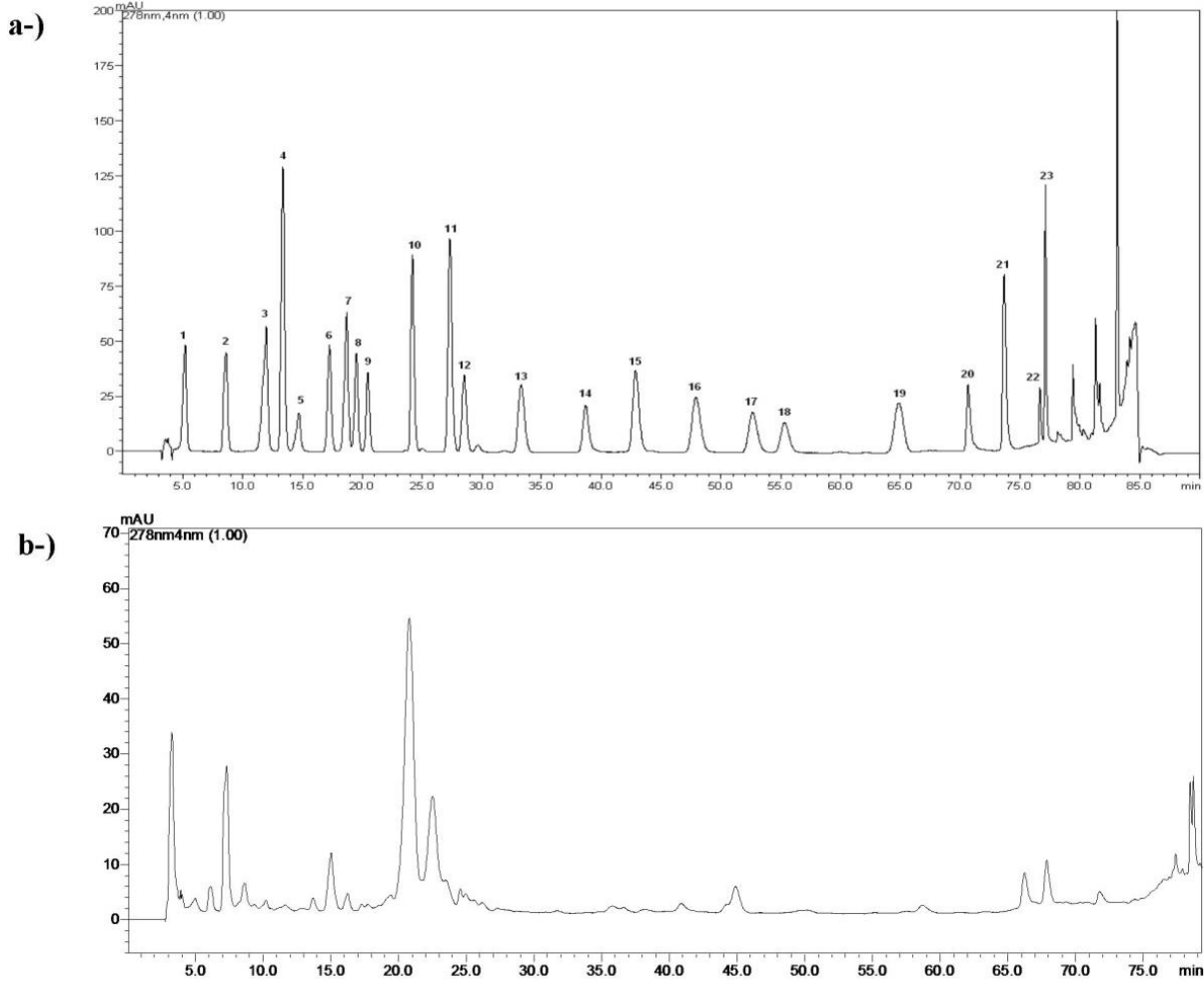
No	Fenolik bileşen	Miktar ($\mu\text{g/g}$ ekstrakt)
1	Gallik asit	37.4 \pm 0.31
2	Protokatekuik asit	133.0 \pm 0.80
3	Kateşin	*
4	<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	43.0 \pm 0.25
5	Klorojenik asit	405.9 \pm 0.61
6	Kafeik asit	17.4 \pm 0.25
7	Epikateşin	*
8	Şiringik asit	*
9	Vanilin	*
10	<i>p</i> -kumarik asit	14.7 \pm 0.15
11	Ferulik asit	*
12	Sinapinik asit	*
13	Benzoik asit	*
14	<i>o</i> -kumarik asit	*
15	Rutin	313.3 \pm 0.35
16	Hesperidin	*
17	Rosmarinik asit	*
18	Eriodiktiol	*
19	Sinnamik asit	57.0 \pm 0.15
20	Kuersetin	108.5 \pm 0.26
21	Luteolin	*
22	Kaemferol	47.9 \pm 0.21
23	Apigenin	112.4 \pm 0.32

Sonuçların üç paralel üzerinde ortalaması alındı ve ortalama \pm standart sapma olarak verildi. *Tespit edilemedi.

3.5. Dut Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin ve Antibiyotiklerle Olan Sinerjisinin Belirlenmesi

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle belirlenmiştir. Ekstraktlara ait disk difüzyon inhibisyon ölçümleri Tablo 6, mikrodilüsyon testi sonucu belirlenen MİK değerleri Tablo 7 ve MBK değerleri Tablo 8'de verilmiştir. Standart antibiyotik olarak novobiosin, kloramfenikol ve nalidiksik asit kullanılmıştır. Ekstraktların kullanılan antibiyotikler ile seçilen önemli dirençli patojen organizmalar (*Enterococcus faecium* DSMZ 13590, MRSA ATCC 43300 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine Checkboard yöntemi ile belirlenen sinerjistik etkisinin ifade edilmesinde kullanılan FICI değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Karadut ile yapılan çalışmalarda Dimitrova vd., (2014) agar difüzyon yöntemi ile karadut meyvelerinin antimikrobiyal etkinliklerini *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*'ye karşı test ettiklerini ve sırasıyla 12, 6, 11 mm'lik zon çapları belirlediklerini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da kullanılan ekstraktların *Staphylococcus aureus*'a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etkinin dikkate değer olduğu görülmektedir. Başka bir çalışmada ise Yiğit ve Yiğit (2008), karadut meyvelerinin metanolik ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini; *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* için 10 mm zon çapı olarak belirlemişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı ise antimikrobiyal bir aktivite belirlemediklerini rapor etmişlerdir.



Şekil 1. *Morus nigra*'nın fenolik bileşenlerine ait RP-HPLC kromotogramları, a-) Standartlar (*), b-) bitkinin etanol ekstaktı

(*) **1:** gallic acid, **2:** protocatechic acid, **3:** catechin, **4:** p-hydroxy benzoic acid, **5:** chlorogenic acid, **6:** caffeic acid, **7:** epicatechin, **8:** syringic acid, **9:** vanilin, **10:** p-coum acid, **11:** ferulic acid, **12:** sinapinic acid, **13:** benzoic acid, **14:** o-coum acid, **15:** rutin, **16:** hesperidin, **17:** rosmarinic acid, **18:** eriodictiol, **19:** cinnamic acid, **20:** quercetin, **21:** luteolin, **22:** kamferol, **23:** apigenin

Çalışmamızda *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. Ekstraktların patojen mikroorganizmalar üzerine etkinlik konsantrasyonunu belirleyen MİK değerlerine bakıldığında düşük etkinlik gösterdikleri anlaşılmaktadır. MN3 ekstraktının *E. faecalis*: 256 µg/ml ve *L. monocytogenes*: 512 µg/ml MİK değerleri diğer ekstraktlara nazaran daha etkili bulunmuştur. Yiğit ve Yiğit (2008), karadut meyvelerinin metanolik ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı 0.625 mg/ml'lik MİK değeri gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan literatür taraması sonucunda *Morus nigra* L. meyvelerinin antibiyotiklerle sinerjistik etkisini irdeleyen çalışma tespit edilememiştir. Fakat farklı bitki ekstraktlarının antibiyotiklerle sinerjistik etkileşimlerde buldukları üzerine çalışmalar mevcuttur (Özcan ve Acet, 2018; Vambe vd., 2018; Kuok vd., 2017). Dut

ekstraktları/novobiosin denemelerinde test edilen mikroorganizmalara karşı MN3/novobiosin haricinde tam sinerji görülmüştür. Dut ekstraktları/kloramfenikol uygulamalarında MN3/kloramfenikol tüm organizmalar, MN1/kloramfenikol ise *P. aeruginosa* üzerine tam sinerji gösterirken, dut ekstraktları/nalidiksik asit uygulamalarında tüm ekstraktlar sadece *P. aeruginosa*'ya tam sinerji sergilerken diğer ekstrakt ve antibiyotik kombinasyonları herhangi bir sinerjistik etkileşim göstermemiştir. Tüm sonuçlar beraber değerlendirildiğinde ekstrakt ve antibiyotiklerin birlikte uygulamaları *P. aeruginosa* üzerine oldukça etkili bulunmuştur. Ekstraktların antibiyotiklerle sinerjik aktivite göstermeleri daha düşük antibiyotik uygulamaları ile ilgili patojenlerle mücadele edilebileceğini göstermektedir. Bu durumda normalde antimikrobiyal etkinliği düşük olan dut ekstraktlarının kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini arttırdığı açıkça görülmektedir.

Tablo 6. Ekstraktların patojen mikroorganizmalara karşı inhibisyon zon ölçümleri (mm)

Ekstraktlar	MN1	MN2	MN3	Nov.	Klor.	Nal.
Gram (+) bakteriler						
<i>E. faecalis</i>	10.84±0.09	10.24±0.12	9.59±0.04	14.66±0.22	14.88±0.12	14.21±0.17
<i>S. aureus</i>	11.10±0.15	11.33±0.12	10.30±0.06	15.09±0.18	15.41±0.17	15.05±0.24
<i>E. faecium</i>	10.26±0.05	10.19±0.13	10.24±0.03	14.39±0.15	15.01±0.10	14.56±0.46
<i>B. cereus</i>	9.50±0.15	9.50±0.11	9.90±0.05	14.73±0.15	14.74±0.17	14.54±0.18
<i>L.monocytogenes</i>	9.55±0.10	9.12±0.07	8.90±0.04	15.05±0.19	14.52±0.28	14.44±0.21
MRSA	8.91±0.14	8.82±0.07	8.59±0.03	13.23±0.22	13.15±0.18	13.23±0.22
Gram (-) bakteriler						
<i>P. aeruginosa</i>	10.21±0.11	10.09±0.09	11.39±0.08	14.43±0.11	14.50±0.15	14.47±0.16
<i>Y.enterocolitica</i>	8.86±0.11	8.42±0.06	8.17±0.17	13.80±0.22	14.10±0.23	13.47±0.20
<i>K. pneumoniae</i>	9.20±0.06	9.02±0.06	8.82±0.05	14.80±0.13	14.74±0.10	14.45±0.12
<i>V.parahaemolyticus</i>	9.83±0.11	10.73±0.05	10.25±0.10	14.47±0.17	14.84±0.12	14.27±0.17
<i>E.coli</i> O157:H7	10.36±0.13	9.30±0.06	9.04±0.07	14.87±0.10	14.71±0.15	14.19±0.23
<i>P. vulgaris</i>	10.11±0.14	9.87±0.10	9.55±0.09	14.83±0.18	14.94±0.19	14.18±0.16
Maya ve Küf						
<i>C. tropicalis</i>	11.97±0.12	9.79±0.03	9.91±0.04	-	-	-
<i>A. flavus</i>	10.58±0.13	9.25±0.06	9.05±0.10	-	-	-

MN1: *M. nigra* L. etanol ekstraktı, MN2: *M. nigra* L. metanol ekstraktı, MN3: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı, Nov.: Novobiosin, Klor.: Kloramfenikol, Nal.: Nalidiksik asit.

Tablo 7. Ekstraktlar ve antibiyotiklerin mikroorganizmalara karşı MİK değerleri (mg/ml)

Ekstraktlar	MN1	MN2	MN3	Nov.	Klor.	Nal.
Gram (+) bakteriler						
<i>E. faecalis</i>	4.1	2.05	0.256	0.016	0.016	0.016
<i>S. aureus</i>	8.2	8.2	8.2	0.128	0.128	0.064
<i>E. faecium</i>	4.1	2.05	1.025	0.001	0.004	0.064
<i>B. cereus</i>	8.2	8.2	8.2	0.016	0.016	0.032
<i>L.monocytogenes</i>	8.2	8.2	0.512	0.016	0.016	0.032
MRSA	1.25	2.05	4.1	0.001	0.032	0.032
Gram (-) bakteriler						
<i>P. aeruginosa</i>	4.1	4.1	4.1	0.001	0.004	0.032
<i>Y.enterocolitica</i>	4.1	4.1	4.1	0.032	0.032	0.064
<i>K. pneumoniae</i>	4.1	4.1	4.1	0.032	0.032	0.128
<i>V.parahaemolyticus</i>	8.2	8.2	8.2	0.128	0.064	0.128
<i>E.coli</i> O157:H7	8.2	8.2	8.2	0.064	0.016	0.064
<i>P. vulgaris</i>	2.05	2.05	2.05	0.064	0.032	0.032
Maya ve Küf						
<i>C. tropicalis</i>	8.2	8.2	8.2	0.008	0.016	0.032
<i>A. flavus</i>	8.2	8.2	8.2	0.008	0.016	0.064

MN1: *Morus nigra* L. etanol ekstraktı, MN2: *Morus nigra* L. metanol ekstraktı, MN3: *Morus nigra* L. etil asetat ekstraktı.

Tablo 8. Ekstraktların patojen mikroorganizmalara karşı MBK değerleri (mg/ml)

Ekstraktlar	MN1	MN2	MN3
Gram (+) bakteriler			
<i>E. faecalis</i>	4.1	4.1	0.512
<i>S. aureus</i>	8.2	8.2	8.2
<i>E. faecium</i>	4.1	4.1	2.05
<i>B. cereus</i>	8.2	8.2	8.2
<i>L.monocytogenes</i>	8.2	8.2	1.025
MRSA	2.05	4.1	4.1
Gram (-) bakteriler			
<i>P. aeruginosa</i>	4.1	4.1	4.1
<i>Y.enterocolitica</i>	4.1	4.1	4.1
<i>K. pneumoniae</i>	4.1	4.1	4.1
<i>V.parahaemolyticus</i>	8.2	8.2	8.2
<i>E.coli</i> O157:H7	8.2	8.2	8.2
<i>P. vulgaris</i>	4.1	4.1	4.1
Maya ve Küf			
<i>C. tropicalis</i>	8.2	8.2	8.2
<i>A. flavus</i>	8.2	8.2	8.2

MN1: *M. nigra* L. etanol ekstraktı, MN2: *M. nigra* L. metanol ekstraktı, MN3: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı, TM: Taze meyve.

Tablo 9. Ekstrakt ve antibiyotik karışımlarının FICI değerleri

Ekstrakt+antibiyotik	<i>P. aeruginosa</i>	MRSA	<i>E. faecium</i>
MN1/Nov.	0.25	0.25	0.5
MN2/Nov.	0.25	0.25	0.25
MN3/Nov.	0.06	0.12	1
MN1/Klor.	0.5	1	1
MN2/Klor.	1	1	2
MN3/Klor.	0.06	0.06	0.12
MN1/Nal.	0.5	2	1
MN2/Nal.	0.5	2	2
MN3/Nal.	0.03	1	2

MN1/Nov.: *M. nigra* L. etanol ekstraktı + novobiosin, MN1/Klor.: *M. nigra* L. etanol ekstraktı + kloramfenikol, MN1/Nal.: *M. nigra* L. etanol ekstraktı + nalidiksik asit, MN2/Nov.: *M. nigra* L. metanol ekstraktı + novobiosin, MN2/Klor.: *M. nigra* L. metanol ekstraktı + kloramfenikol, MN2/Nal.: *M. nigra* L. metanol ekstraktı + nalidiksik asit, MN3/Nov.: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı + novobiosin, MN3/Klor.: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı + kloramfenikol, MN3/Nal.: *M. nigra* L. etil asetat ekstraktı + nalidiksik asit. FICI≤0.5 tam sinerji, 0.5<FICI≤ 0.75 kısmi sinerji, 0.76<FICI≤1) sinerjistik etkileşimin olmaması ve FICI>2 antagonistik etkileşim olarak değerlendirildi.

4. Sonuçlar

Sonuç olarak, bu çalışmada Elazığ'dan toplanan *Morus nigra* meyvelerine ait ekstraktların sinerjistik aktivitesi ilk defa rapor edilmiştir. Bu bağlamda, çalışılan ekstraktların antibiyotiklerle beraber kullanıldığında antibiyotiklerin antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Böylece antibiyotiklerin daha düşük dozlarda kullanılabilirliği ile antibiyotik dirençlilik konsantrasyonlarının düşük tutulması mümkün olabilecektir. Ayrıca klorojenik asit, etanol ekstraktının ana bileşeni olarak tespit edilmiştir. Ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin içerdikleri majör ve minör bileşenlerin birlikte oluşturduğu etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dut ekstraktlarının doğal antioksidan ve antibiyotiklerle beraber kullanma potansiyeli farmasötik açıdan kullanılabilirliği olduğunu işaret etmektedir.

Katkı Belirtme

Bu çalışma Osman Akmeşe'nin "*Morus nigra* L. (Karadut) Meyve Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Antibiyotiklerle Sinerjistik Etkisinin Belirlenmesi" adlı yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Çalışmalar Gümüşhane Üniversitesi ve Giresun Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik araştırma laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Kaynaklar

Acet, T., 2020. Determining the Phenolic Components by Using HPLC and Biological Activity of *Centaurea triumfetti*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology, doi: 10.1080/11263504.2020.1722275.

Alhathloul, H.A., Soliman, M.H., Ameta, K.L., El-Esawi, M.A. ve Elkelish, A., 2020. Changes in Ecophysiology, Osmolytes, and Secondary Metabolites of the Medicinal Plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* Subjected to Drought and Heat Stress. Biomolecules, 10, 43.

Beara, I.N., Lesjak, M.M., Cetojevic-Simin, D.D., Marjanovic, Z.S., Ristic, J.D., Mrkonjic, Z.O. ve Mimica-Dukic, N.M., 2014. Phenolic Profile, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Black (*Tuber Aestivum* Vittad.) and White (*Tuber Magnatum* Pico) Truffles. Food Chemistry, 165, 460–466.

Budiman, A., Sofian, F.F., Santi, N.M. ve Aulifa, D.L. 2020. The Formulation of Lozenge Using Black Mulberries (*Morus Nigra* L.) Leaf Extract as An A-Glucosidase Inhibitor. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 12, 171-176.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards), 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 17th Informational Supplement, M100-S17, 27, 1.

Diab, K.A., Fahmy, M.A., Hassan, E.M., Hassan, Z.M., Omara, E.A. ve Abdel-Samie, N.S., 2020. Inhibitory Activity of Black Mulberry (*Morus Nigra*) Extract Against Testicular, Liver and Kidney Toxicity Induced by Paracetamol in Mice. Molecular Biology Reports, 47, 1733-1749. doi.org/10.1007/s11033-020-05265-1.

Dimitrova, M.P., Mihaylova, D.S., Popova, A.T., Sapundzhieva, T.N., Alexieva, I.N. ve Fidan, H.N., 2014. Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Mulberry Fruit, International Scientific-Practical Conference Food, Technologies and Health, 2014, s. 23-27.

Dhiman, S., Kumar, V., Mehta, C.M., Gat, Y. ve Kaur, S., 2020. Bioactive Compounds, Health Benefits and Utilisation of *Morus* Spp.–A

- Comprehensive Review. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 95(1), 8-18. doi: 10.1080/14620316.2019.1644969.
- Ercisli, S. ve Orhan, E., 2007. Chemical Composition of White (*Morus alba*), Red (*Morus rubra*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry fruits. Food Chemistry, 103, 1380-1384.
- Ercisli, S., Tosun, M., Duralija, B., Voca, S., Sengul, M. ve Turan, M., 2010. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. Food Technology and Biotechnology, 48(1), 102-106.
- Fadli, M., Chevalier, J., Saad, A., Mezrioui, N.E., Hassani, L. ve Pages, J.M., 2012. Antibacterial Activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* Essential Oils Against Nosocomial Infection-Bacteria and Their Synergistic Potential with Antibiotics. Phytomedicine, 19, 464-471.
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Gazioglu Sensoy, R.I. ve Yilmaz, H., 2011. Determination of Fruit Chemical Properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. Scientia Horticulturae, 132, 37-41.
- Gunes, M. ve Cekic, C., 2004. Some Chemical and Physical Properties of Fruits of Different Mulberry Species Commonly Grown in Anatolia, Turkey. Asian Journal of Chemistry, 16, 1849-1855.
- Hojjatpanah, G., Fazaeli, M. ve Emam-Djomeh, Z., 2011. Effects of Heating Method and Conditions on the Quality Attributes of Black Mulberry (*Morus nigra*) Juice Concentrate. International Journal of Food Science and Technology, 46(5), 956-962.
- Jelled, A., Ben Hassine, R., Thouri, A., Flamini, G., Chahdoura, H., El Arem, A., Ben Lamine, J., Kacem, A., Haouas, Z., Ben Cheikh, H. ve Achour, L., 2017. Immature Mulberry Fruits Richness of Promising Constituents in Contrast with Mature Ones: A Comparative Study Among Three Tunisian Species. Industrial Crops and Products, 95, 434-443.
- Jiang, H., Xu, L., Liu, J.C. ve Huang X.Z., 2011. Research Progress on Active Ingredients and Pharmacological Functions of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). Science of Sericulture, 1, 20.
- Kafkas, S., Özgen, M., Doğan, Y., Özcan, B., Ercişli, S. ve Serçe, S., 2008. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers. Journal of American Society for Horticultural Science, 133593-597.
- Kostic, D.A., Dimitrijevic, D.S., Mitic, S.S., Mitic, M.N., Stojanovic, G.S. ve Zivanovic, A.V., 2013. A Survey on Macro- and Micro-Elements, Phenolic Compounds, Biological Activity and Use of *Morus* Spp. (Moraceae). Fruits, 68(4), 333-47.
- Kuok, C.F., Hoi, S.O., Hoi, C.F., Chan, C.H., Fong, I.H., Ngok, C.K. ve Fong, P., 2017. Synergistic Antibacterial Effects of Herbal Extracts and Antibiotics on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Computational and Experimental Study. Experimental Biology and Medicine, 242(7), 731-743.
- Li, Y., Bao, T. ve Chen, W., 2018. Comparison of the Protective Effect of Black and White Mulberry Against Ethyl Carbamate-induced Cytotoxicity and Oxidative Damage. Food Chemistry, 243, 65-73.
- Mahmoud, H.I., El Rab, S.M.G., Khalil, A.F. ve Ismael, S.M., 2014. Hypoglycemic Effect of White (*Morus alba* L.) and Black (*Morus nigra* L.) Mulberry Fruits in Diabetic Rat. European Journal of Chemistry, 5(1), 65-72.
- Özcan, K., Acet, T. ve Çorbacı, C., 2019. *Centaurea hypoleuca* DC: Phenolic Content, Antimicrobial, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities. South African Journal of Botany, 127, 313-318.
- Özcan, K. ve Acet, T., 2018. Antimicrobial and Antioxidant Screening, Synergy Studies of *Helichrysum chionophilum* Extracts Against to Resistant Microbial Strains. Fresenius Environmental Bulletin, 27, 5045-5052.
- Özden, M. ve Özden, A.N., 2014. Farklı Renkteki Meyvelerin Toplam Antosiyanin, Toplam Fenolik Kapsamlarıyla Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 9(2), 1-12.
- Pehlivan, M., Kaya, T., Doğru, B., Lara, İ., 2015. The Effect of Frozen Storage on the Phenolic Compounds of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) and *Morus alba* L. (White Mulberry) Fruit. Fruits, 70(2), 117-122. doi: doi.org/10.1051/fruits/2015004.
- Rehman, K., Kamran, S.H. ve Akash, M.S.H., 2020. Chapter 16-Toxicity of Antibiotics, In Advances in Environmental Pollution Research Series, Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment, Elsevier, ISBN 9780128188828, 1, 234-252p. doi: doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00016-4.
- Sánchez-Salcedo, E.M., Mena, P., García-Viguera, C., Hernández, F. ve Martínez J.J. 2015. (Poly)phenolic Compounds and Antioxidant Activity of White (*Morus alba*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Leaves: Their Potential

- for New Products Rich in Phytochemicals. *Journal of Functional Foods*, 18, 1039-1047.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Reesb, J.F. ve Larondellea, Y., 2007. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Fifteen Selected Plant Species from the Amazonian Region. *Food Chemistry*, 101(3), 1012-1018.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C. ve Wichers, H.J., 2000. An Easy and Fast Test to Compare Total Free Radical Scavenger Capacity of Foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 11, 330-338.
- Thakur, N., Bashir, S. F. Ve Kumar, G., 2020. Assessment of Phytochemical Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Methanolic Extracts of *Morus nigra* and *Artocarpus heterophyllus* Leaves. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(3-4), 83-91.
- Turan, İ., Demir, S., Kilinc, K., Arslan Burnaz, N., Ozer Yaman, S., Akbulut, A., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. ve Deger, O., 2017. Antiproliferative and Apoptotic Effect of *Morus nigra* Extract on Human Prostate Cancer Cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25 (2), 241-248.
- Vambe, M., Aremu, A.O., Chukwujekwu, J.C., Finnie, J.F. ve Staden, J.V., 2018. Antibacterial Screening, Synergy Studies and Phenolic Content of Seven South African Medicinal Plants Against Drug-sensitive and -resistant Microbial Strains. *South African Journal of Botany*, 114, 250-259.
- Vijayan, K., Tikader, A., Weiguo, Z., Nair, C.V., Ercisli, S. ve Tsou, C.H., 2011. *Morus*, in: Kole C (ed) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Tropical and Subtropical Fruits*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp.75–95.
- Wang, Y., Liang, Y. ve Cock, I.E., 2020. *Rosa canina* L. Fruit Extracts Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of some Autoimmune Inflammatory Diseases and Potentiate the activity of Conventional Antibiotics. *Pharmacognosy Communications*, 10(1), 7-17.
- Yan, J., Ruan, J., Huang, P., Sun, F., Zheng, D., Zhang, Y. ve Wang, T., 2020. The Structure–Activity Relationship Review of the Main Bioactive Constituents of *Morus* Genus Plants. *Journal of Natural Medicine*, 74, 331-340. Doi: doi.org/10.1007/s11418-019-01383-8.
- Yiğit, D. ve Yiğit, N., 2008. Antibacterial Activity of Black Mulberry (*Morus nigra*) Fruits and Leaves. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 39-47.
- Yilmaz, K.U., Zengin, Y., Ercisli, S., Demirtas, M.N., Kan, T. ve Nazli, A.R., 2012. Morphological Diversity on Fruit Characteristics Among Some Selected Mulberry Genotypes from Turkey. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(1), 211-214.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A. ve Ceylan, R., 2014. *Sideritis galatica* Bornm.: A Source of Multifunctional Agents for the Management of Oxidative Damage, Alzheimer's's and Diabetes Mellitus. *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.