

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Kabuk Ekstrelerinden Elde Edilen Luteolinin Antibakteriyel Etkisi

Antibacterial Effect of Luteolin Obtained from Terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) Bark Extracts

Suna KIZILYILDIRIM ^{1*} 

¹ Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye



ÖZ

Fitokimyasallar, çeşitli farmakolojik etkilere sahip, tedavi edici bitkilerden elde edilen kimyasal bileşiklerdir. Özellikle flavonoidler çeşitli biyolojik aktivitelere ve farmakolojik etkilere sahip en etkili bir fitokimyasal bileşendir. Luteolin birçok bitki türünde doğal olarak bulunan önemli bir flavonoiddir. Bu çalışmada menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) kabuk ekstrelerinden elde edilen luteolin flavonoidinin antibakteriyel etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, luteolinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşlarına karşı MİK değerleri, broth mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, luteolinin test edilen tüm suşlara karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Flavonoid, Luteolin, Antibakteriyel aktivite

Alınış / Received: 05.07.2024 Kabul / Accepted: 02.08.2024 Online Yayınlanma / Published Online: 28.08.2024



ABSTRACT

Phytochemicals are chemical compounds derived from therapeutic plants that have a variety of pharmacological effects. In particular, flavonoids are the most effective phytochemical components with various biological activities and pharmacological effects. Luteolin is an important flavonoid found naturally in many plant species. This study aimed to investigate the antibacterial effect of luteolin flavonoid obtained from terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) bark extracts. In the study, MIC values of luteolin against reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were investigated by broth microdilution method. As a result of the study, it was determined that luteolin showed antibacterial activity against all tested strains.

Keywords: Flavonoid, Luteolin, Antibacterial activity



1. Giriş

Günümüzde antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle, son yıllarda yapılan çalışmaların çoğunluğu bitkisel ilaç olarak kullanılan bitki türlerinden izole edilen biyolojik olarak aktif bileşenlere doğru kaymaktadır (1,2). Bitkilerin antimikrobiyal özellikleri, antimikrobiyal aktivitelere sahip, nispeten karmaşık yapıların çeşitli ikincil metabolitlerin yetenekleriyle ilgilidir (3,4).

Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) uzun yıllardan beri alternatif tıpta ilgi gören bir bitki türüdür. *P. terebinthus* Akdeniz florasının tipik bir temsilcisidir ve ülkemizin güney ve batı bölgelerinde yaygın olarak "menengiç" diye adlandırılır (5). Menengiç meyveleri birçok alanda kullanılmaktadır; öğütüldükten ve uygun şartlarda kavrulduktan sonra menengiç kahvesi olarak, bal ile karıştırılarak idrar söktürücü ve meyveden elde edilen yağ ile sabun üretiminde (bittim sabunu) yaygın olarak kullanılır. Anadolu'da menengiç bitkisinin yaprakları karın ağrısı, mantar hastalığı ve antidiyabetik olarak, reçinesi ise idrar yolları ve solunum yolları antiseptiği, astım tedavisi, ateş düşürücü ve antiinflamatuvar olarak kullanıldığı bildirilmiştir (6,7). Menengiç meyve kabuklarında luteolin bol bulunmaktadır. Luteolin doğal bir flavonoiddir ve bitkilerde en bol bulunan ikincil metabolitlerden biridir. Luteolin, mükemmel antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (8). Kimyasal olarak, iki benzen halkası ve C2-C3 karbon çift bağına sahip bir oksijen içeren halka içeren bir C6-C3-C6 yapısına sahiptir (9, 10). Yapı-aktivite çalışmaları, luteolin yapısının 5, 7, 3' ve 4' karbon pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının ve 2-3 çift bağının varlığının, onun çoklu farmakolojik etkilerinden sorumlu olduğunu göstermiştir (9). Son zamanlarda yapılan az sayıda çalışmada, luteolinin bakteriyel patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini bildirmiştir (11), ancak antimikrobiyal mekanizmaları açıklığa tam olarak henüz kavuşturulmamıştır. Luteolinin, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* üzerine antibakteriyel aktivite çalışmalarında, bakterilerinin hücre zarı geçirgenliğini artırdığı ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (12).

Bu çalışmada, menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) kabuk ekstraktlarından izole edilmiş ve kimyasal yapısı doğrulanmış luteolinin, antibakteriyel aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Luteolin İzolasyonu

P. terebinthus meyveleri yerel bir pazardan yeterli miktarda elde edilmiştir. *P. terebinthus* meyvelerinden luteolin izolasyonu için dış kabuk kısmı tercih edilmiştir. Dış kabuklarından ekstraksiyon ve kromatografik yöntemlerle luteolin saflaştırılmıştır. Saflaştırma prosesinde menengiç meyveleri öğütülmeden tüm olarak (1kg) 5 L balonlara konarak ilk önce hekzan ile ekstrakte (5 x 2.5 L) edilmiştir. Hekzan ekstresi sonrası meyve materyali öğütülmeden tüm olarak asetona (5 x 2.5 L) ekstrakte edilmiştir. Aseton düşük sıcaklık ve basınç altında ekstreden bir döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından luteolini saflaştırmak üzere ekstre silika jel kolon kromatografisine (70-230 mesh) tabii tutulmuştur ve yürütücü faz olarak etil asetat kullanılmıştır. Fraksiyonlar 50 mL hacimler halinde ince tabaka kromatografisinde yine aynı hareketli faz kullanılarak kontrol edilmiştir. Saflaştırılması hedeflenen maddeyi içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirilerek yeniden aynı şartlarda silika jel kolon kromatografisine tabii tutularak saflık oranı artırılmıştır. Yüksek oranda saflaştırılan maddenin kimyasal yapısı UV, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹D ve ²D-NMR teknikleri ile aydınlatılmıştır ve luteolin olarak karakterize edilmiştir (13).

Antibakteriyel Aktivite Testi

Antibakteriyel aktivite testi için *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşları seçilmiştir.

Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Luteolinin, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 referans suşlarına karşı MİK değerleri, broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Referans suşlar, ayrı ayrı kanlı agar besiyerine inoküle edilerek 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra elde edilen taze saf bakteri kültürlerinden 0.5 Macfarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

Tüm kuyucuklara 100 µL MHB içinde luteolinin çeşitli konsantrasyonları (6.25-800µg/mL) hazırlanmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa 10 µL bakteri inokulum ilave edilmiştir. Mikroplaklar 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından MİK değeri, gözle görülür bakteri üremesini önleyen en düşük luteolin konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır. Deney üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir (14).

3. Bulgular

Çalışmada, *P. terebinthus* özütlerinden izole edilen luteolinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif, test edilen referans bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür.

Luteolinin, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401 izolatlarına karşı MİK değerlerinin 50 µg/mL olduğu, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 izolatlarına karşı ise 400 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli bakterilerin oranlarındaki artış nedeniyle yeni, doğal antibakteriyel bileşiklerin keşfine olan ilgi artmaktadır. Birçok araştırmacı luteolinin antiinflamatuvar ve antitümör özelliklerine odaklanmıştır. Bu çalışmada da çeşitli bakterilere karşı luteolinin antibakteriyel aktivitesi araştırılmış olup, luteolinin test edilen tüm izolatlara karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür. Kavak ve arkadaşları, *P. terebinthus*'un antimikrobiyal aktivitesini belirlemek yaptıkları çalışmalarında, gram pozitif bakteri *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etki göstermesine rağmen, gram negatif *E. coli* üzerinde etkisiz olduğunu bildirmişlerdir (15). Başka bir çalışmada, *P. terebinthus*'un olgun meyvesinin *Escherichia coli* ATCC 25922'ye karşı 4,24 mm çapında, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı ise 4,20 mm çapında zonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Menengiç bitkisinin olgunlaşmamış meyvelerinin metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir (16). Guo ve

arkadaşları, luteolinin bakterilerde hücre duvarının bütünlüğünü bozarak hücre duvarı ile zar arasında bulunan alkalın fosfatın sızmasına yol açabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, luteolinin *Trueperella pyogenes*'e karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini de bildirmişlerdir. (8).

P. terebinthus özütleri ile karıştırılmış kitosan filmlerinin gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri hakkında yapılan bir çalışmada, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi Gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuştur (17). Xi ve arkadaşları, *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (18). Luteolinin *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı bakterinin hücre zarlarına zarar vererek antibakteriyel etki gösterdiklerini ve bununla birlikte biyofilm oluşumunu engelleyebileceği rapor edilmiştir. Bu bağlamda araştırmacılar, luteolinin gıda endüstrisinde gıda koruyucusu ve yüzey dezenfektanı olarak değerli uygulamalara sahip olabileceğini öne sürmüştür (19). Başka bir çalışmada; luteolinin *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite aktivitesinin, DNA topoizomeraz I ve II'nin aktivitesini inhibe edebilmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (20). Bununla birlikte, luteolinin *Bacillus cereus* ve *Salmonella infantis*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens*'e karşı iyi antibakteriyel aktivite sergilediği de gösterilmiştir (21, 12).

Bu çalışmada da, *P. terebinthus* ekstresinden izole edilen luteolinin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir. Luteolinin, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Streptococcus agalactiae* ATCC 12401 izolatlarına karşı MIC değerlerinin 50 µg/mL, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 izolatlarına karşı ise 400 µg/mL oranlarında etki göstermiştir. Çalışmada, luteolinin gram pozitif bakterilere, Gram negatif bakterilere kıyasla daha düşük konsantrasyonda etkili olduğu bulunmuştur. Bu durum gram negatif bakterilerin sahip olduğu duvar yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalar sonucunda *P. terebinthus* bitki popülasyonlarının coğrafi kökenine, iklim şartlarına, genetik veya çevresel faktörlere bağlı olarak antibakteriyel aktivite sonuçlarında farklılık görülebilir. Ayrıca bitki özütünden izole edilen flavonoidlerin çeşidine ve miktarına bağlı olarak da değişkenlik gösterebilir.

Sonuç olarak, *P. terebinthus* özütünden izole edilen luteolin etkili antibakteriyel aktivite göstermiştir. Yapılan araştırmalar ışığında, luteolin çeşitli geleneksel tıbbi uygulamalarda, antiinflamatuvar ajan ve antiseptik ürünlerde umut verici bir bileşen olarak kullanılabilir. Ancak, luteolinin diğer mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal etkinliği kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Teşekkür

Çalışmada luteolin izolasyonunun yapılmasını sağlayan, Prof. Dr. Ahmet Çakır ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akyüz'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

1. Banica T, Belinschi ST, Capitaine M, Collins B. Free Bessel Laws. Canadian Journal of Maiyo, Z., Ngure, R., Matasyoh, J., Chepkorir, R., 2010. Phytochemical Constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three Amaranthus plant species. Afr. J. Biotechnol 2011;9(21):3178-3182.
2. Erfan AM, Marouf S. Cinnamon oil downregulates virulence genes of poultry respiratory bacterial agents and revealed significant bacterial inhibition: An in vitro perspective. Vet. World 2019;12 (11):1707-1715.
3. Matasyoh J, Maiyo Z, Ngure R, Chepkorir R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. Food Chem 2009;113(2):526-529.
4. Souza ELD, Lima EDO, Freire KL, Sousa CD. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Brazil. Arch Biol. Tech 2005;48(2):245-250.
5. Özcan MM, Al Juhaimi F, Uslu N, Ahmed IAM, Babiker EE, Osman MA, Gasseem MA, Alqah HAS, & Ghafoor K. Effect of sonication process of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) fruits on antioxidant activity, phenolic compounds, fatty acids and tocopherol contents. Journal of Food Science and Technology 2020;57:2017-25.

6. Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, & Ulubelen A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* 2007;103(3):816-822.
7. Naghmachi M, Raissi A, Baziyar P, Homayoonfar F, Amirmahani F, & Danaei M. Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by *Pistacia terebinthus* extract: Comprehensive evaluation of antimicrobial, antioxidant and anticancer effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2022;608:163-169.
8. Guo Y, Liu Y, Zhang Z, Chen M, Zhang D, Tian C, Liu M, & Jiang G. The antibacterial activity and mechanism of action of luteolin against *Trueperella pyogenes*. *Infection and drug resistance* 2020;13:1697-1711.
9. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 1998;56(11):317-333.
10. Lin Y, Shi R, Wang X, & Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets* 2008;8(7):634-646.
11. Nabavi SF, Braidy N, Gortzi O, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M, SkalickaWoźniak K, Nabavi SM. Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: a brief review, *Brain Res. Bull* 2015;119:1–11.
12. Qian W, Liu M, Fu Y, Zhang J, Liu W, Li J, and et al. Antimicrobial mechanism of luteolin against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and its antibiofilm properties. *Microbial pathogenesis* 2020;142:104056.
13. Kisa A, Akyüz M, Çoğun HY, Kordali Ş, Bozhüyük AU, Tezel B, et al. Effects of *Olea europaea* L. leaf metabolites on the tilapia (*Oreochromis niloticus*) and three stored pests, *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* and *Acanthoscelides obtectus*. *Records of Natural Products* 2018;12(3):201.
14. Kızılyıldırım S, Kandemir T, Kendir G, Muhammed MT, Köroğlu A, Köksal F, & Ozogul F. The antibacterial effect mechanisms of *Laurus nobilis* extracts on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *Food Bioscience* 2024;104011.
15. Kavak DD, Altıok E, Bayraktar O, & Ülkü S. *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010;64:167-171.
16. Fidan MS, Baltacı C, Öz M, and Akar Z. Chemical composition of *Pistacia terebinthus* L. and its phytochemical and biological properties. *BioResources* 2023;18(4):6862-6881.
17. Kaya M, Khadem S, Cakmak YS, Mujtaba M, İlk S, Akyuz L, Salaberria AM, et al. Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Adv.* 2018;8:3941-3950.
18. Xi M, Hou Y, Wang R, Ji M, Cai Y, Ao J, Shen H, Li M, Wang J, Luo A. Potential application of luteolin as an active antibacterial composition in the development of hand sanitizer products. *Molecules* 2022;27(21):7342.
19. Xiao C, Xia ML, Wang J, Zhou XR, Lou YY, Tang LH, Qian LB. Luteolin attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by modulating Nrf2 antioxidative function. *Oxidative Med. Cell Longev* 2019;2719252.
20. Wang Q, Xie M. Antibacterial activity and mechanism of luteolin on *Staphylococcus aureus*. *Wei Sheng Wu Xue Bao Acta microbiologica Sinica* 2010;50(9):180-4.
21. Lv PC, Li HQ, Xue JY, Shi L, Zhu HL. Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *Eur J Med Chem* 2009;44(2):908-914.