



## Determination of phenolic compounds and antibacterial activity of *Juglans regia*

Ebru ÖNEM <sup>\*1</sup>, Ayşegül ÖZAYDIN <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel University Faculty of Pharmacy Department of Main Pharmaceutical Sciences 32260 Isparta, Turkey

<sup>2</sup>Süleyman Demirel University, YETEM, Applied Research Unit, Isparta, Turkey

### Abstract

Treatment with plants has gained more importance because of reaching critical limits to antibiotic resistant. In this study phenolic compounds of walnut membrane was analyzed using by HPLC. Antibacterial activity of methanol and ethanol extracts of juglans fruit membranes were evaluated against Gram-positive and Gram-negative strains (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and clinical *Staphylococcus spp.* As a results; it was observed that all extracts had antibacterial activity on Gram-positive strains different rate (12 mm to 19 mm). The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) value was detected 1,01 mg/ml for reference strains. HPLC analysis showed walnut membrane extracts have some phenolic acids and flavonoids such as gallic acid, epicatechin, catechin, rutin, p-hydroxy benzoic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid.

**Key words:** Walnut membrane, phenolic, HPLC, antibacterial

----- \* -----

### *Juglans regia* fenolik bileşen içeriklerinin ve antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi

### Özet

Antibiyotik direncinin kritik seviyelere ulaşması neticesinde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bitkilerin kullanımı giderek önem kazanmıştır. Yapılan bu çalışmada ceviz ara kabuğunun içerdiği bazı fenolik bileşikler HPLC ile analiz edilmiştir. Ayrıca antibakteriyel etkisi bazı Gram-pozitif ve Gram-negatif (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) suşlar ile klinik Stafilkok izolatları üzerinde antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Sonuçta ekstraktların Gram-pozitif bakterilere karşı farklı oranlarda antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (12 mm-19 mm). Gram-negatif bakterilerden ise sadece *C. violaceum* ATCC 12472 üzerinde antibakteriyel etkisi olduğu gözlenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri ise en düşük 1,01 mg/ml olarak tespit edilmiştir. HPLC analiz sonuçlarına göre de farklı oranlarda fenolik asit ve flavonoid (gallik asit, epikateşin, kateşin, rutin, p-hidroksi benzoik asit, p-kumarik asit, rosmarik asit) içerdiği tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ceviz ara kabuk, fenolik, HPLC, antibakteriyel

### 1. Giriş

Bakterilerde artan antibiyotik direnci, enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede başarısızlığın başlıca nedenlerinden biridir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların önemli bir kısmında mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni enfeksiyonlardır (Taşova, 2003). İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalığın bitkiler kullanılarak tedavi edilmesi mikroorganizmalarla mücadelede de sıklıkla başvurulan bir çözüm yolu olmuş ve günümüzde artan antibiyotik direnci bitkilerle tedavi seçeneğinin umut vaat eden bir strateji olarak görülmesine neden olmuştur. Dünyanın her yerinde yetişen

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902462110329; Fax.: +902462110329; E-mail: ebruonem@sdu.edu.tr

birçok bitkinin kök, gövde, yaprak, çiçek, kabuk, meyve gibi dokuları antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir. Ceviz (*Juglans regia* L.), de *Juglans* cinsine ait bir bitki olup, başta Çin, ABD ve İran olmak üzere dünya genelinde yaygın olarak yetişmekte ve bu ülkelerden sonra en fazla ceviz üretimi ülkemizde gerçekleşmektedir (Bayazit vd., 2016; Kadiroğlu ve Ekici, 2018). Ceviz çoğunlukla meyve olarak tüketilmekte olup, yeşil kabukları, yaprakları kozmetik ve ilaç sanayide etken madde, tekstilde ise boyar madde olarak kullanılmaktadır (Beiki et al., 2017). Geleneksel tedavide ise yeşil kabukları ya da yapraklarının özellikle venöz yetmezlik ve hemoroit semptomlarının giderilmesinde antidiyaretik, antihelmintik özelliklerinden yararlanıldığı bilinmektedir (Pereira et al., 2007). Ceviz bitkisinin farklı dokuları ile yapılmış birçok antibakteriyel aktivite çalışması olup, yapılan bir çalışmada ceviz ekstraktlarının kozmetik ürünler içerisinde kimyasal bazlı koruyucular yerine potansiyel doğal koruyu olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Beiki et al., 2017). Bitkilerin tedavi edici özellikleri yapılarında bulunan fitokimyasallar sayesinde olup, bu bileşenler ile antibakteriyel, antioksidan, antikanser ya da insan sağlığı için önem arz eden birçok özellik göstermektedirler. Bütün bitkiler sekonder metabolit olarak fenolik madde oluşturmaktadırlar (Karadeniz ve Ekşi, 2001). Fenolik bileşik terimi, fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere hidroksil grubu taşıyan aromatik halkaya sahip 8000'den fazla türü bulunduğu bilinen bir gruptur (Shi et al., 2003; Ignat et al., 2011; Özyaydın, 2013). Bitkilerde bulunan en önemli bileşenler arasında yer alan fenolik bileşenlerin makromoleküllerin oksidasyonunu inhibe ederek ya da oksidatif stresi azaltarak dejeneratif hastalık riskini azalttığı da bilinmektedir (Silva et al., 2004). Gram-pozitif bakteriler hem toplum hem de hastane kökenli infeksiyonların önemli nedenlerinden olup, dünya genelinde Gram-pozitif patojenlerde direnç hızı alarm verici ölçüde artmaktadır (Özkaya Şahin, 2003). Nozokomiyal enfeksiyonlarda özellikle *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* önemli olup, yapılan bu çalışmada ceviz ara kabuğunun metanol, etanol ekstraktlarının klinik Stafilokok izolatları ve referans Gram-pozitif, Gram-negatif suşlar üzerindeki antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. Yapılan literatür taramasında ceviz bitkisi ile yapılan antibakteriyel aktivite çalışmalarının genellikle ceviz yeşil kabuğunun kurutulması ve yaprak ekstraktları ile olduğu görülmüş, ceviz ara kabuğu ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 1.1. Bitki örnekleri ve ekstraksiyon

Çalışmada kullanılan cevizler Isparta yöresine ait olup ticari olarak temin edilmiştir. Kuru olan cevizlerin iki ceviz parçasını birbirinden ayıran iç kabukları çıkartılmış ve blender (Waring 8011 EB) yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz materyalden 5 gr tartılarak 50 ml çözücü (Metanol, Etanol) eklenmiştir. Çözücü-toz karışımı ultrasonik banyoda 30 dakika ekstrakte edilmiş ve kaba filtre kâğıdı ile süzülükten sonra 40-45°C'de rotary evaporatör (Heidolph Hei-Vap Rotary Evaporator) kullanılarak çözücüler uzaklaştırılmıştır. İşlem sonunda balon içerisinde kalan bitki özütü tartılarak kaydedilmiş ve Dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözümlenerek alınmıştır.

### 2.2. HPLC-DAD analizi

Ceviz iç kabuğu ile hazırlanan ekstraktlar HPLC analizinde Gomes vd. (1999)'nin kullandığı metot üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Literatürdeki mobil faz A'da % 2 asetik asit kullanılmış olup, bu çalışmada % 3 asetik asit kullanılmıştır. Ayrıca literatürde 1 mL/dk olan akış hızını 0.8 mL/dk'ya düşürülmüştür. Çalışmada 23 adet fenolik bileşeni 90 dakikalık bir gradiyent program ile ayırım yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen meyvelerin fenolik bileşiklerinin tespiti Photo Diode Array dedektörde 278 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 4.6 mm) 5 µm kolon kullanılmıştır.

Tablo 1. HPLC çalışma koşulları

|  | Süre (dk) | A (%) | B (%) |
|--|-----------|-------|-------|
| Dedektör: Photo Diode Array dedektör (λ <sub>max</sub> =278nm) | 0         | 93    | 7     |
| Auto sampler: SIL-10AD vp                                      | 20        | 72    | 28    |
| Sistem kontrol: SCL-10Avp                                      | 28        | 75    | 25    |
| Pompa: LC-10ADvp   | 35        | 70    | 30    |
| Degaser: DGU- 14A  | 50        | 70    | 30    |
| Kolon fırını: CTO-10Avp  | 60        | 67    | 33    |
| Kolon: Agilent Eclipse XDB C-18 (250x4,6 mm) 5 µm              | 62        | 58    | 42    |
| Kolon sıcaklığı: 30 °C   | 70        | 50    | 50    |
| Mobil faz: A = Su / asetik asit (97/3: v/v) pH:2,2             | 73        | 30    | 70    |
| B = Metanol  | 75        | 20    | 80    |
| Akış hızı: 0,8 mL/dak  | 80        | 0     | 100   |
| Enjeksiyon hacmi: 20 µL  | 81        | 93    | 7     |

Ters faz kolonu olarak Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 4.6 mm) 5 µm kolon kullanılmış; ayırım, ikili çözücü sistemiyle gradient program uygulanarak yapılmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra bir süre ultrasonik banyoda bekletilerek içlerindeki hava kabarcıklarının uzaklaşması sağlanmış, gradient program bittikten sonra kolonu dengeye getirmek amacıyla kolondan 10 dakika mobil faz geçirilmiştir.

### 2.3. Bakteriyel suşlar ve antibakteriyel aktivite

Çalışmada farklı servislerden kan, balgam, yara, kulak örneklerinden izole edilen ve daha önce konvensiyonel yöntemlerle tiplendirilmiş, Eczacılık Fakültesi bakteri stoğunda yer alan *S. aureus* (6), *S. epidermidis* (3) ve *S. hominis* (5) suşları ile standart *B. cereus* ATCC 11778, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *MRSA* ATCC 43300, *C.violeciium* ATCC 12472, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1 suşları kullanılmıştır. Ceviz ara kabuk ekstraktlarının antibakteriyel etkileri agar kuyucuk yöntemi kullanılarak test edilmiştir (Holder and Boyce, 1994). Luria-Bertani besiyerinde 37 °C’de bir gece süreyle üretilen bakteriler, ertesi gün 0,5 McFarland bulanık değerine göre süspansiyonlar hazırlanmıştır. 5 ml soft agar (%0,5 agar) içerisine 100 µl 0,5 McFarland bulanıklıkta hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan eklenerek petrilere hazırlanmış olan Mülller-Hinton agar besiyeri üzerine dökülmüştür. Bir süre kurumaya bırakılan besiyerleri üzerinde 6 mm çapında cam pipet yardımı ile kuyucuklar açılmış ve kuyucuklar içerisine 100 µl bitki ekstraktları eklenmiştir. 35°C’de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek antibakteriyel aktivite belirlenmiştir.

### 2.4. İstatistiksel analiz

Deneyler tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekrarlı yürütülmüş olup, elde edilen veriler JMP 8 paket istatistik programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. İstatistiksel farklılıklar LSD çoklu karşılaştırma testi ile harflendirilmiştir.

## 3. Bulgular

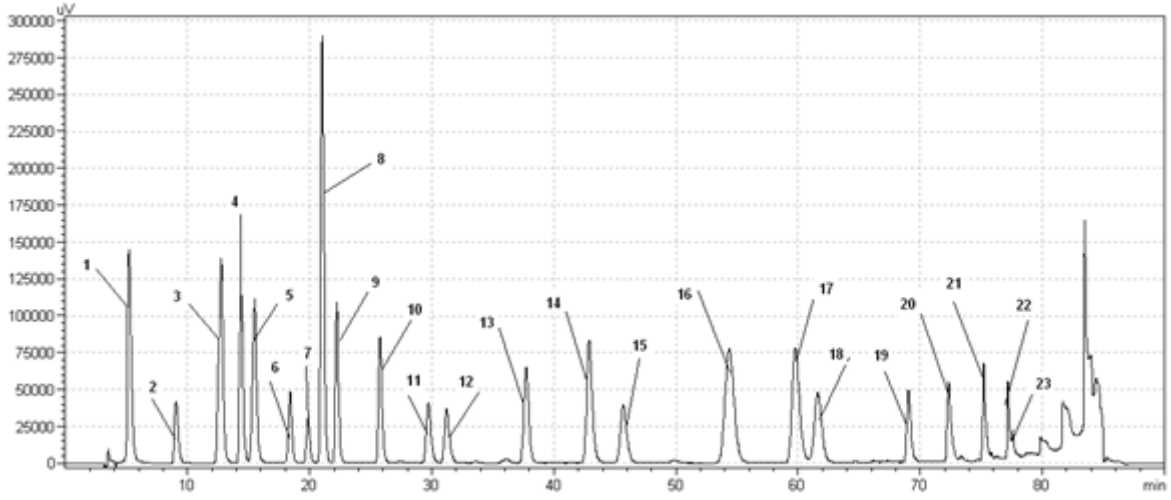
### 3.1. Fenolik bileşen

Metanol ve etanol ile hazırlanan ceviz ara kabuk ekstraktlarında HPLC analizi sonuçlarına göre varlığı araştırılan 23 fenolik bileşen Tablo 2’de verilmiş olup, tespit edilen fenolik asit (gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksi benzoik asit, p-kumarik asit, rosmarinik asit) ve flavonol (kateşin, epikateşin, rutin) bileşenlerinin tamamının metanol ekstraktında daha fazla oranda olduğu saptanmıştır. Ayrıca fenolik asit standart kromatogramı ile ekstraktlara ait fenolik bileşen profilleri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3 de verilmiştir.

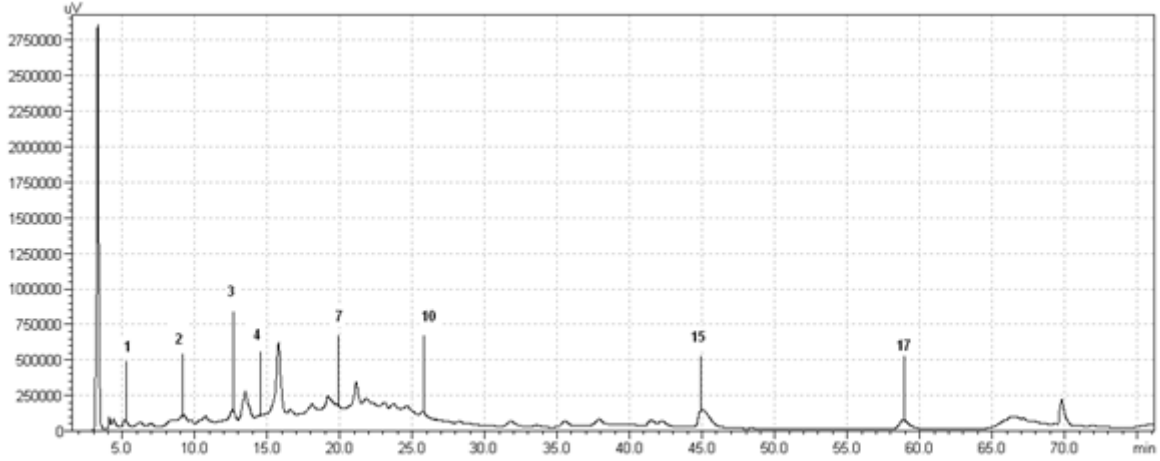
Tablo 2. Ceviz ara kabuk ekstraktları fenolik bileşen içerikleri

| İçerik                  | Etanol (µg.g <sup>-1</sup> ) | Metanol (µg.g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Fenolik asitler</b>  |                              |                               |
| gallik asit             | 5,2                          | 16,1                          |
| protokateşik asit       | 29,6                         | 56,4                          |
| p-hidroksi benzoik asit | 19,9                         | 27,3                          |
| klorojenik asit         | *                            | *                             |
| kafeik asit             | *                            | *                             |
| şiringikasit            | *                            | *                             |
| vanilin                 | *                            | *                             |
| p-kumarik asit          | 5,5                          | 10,7                          |
| ferulik asit            | *                            | *                             |
| sinapinik asit          | *                            | *                             |
| benzoik asit            | *                            | *                             |
| o-kumarik asit          | *                            | *                             |
| rosmarinik asit         | 193,3                        | 339,2                         |
| sinnamik asit           | *                            | *                             |
| <b>Flavonoller</b>      |                              |                               |
| kateşin                 | 94,4                         | 201,4                         |
| epikateşin              | 98,1                         | 181,2                         |
| rutin                   | 88,3                         | 158,7                         |
| hesperidin              | *                            | *                             |
| eriodiktiol             | *                            | *                             |
| quercetin.2H2O          | *                            | *                             |
| luteolin                | *                            | *                             |
| kamferol                | *                            | *                             |
| apigenin                | *                            | *                             |

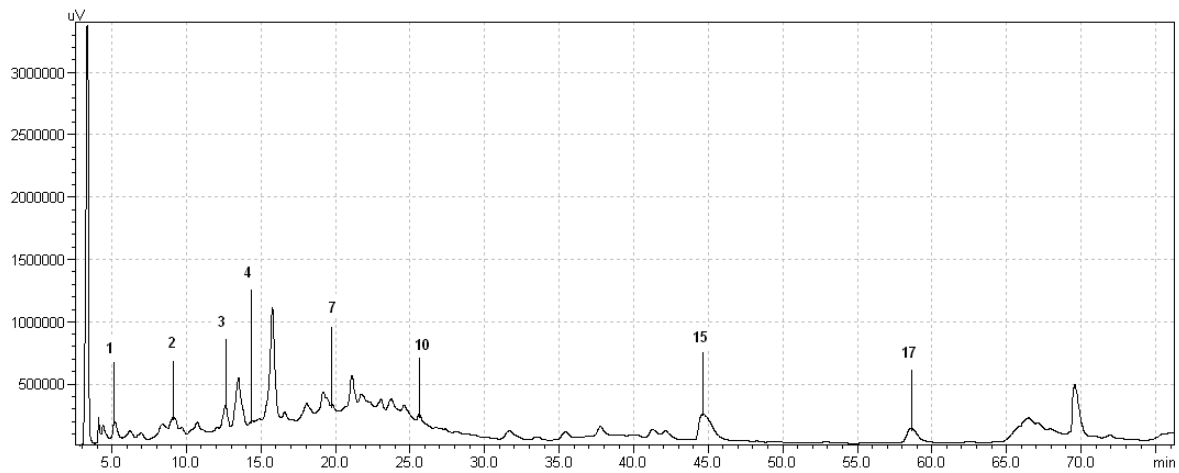
\* tespit edilmedi



Şekil 1. Fenolik bileşen standart kromatogramı. Standartlar: 1. Gallik asit 2. Protokateşik asit 3. Kateşin 4. p-hidroksi benzoik asit 5. Klorojenik asit 6. Kafeik asit 7. Epikateşin 8. Şiringiç asit 9. Vanilin 10. p-Kumarik asit 11. Ferulik asit 12. Sinapinik asit 13. Benzoik asit 14. o- kumarik asit 15. Rutin 16. Hesperidin 17. Rosmarinik asit 18. Eriodiktiol 19. Sinamik asit 20. Quersetin 21. Luteolin 22. Kamferol 23. Apigenin.



Şekil 2. Ceviz ara kabuk etanol ekstraktına ait fenolik bileşen kromatogramı. 1. Gallik asit 2. Protokateşik asit 3. Kateşin 4. p-hidroksi benzoik asit 7. Epikateşin 10. p-Kumarik asit 15. Rutin 17. Rosmarinik asit.



Şekil 3. Ceviz ara kabuk etanol ekstraktına ait fenolik bileşen kromatogramı. 1. Gallik asit 2. Protokateşik asit 3. Kateşin 4. p-hidroksi benzoik asit 7. Epikateşin 10. p-Kumarik asit 15. Rutin 17. Rosmarinik asit.

## 3.2. Antibakteriyel aktivite

Ceviz ekstraktlarının antibakteriyel etkileri agar kuyucuk yöntemi ile üç tekrarlı olarak test edilmiştir. Elde edilen verilere göre referans suşlar üzerinde her iki ekstrakt farklı oranlarda antibakteriyel etki gösterirken Gram-negatif suşlardan ise sadece *C. violaceum* ATCC 12472 antibakteriyel etki gözlenmiştir (Tablo 3). Ekstraktların bakteriler üzerindeki MIC değerleri Tablo 4 de verilmiş olup, en düşük MIC değeri etanol ekstraktında 1,01 mg/ml olarak tespit edilmiş ve MRSA ve *B. cereus* suşları üzerinde etkili olmuştur.

Tablo 3. Ekstraktların referans suşlar üzerinde antibakteriyel etkisi

|                | <i>S. aureus</i> (G+)<br>ATCC 25923    | MRSA (G+)<br>ATCC 43300           | <i>B. cereus</i> (G+)<br>ATCC 11778     | <i>E. faecalis</i> (G+)<br>ATCC 29212 |
|----------------|--|-----------------------------------|---|---------------------------------------|
| CN (100 µg/ml) | 15,3 c**                               | 15,3 b**                          | 19,7 a**                                | 15,0 a**                              |
| EtOH           | 17,3 b                                 | 17,0 a                            | 16,7 b                                  | 12,0 b                                |
| MeOH           | 19,7 a                                 | 16,0 b                            | 16,7 b                                  | 12,3 b                                |
|                | <i>C. violaceum</i> (G-)<br>ATCC 12472 | <i>E. coli</i> (G-)<br>ATCC 25922 | <i>P. aeruginosa</i> (G-)<br>ATCC 27853 | <i>P. aeruginosa</i> (G-)<br>PAO1     |
| CN (100 µg/ml) | 13,7 <i>öd</i>                         | <i>Ed</i>                         | <i>Ed</i>                               | <i>Ed</i>                             |
| EtOH           | 13,7                                   | <i>Ed</i>                         | <i>Ed</i>                               | <i>Ed</i>                             |
| MeOH           | 15,0                                   | <i>Ed</i>                         | <i>Ed</i>                               | <i>Ed</i>                             |

CN: gentamisin. Aynı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir (\*\*p<0,01). *Öd*; önemli olmayan istatistiksel farklılığı göstermektedir. *Ed*; etkili değil.

Tablo 4. MIC değerleri (mg/ml)

|      | <i>S. aureus</i> (G+)<br>ATCC 25923 | MRSA (G+)<br>ATCC 43300 | <i>B. cereus</i> (G+)<br>ATCC 11778 | <i>E. faecalis</i> (G+)<br>ATCC 29212 | <i>C. violaceum</i> (G-)<br>ATCC 12472 |
|------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| EtOH | 2,125                               | 1,01                    | 1,22                                | 2,125                                 | 2,125                                  |
| MeOH | 1,22                                | 1,22                    | 1,22                                | 1,22                                  | 1,22                                   |

Tablo 5. Ceviz ara kabuk etanol ve metanol ekstraktlarının *S. epidermis* klinik izolatları üzerine antibakteriyel etkisi

|                | Örnek yeri | Klinik İzolat | İnhibisyon zon çapı (mm) |
|----------------|------------|---------------|--------------------------|
| CN (100 µg/ml) | kan        | 5196          | 16,3 ab*                 |
|                | kan        | 7445          | 17,0 a                   |
|                | kan        | 8461          | 15,3 b                   |
| EtOH           | kan        | 5196          | 13,0 c                   |
|                | kan        | 7445          | 16,3 ab                  |
|                | kan        | 8461          | 13,7 c                   |
| MeOH           | kan        | 5196          | 13,0 c                   |
|                | kan        | 7445          | 17,0 a                   |
|                | kan        | 8461          | 13,0 c                   |

CN: gentamisin. Aynı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir (\*p<0,05). Harflendirme çözücü\*klinik izolat interaksyonu karşılaştırmasını göstermektedir.

Metanol ve etanol ekstraktlarının klinik izolatlar üzerindeki antibakteriyel etkilerine bakıldığında *S. epidermis* izolatları üzerinde pozitif kontrol ile kıyaslandığında aynı oranda antibakteriyel etki gösterdikleri bazı suşlarda ise kontrole göre etkinliklerinin daha az olduğu görülmüştür (Tablo 5).

Metanol ceviz ekstraktının farklı dokulardan izole edilen *S. hominis* izolatları üzerine etkisi sonucu oluşan zon çapları 16 mm ile 19 mm arasında değişkenlik göstermiş olup, benzer sonuçlar etanol ile de elde edilmiş ve bulunan bu sonuçların pozitif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan da anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6). Benzer sonuçlar *S. aureus* izolatları üzerinde elde edilmiş olup her iki ekstraktın klinik izolatlar üzerinde gösterdiği antibakteriyel etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 6. Ceviz ara kabuk metanol etanol ekstraktlarının *S. hominis* klinik izolatları üzerine antibakteriyel etkisi

|                | Örnek yeri | Klinik İzolat | İnhibisyon zon çapı (mm) |
|----------------|------------|---------------|--------------------------|
| CN (100 µg/ml) | kan        | 801           | 17,3 c-e**               |
|                | kan        | 6858          | 14,7 gh                  |
|                | kan        | 7524          | 14,3 h                   |
|                | kan        | 8460          | 15,7 f-h                 |
|                | kan        | 9558          | 15,7 f-h                 |
| EtOH           | kan        | 801           | 19,0 ab                  |
|                | kan        | 6858          | 17,3 c-e                 |
|                | kan        | 7524          | 19,0 ab                  |
|                | kan        | 8460          | 18,3 a-c                 |
|                | kan        | 9558          | 16,3 d-f                 |
| MeOH           | kan        | 801           | 19,0 ab                  |
|                | kan        | 6858          | 17,7 b-d                 |
|                | kan        | 7524          | 19,7 a                   |
|                | kan        | 8460          | 19,0 ab                  |
|                | kan        | 9558          | 16,0 e-g                 |

CN: gentamisin. Aynı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir (\*\*p<0,01). Harflendirme çözücü\* klinik izolat interaksyonu karşılaştırmasını göstermektedir.

Tablo 7. Ceviz ara kabuk metanol etanol ekstraktlarının *S. aureus* klinik izolatları üzerine antibakteriyel etkisi

|                | Örnek yeri | Klinik İzolat | İnhibisyon zon çapı (mm) |
|----------------|------------|---------------|--------------------------|
| CN (100 µg/ml) | yara       | 1277          | 14,3 de**                |
|                | balgam     | 5366          | 17,3 ab                  |
|                | kan        | 5914          | 15,3 c-e                 |
|                | kan        | 5916          | 15,0 de                  |
|                | kulak      | 7095          | 14,3 de                  |
|                | yara       | 9428          | 16,0 a-d                 |
| EtOH           | yara       | 1277          | 15,0 de                  |
|                | balgam     | 5366          | 15,3 c-e                 |
|                | kan        | 5914          | 17,7 a                   |
|                | kan        | 5916          | 17,0 a-c                 |
|                | kulak      | 7095          | 16,0 a-d                 |
|                | yara       | 9428          | 14,0 e                   |
| MeOH           | yara       | 1277          | 15,7 b-e                 |
|                | balgam     | 5366          | 15,7 b-e                 |
|                | kan        | 5914          | 17,3 ab                  |
|                | kan        | 5916          | 17,0 a-c                 |
|                | kulak      | 7095          | 15,7 b-e                 |
|                | yara       | 9428          | 14,0 e                   |

CN: gentamisin. Aynı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir (\*\*p<0,01). Harflendirme çözücü\* klinik izolat interaksyonu karşılaştırmasını göstermektedir..

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Bitkiler geleneksel tedavi yöntemlerinde sıklıkla kullanılmakta olup, bunun yanı sıra içerdikleri etken maddeler ile kozmetik ve ilaç sektöründe de aktif olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında yoğun olarak kullanılan bitkilerin içerdikleri fitokimyasalların tespiti de bu çalışmalara eşlik etmektedir. Yapılan bu çalışma ile ceviz ara kabukları farklı çözücüler kullanılarak ekstrakte edilmiş ve Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Ayrıca metanol ve etanol ekstraktlarında HPLC analizi ile 23 farklı fenolik bileşenin varlığı araştırılmıştır (Tablo 1). Etanol ekstraktının fenolik madde içeriğine bakıldığında, gallik asit, protokateşik asit, kateşin, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, şiringic asit, vanilin ve p-kumarik asit içerdiği görülmüştür. En yüksek bileşen rosmarinik asit olup 193,3µg/ml olarak tespit edilmiş bunu sırasıyla epikateşin (98,1 µg/ml), kateşin (94,4 µg/ml) ve rutin (88,3 µg/ml) izlemiştir. Metanol ekstraktında ise aynı bileşenler tespit edilmiş olup oranlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Rosmarinik asit en yüksek oranda tespit edilirken kateşin, epikateşin, rutin sırasıyla 339,2 µg/ml, 201,4 µg/ml, 181,2 µg/ml, 158,7 µg/ml olarak bulunmuştur (Tablo 2). Ceviz bitkisi zengin fenolik içeriğe sahip olup, yeşil ceviz meyvesi ile yapılan bir çalışmada, etanol-su ekstraktında farklı miktarlarda 17 fenolik

bileşen tespit edilmiş, bu bileşenler içerisinde kateşin oranının çok yüksek (530.80 mgGAE/L) olduğu tespit edilmiştir (Cosmulesco et al., 2014).

Ceviz yaprak ekstresi ile yapılan bir çalışmada ise kuersetin türevleri hisperosin, isokuersetin, avikularin, kafeik asit türevleri (klorojenik ve neoklorojenik asit, ayrıca apigenin türevleri isovitexin ve juglanin tespit edilmiştir (Pirvu et al., 2011). Bitki materyallerinden fenolik bileşenlerin etkili ekstraksiyonu doğru yöntem, bileşenlerin yapısı ve kullanılan çözücüye de bağlıdır. Bitkilerdeki polifenoller genellikle polar çözücülerde daha etkin elde edilmekte olup bu amaçla etanol, metanol, aseton ya da etil asetatın sulu çözeltileri tercih edilmektedir (Do et al., 2014). Ceviz ara kabuğunun metanol ve etanol ekstraktlarının fenolik içeriğine bakılan bu çalışmada, metanol ile hazırlanan ekstraktta tespit edilen fenolik madde miktarının daha fazla olduğu fakat her iki çözücü ile elde edilen bileşenlerin aynı olduğu gözlenmiştir. Yeşil ceviz meyvesi fenolik madde içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada ise iki farklı tür ceviz de metanol ve etanol ile hazırlanan ekstraktlarda gallik asit, klorojenik asit, protokateşik asit ve kateşin tespit edilmiş olup, fenolik madde miktarları bu çalışma ile paralel sonuç göstermiş ve metanol ekstraktında elde edilen fenolik içeriğin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Jakopič et al., 2009).

Oral enfeksiyon etkeni bakterilerle yapılan bir çalışmada ceviz kabuğu etanol ve su ekstraktının antibakteriyel etkisi araştırılmış, çalışılan *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde etanol ekstraktının antibakteriyel etkisinin suya göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Zakavi et al., 2013). Ceviz yapraklarının etanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada en fazla antibakteriyel etki Gram-pozitif *S. epidermidis* üzerinde gözlenirken Gram negatif *P. aeruginosa* ATCC 9027 üzerinde de antibakteriyel etki gözlenmiş, *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde ise antibakteriyel etki görülmemiştir (Nicu et al., 2018). Bitkilerin bakteriler üzerinde gösterdikleri bakterisit etkileri içerdikleri flavonoidler sayesinde birçok etki mekanizması ile olup bunlardan birinin nükleik asit biyosentezini inhibe ederek ya da farklı moleküler proseslerle gerçekleştiği bilinmektedir (Baba and Malik, 2015; Cushnie and Lamb, 2005). Fenolik bileşenler antimikrobiyal etkilerini genellikle membran seviyesinde göstermektedirler. Örneğin fenol, hücre zarı fonksiyonlarını değiştirerek, protein yağ oranını etki etmekte ve potasyum iyonlarının dışarı akışını teşvik etmektedir. Yine kateşinler ve epigallokateşin gallat, lipid tabakasını etkileyerek membranın parçalanmasına neden olmakta ve hücre bütünlüğü bozulan hücrenin ölüme sonuçlanmasına neden olmaktadır (Keweloh et al., 1990; Heipieper et al., 1991; Hashimoto et al., 1999; Yücel Şengün and Yücel, 2015).

İdrar yolu enfeksiyonu etkeni farklı türler ile yapılan bir çalışmada ceviz hekzan ekstraktının Gram-negatif *E. coli* (22 mm) ve *P. aeruginosa* (12 mm), *K. pneumonia* (16 mm) bakterileri üzerinde de antibakteriyel etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Allaie et al., 2018). Ceviz yapraklarının etanol-su ile hazırlanan ekstresi ile yapılan bir başka çalışmada ise *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca Gram-negatif *E. coli* üzerinde de aynı etkiyi görmüşlerdir (Saltan Çitoğlu and Altanlar, 2003). Ceviz yeşil kabuk ve yapraklarının metanol ve su ekstraktları ile yapılan bir çalışmada ise her iki bitki kısmının metanol ekstraktının su ekstraktına oranla *S. aureus* üzerinde daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Yiğit vd., 2009). İran’da yetişen bir ceviz türünün endokarp ve ekzokarp dokularının ekstraksiyonu ile yapılan bir çalışmada ise *S. aureus* üzerinde metanol ekstraktının sırasıyla 25 mg/ml ve 50 mg/ml MIC değerleri ile antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur (Moghaddam et al., 2017). Yapılan bu çalışmada ise metanol ekstresi MIC değeri antibakteriyel etki görülen tüm bakteriler için 1,22 mg/ml olarak bulunmuştur. Bitki ekstraktları ile yapılan birçok çalışmada Gram-pozitif bakterilerin Gram-negatif bakterilere oranla daha hassas oldukları, bitki bileşenlerinin Gram-pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durumun bakteriler arasındaki hücre duvar yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı ve Gram negatif bakterilerin dış membranının hidrofobik bileşiklere karşı koruyucu bir bariyer geliştirmesinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Puupponen-Pimia et al., 2001; Erdoğan, ve Everest, 2013).

Ceviz kabuklarının etanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada ise *S. aureus* ATCC 6538, üzerine antibakteriyel etkisinin çok düşük olduğu gözlenmiştir (Kale et al., 2011). Antibakteriyel aktivite çalışmalarında aynı bitkilerle yapılan çalışma sonuçları arasındaki farklılık kullanılan çözücülerden başka bitkinin yetiştirildiği coğrafya ve iklim koşullarına bağlı olarak yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin çeşit ve miktarının farklı olmasında kaynaklanmaktadır (Koohsari et al., 2015).

Yapılan bu çalışma ile ceviz ara kabuğunun fitokimyasal içeriği ve bazı bakteriler üzerindeki antibakteriyel özelliği araştırılmış olup, ceviz yaprak, yeşil dış kabuk, kuru iç kabuk ve meyvesinde olduğu gibi ara kabuğunda da birçok faydalı bileşenin olduğu tespit edilmiştir. Metanol ve etanol çözücülerini ile ekstrakte edilen ara kabukların farklı servislerden izole edilen klinik stafilokok izolatları ile referans suşlar üzerinde de antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda besin olarak tüketilmeyen bu kısımların sahip oldukları diğer bileşenlerin varlığı aydınlatılmaya çalışılabilir ve farklı mikroorganizma türleri ile de antimikrobiyal etkinlikleri araştırılabilir. Ayrıca bundan sonraki çalışmalarda in vivo etkinlikleri araştırılarak bazı sentetik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılması düşünülebilir.

## Kaynaklar

- Allaie, A.H., Mishra, R.P., Ganaie, A. A., Ali, S., Singh, R. (2018). Antibacterial activity of hexane extract of *Juglans regia* against some clinical isolates of urinary tract infection. *International Journal of Biology Research*, 3(2), 64-67
- Baba, S.A., Malik, S.A. (2015). Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J Taibah Univ Sci.*, 9,449–454.

- Bayazit, S., Tefek, H., Çalışkan, O. (2016). Türkiye’de ceviz (*Juglans regia* L.) araştırmaları. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11(1), 169-179.
- Beiki, T., Ghasem D. Najafpour, G.D., Hosseini, M. (2017). Evaluation of antimicrobial and dyeing properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract for cosmetics. Society of Dyers and Colourists, Color. Technol., 134, 71–81.
- Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M., Tutulescu, F. Phenolics Content, Antioxidant Activity and Color of Green Walnut Extracts for Preparing Walnut Liqueur. Not Bot Horti Agrobo, 2014, 42(2):551-555.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents, 26, 343-356. 17. Jakopič, J., Veberič, R., Štampar, F. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. Acta agriculturae Slovenica, 93(1), 11 – 15.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. Journal of Food and Drug Analysis, 22, 296–302.
- Erdoğan, E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 6 (2), 27-32.
- Gomes, T., Caponio, F., Alloggio, V. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. Food Chemistry, 64, 203-209.
- Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y., Nakayama, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63, 2252-2255.
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., Rehm, H.J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1213-1217.
- Holder I.A., Boyce S.T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. Burns, 20 (5), 426-429.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126(4), 1821–1835.
- Jakopič, J., Veberič, R., Štampar, F. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. Acta agriculturae Slovenica, 93(1), 11 – 15.
- Kadiroğlu, P., Ekici, H. (2018). Yeşil Ceviz Kabuklarının biyoaktif özelliklerinin FT-IR spektroskopisi yöntemiyle tahmin edilmesi. Akademik Gıda, 16(1), 20-26.
- Kale, A. A., Pawar, A. B., Deshpande, N. R., Salvekar, J. P. (2011). Antimicrobial activity study of *Juglans regia* L. Journal of Pharmacy Research, 4(2),331-332.
- Karadeniz, F., Ekşi, A. (2001). Elma suyunda fenolik madde dağılımı üzerine araştırma. Tarım Bilimleri Dergisi, 7(4),102-105.
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H.N. (1990). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 33, 66-71.
- Koohsari, H., Ghaemi, E.A., Sadegh Sheshpoli, M., Jahedi, M., Zahiri, M. (2015). The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. J Med Life., 8(Spec Iss 2), 38–42.
- Moghaddam, P.Z., Mohammadi, A., Feyzi, P., Alesheikh, P. (2017). *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of various extracts from exocarps and endocarps of walnut. Pak. J. Pharm. Sci., 30(5), 1725-1731
- Nicu, A.I., Pîrvu, L., Stoian, G., Vamanu, A. (2018). Antibacterial activity of ethanolic extracts from *Fagus sylvatica* L. and *Juglans regia* L. leaves. Farmacia, 66(3), 483-486.
- Özaydın A. (2013). Farklı kurutma koşullarının bazı önemli armut çeşitlerinin aroma, fenolik madde ve diğer kalite bileşenleri üzerine etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 181s, Isparta.
- Özkaya Şahin, G. (2003). Gram pozitif kok enfeksiyonları: Sorunlar ve Çözümler. 11-21, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valenta, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45, 2287–2295.
- Pîrvu, L., Barbulescu, D., Nichita, C., Nita, S., Colceru Mihul, S. (2011). Obtaining and chemical characterization of some vegetal extracts with corrosion-scaling inhibition properties. Part II. Juglandis folium and Agrimoniae herba extracts. Rom Biotechnol Lett., 6(1), 5937-5944.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial Properties of Phenolic Compounds From Berries. Journal Of Applied Microbiology. 90, 494-507.
- Saltan Çitoğlu, G., Altanlar, N. (2003). Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. Ankara Ecz. Fak. Derg., 32 (3), 159-163.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y. (2003). Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. Journal of Medicinal Food, 6(4), 291-299.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valenta, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4705–4712.
- Taşova, Y. (2003). İmmunosupresif Hastalarda Gelişen İnfeksiyonlar: Sık Rastlanan Gram-pozitif Kok Enfeksiyonları. 27-43, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., Özgen, U. (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.)’in antimikrobiyal aktivitesi. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg., 39(1-2),7-11.
- Yücel Şengün, İ., Yücel, E. (2015). Antimicrobial properties of wild fruits. Biological Diversity and Conservation, 8(1), 69-77.
- Zakavi, F., Golpasand Hagh, L., Daraeighadikolaei, A., Farajzadeh Sheikh, A., Daraeighadikolaei, A., Leilavi Shooshtari, Z. (2013). Antibacterial effect of *Juglans regia* bark against oral pathologic bacteria. Int J Dent. 2013; 2013:854765; doi:10.1155/2013/854765.

(Received for publication 10 October 2018; The date of publication 15 December 2018)