



Fatty Acids, Bioactive Content and Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* L. Extract Obtained by Different Techniques

Nazan Çömlekciöğlü^{1,a,*}, Ashabil Aygan^{1,b}

¹Department of Biology, Faculty of Science and Letters, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, 46050 Kahramanmaraş, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 22/10/2020 Accepted : 23/11/2020</p> <p>Keywords: Antimicrobial activity Antioxidant activity GC-MS <i>Hibiscus sabdariffa</i> Fatty acids</p>	<p><i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Hibiskus) is a plant that belongs to the Malvaceae family and is a rich source of anthocyanins and other bioactive compounds. In this study, the total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activities of commercially supplied <i>Hibiscus sabdariffa</i> calyx extracts obtained by two different extractors (soxhlete and ultrasonic bath) were investigated. In addition, fatty acids were analysed by GC-MS analysis, 14 different fatty acids were determined and the major fatty acid components of extracts obtained from plant calyxes were palmitic acid (15.25%) and oleic acid (32.18%) and linoleic acid (30.77%). The ultrasonic bath was found to be more effective to reveal the bioactive contents of the extracts than the soxhlete. Total phenolic content and flavonoid values of plant calyx extracts (USB) were 23.29 and 3.08 mg ml⁻¹, respectively, and FRAP and IC₅₀ (% DPPH) values were 47.54 µg g⁻¹ and 0.61 mg ml⁻¹, respectively. Antimicrobial activity experiment carried out with total of 9 microorganisms consisting of seven bacteria and two yeast showed that <i>H. sabdariffa</i> extracts had dose-dependent inhibition on test microorganisms but <i>S. cerevisia</i>.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(12): 2723-2728, 2020

Farklı Tekniklerle Elde Edilen *Hibiscus sabdariffa* L. Özütünün Yağ Asitleri, Biyoaktif İçeriği ve Antimikrobiyal Aktivitesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 22/10/2020 Kabul : 23/11/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite Antioksidan aktivite GC-MS <i>Hibiscus sabdariffa</i> Yağ asitleri</p>	<p><i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (Hibiskus), Malvaceae familyasına ait, zengin bir antosiyanin ve biyoaktif bileşik kaynağı olan bir bitkidir. Genellikle geleneksel tıpta kullanılır, fakat modern tedaviye ait kullanımlarda da muazzam bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmada, ticari olarak temin edilen Hibiskus bitkisinden iki farklı yöntemle (soksalet ve ultrasonik banyo kullanılarak) elde edilen özütlerin, toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ayrıca özütlerin GC-MS analizi sonucunda 14 farklı yağ asidi tanımlanmış olup, başlıca yağ asidi bileşenleri palmitik asit (%15,25) ve oleik asit (%32,18) ve linoleik asitten (%30,77) oluşmaktadır. Bu çalışmada ultrasonik banyonun (USB) soksalete göre özütlerin biyoaktif içeriklerini ortaya çıkarmada daha etkili olduğu görülmüştür. Bitki kaliks özütlerinin USB toplam fenolik içerik ve flavonoid değerleri sırasıyla 23,29 ve 3,08 mg ml⁻¹, FRAP ve IC₅₀ (%DPPH) değerleri sırasıyla 47,54 µg g⁻¹ ve 0,61 mg ml⁻¹ bulunmuştur. Dokuz mikroorganizma (yedi bakteri ve iki maya) üzerinde gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite denemeleri Hibiskus özütlerinin, <i>Saccharomyces cerevisia</i> dışındaki tüm organizmalar üzerinde doza bağlı olarak bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.</p>

^a noktem80@gmail.com

^b <http://orcid.org/0000-0001-7729-5271>

^b ashabil@ksu.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0003-4936-9872>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Bitkiler, insanoğlunun temel ihtiyacı olan gıda, giyecek, barınak ve ilaçları sağladıkları için insan hayatında önemli bir rol oynamaktadır (Sevindik ve ark., 2017). Gelişmekte olan ülkelerde, nüfusun büyük bir bölümünün temel sağlık gereksinimleri bitkilerden karşılanmaktadır (Mohammed ve ark., 2019). Geleneksel ilaçlar, ucuz olmaları, sağlık üzerinde daha az olumsuz etkiye sahip olmaları nedeniyle dünya nüfusunun çoğu için hala popülerliğini korumaktadır (Mohammed ve ark., 2020). Son yıllarda, çeşitli geleneksel sistemlerde kullanılan tıbbi bitkilerin muazzam potansiyellerini bulmak için bitki araştırmalarına odaklanma küresel olarak artmıştır (Pehlivan ve Sevindik, 2018). Çeşitli hastalıkların tedavisinde güçlü fitokimyasal ajanlar olarak kullanılabilir çeşitli şifalı bitkilerden biri de, *Hibiscus sabdariffa* L.'dir (Pehlivan ve ark., 2018; Riaz ve Chopra, 2018).

Çekici bir çiçeğe sahip olan Hibiskus, Hindistan, Malezya, Sudan, Mısır, Nijerya, Meksika, Suudi Arabistan, Tayvan, Batı Hint Adaları ve Orta Amerika gibi birçok ülkede yaygın olarak yetiştirilmektedir. Dünyadaki tropikal ve subtropikal bölgelerde 300'den fazla türü yayılış göstermektedir (İsmail ve ark., 2008). Hibiskus, Malvaceae ailesine aittir. Boyu 2-2,5 m'ye kadar büyüyen, tek yıllık veya çok yıllık odunsu bir bitkidir. Olgunlaşması yaklaşık altı ay sürmekte olup, yaklaşık 3 hafta boyunca meyvelerinin kaliksi için hasat edilmektedir (Naim ve Ahmed, 2010).

Hibiskus'un tedavisel bağlamda ana bileşenleri; polisakkaritler, organik asitler, antosiyaninler ve flavonoidlerdir (Mahadevan ve Kamboj, 2009). Organik asitler, biyoaktif bileşenler ile birlikte, serbest radikal temizleme aktivitesine sahiptir ve yararlı sağlık etkileri esas olarak bu biyoaktif moleküllere atfedilmektedir. Birçok çalışmada, kurutulmuş kalikslerin, güçlü antioksidan-antiradikal aktivitelerinin yanı sıra, anti-inflamatuar, antiobezite, antimikrobiyal, antikanser etkileri vurgulanmaktadır (Jabeur ve ark., 2017; Riaz ve Chopra, 2018; Jabeur ve ark., 2019; Ojulari ve ark., 2019).

Hibiskus bitkisinin çeşitli kısımları, geleneksel tıpta soğuk algınlığı, diş ağrısı, idrar yolu enfeksiyonları, ishal, dizanteri ve hipertansiyonu tedavi etmek; hazımsızlıktaki ağrıyı hafifletmek ve şişkinliği gidermek için kullanılmaktadır (Maganha ve ark., 2010). Kaliks infüzyonu (Sudan çayı), öksürüğü gidermek ve safrayı gidermek için alınır ve ayrıca vücut ısısını da dengeler (Leung ve Foster, 2010). İnfüzyon ayrıca karaciğer hastalığı, ateş, hiperkolesterolemi, hipertansiyon gibi rahatsızlıklarda tedavi etmek için, antispazmodik ve antimikrobiyal ajan olarak da kullanılmaktadır (Khalid ve ark., 2012). Bu çalışmanın amacı, Hibiskus'tan elde edilen özütlerin biyoaktif bileşen ve antioksidan aktivitelerinin yanı sıra antibakteriyel aktivitesini araştırmaktır. Ayrıca özütler, GC-MS yardımıyla analiz edilerek, yağ asidi profilleri çıkartılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan Hibiskus bitkisine ait örnekler ticari olarak eczanelerden temin edilmiştir. Kuru çiçek kaliksleri, laboratuvar blenderinde (Waring, Germany) öğütülerek toz haline getirilip, deneyde kullanılmak üzere ışık ve nemden korunarak cam şişelerde saklanmıştır.

Özütleme Prosedürü

Öğütülmüş bitki kalikslerinden biyoaktif içeriğin ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla etanol çözücüsüyle iki farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır (Jabeur ve ark., 2017). Birinci yöntemde; 20 g bitki örneği üzerine %80'lik 300 ml etanol (w/w) çözeltisi eklenerek, soksalet cihazında 65°C'de 6 saat ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen özütler 48°C vakumlu evaporatörde çözücü uzaklaştırılarak kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki materyali analize kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. İkinci yöntem olan USB (Ultrasonik Su Banyosu) ile ekstraksiyonda ise yine kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 20 g Hibiskus bitki örneği üzerine 300 ml etanol ile 30°C'de 1 saat USB cihazında ekstraksiyon işlemi yapılarak bitki içeriğinin ses dalgalarıyla su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Ekstraksiyon sonrası çözücü yine evaporatörde uzaklaştırılarak, kuru özüt elde edilmiş ve -20°C'de analize kadar saklanmıştır (Çömlekciöğlü, 2019).

Özütlerin Yağ İçeriği ve Yağ Asidi Kompozisyonunun Belirlenmesi

Soksalet yöntemiyle elde edilen yağ içerisindeki yağ asitlerinin analizi GC-MS ile Çömlekciöğlü (2019)'a göre yapılmıştır. GC-MS analizleri Schimadzu GC 2025 sistemi ® ile gerçekleştirilmiştir. TRCN-100 (60m×0.25 mm×0.20 µm film thickness) SE-54 silika kapiler kolon kullanılmıştır. Elektron enerjisi 70 eV'tur. Enjeksiyon miktarı 1 µl'dir. Numuneler 80°C'de 2 dakika bekletildikten sonra, dakikada 5°C artırılıp 140°C sıcaklığa ulaştıktan sonra, bu sıcaklıkta 2 dakika tutulmuştur. Bu işlemi takiben, dakikada 3°C'lik bir artışla 240°C'da 5 dakika daha bekletilmiştir. Toplam analiz süresi 61 dakika olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyonlar split modda (1:50) 240°C ısıda gerçekleştirilmiştir ve dedektör sıcaklığı 250°C'dir. Helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılmış olup, akış hızı 30 ml/dk'ya ayarlanmıştır. Kullanılan gaz akışları H₂ = 40 ml/dk ve kuru hava = 400 ml/dk olarak belirlenmiştir.

Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik içeriği, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak Obanda ve Owuor (1997)'in prosedürü modifiye edilerek tespit edilmiştir. Standart olarak 1 mg/ml olacak şekilde gallik asit ile stok solüsyon ve bu stok üzerinden dilüsyon serisi (10-25-50-75-100-250 µg/ml) hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda EZ 150, USA) 750 nm'de okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımıyla ($y = 0,010x + 0,403$; $R^2=0,992$) mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru örnek ağırlığı cinsinden verilmiştir.

Bitki özütlerindeki toplam flavonoid içeriği Chang ve ark. (2013)'na göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (25-200 µg/mL) yukarıdaki prosedüre göre hazırlanan quercetin solüsyonları yardımı ile standart eğri çizilmiş olup denklemi $y = 0,004x + 0,039$; $R^2=0,999$ 'dir. Absorbans 415 nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri µg quercetin eşdeğeri/g kuru örnek ağırlığına dönüştürülmüştür. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapılmıştır.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) metodu

Antioksidan aktivite (serbest radikallerin indirgenme kapasitesi) Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından tanımlanan DPPH metodu modifiye edilerek belirlenmiştir. Her bitki özütünden seyreltilen beş farklı konsantrasyonda solüsyon hazırlanmıştır. Sonuçlar, DPPH serbest radikallerinin %50'sini indirgemek için gereken konsantrasyon değeri olan IC₅₀ olarak gösterilmiştir. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) metodu

FRAP yöntemi Benzie ve Strain (1996)'a göre yapılmıştır. Bitki özütlerinden 50 µl, 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 600 µl FRAP ajanı eklenmiştir. FRAP ajanını oluşturan üç reaktif (Reaktif A: asetat buffer, Reaktif B: TPTZ solüsyonu, Reaktif C: ferrik klorit çözeltisi) taze olarak hazırlandıktan sonra, bu reaktiflerin kombinasyon ve inkübasyon aşamalarını takiben kullanılmıştır. Absorbans 593 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar askorbik asit (100-1000 µmol/L) kalibrasyon grafiği ($y = 1,69x + 0,147$; $R^2 = 0,99$) kullanılarak µmol askorbik asit eşdeğeri/g kuru bitki ağırlığı olarak hesaplanmıştır olup tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Ultrasonik su banyosunda elde edilen Hibiskus bitki özütlerinin antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan ve Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiş *Escherichia coli* ATCC 309628, *Sarcina lutea* ATCC 9341NA, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecalis*, *Proteus* sp. *Saccharomyces cerevisia* ve *Candida albicans* suşları kullanılmıştır. Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivite tayinleri oyuk agar (well-diffusion) yöntemi ile belirlenmiştir (NCCLS, 1993).

Mikroorganizmalar bir gün önceden LB (Luria-Bertani) ve Sabouraud dextrose broth besiyerlerine aşılansarak 0,5 Mcfarland standartında (1×10^8 bakteri ve $0,5 \times 10^6$ maya/mL) steril serum fizyolojik su ile sulandırılmıştır. Daha sonra 0,1 mL alınarak otoklavdan çıkarılan ve 50°C ye kadar soğutulan Müeller Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agara inoküle edildikten sonra petrilere dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılan petrilere, 4 mm çapında aseptik olarak oyuklar açılarak, DMSO içerisinde çözündürülmüş Hibiskus özütleri (n:16mg/ml) mikropipet yardımı ile 50 µl eklenmiştir. Petriler 30 dakika +4°C'de bekletildikten sonra, bakteri kültürleri 37°C'de bir gece, mantar aşılansan besiyerleri ise 30°C'de iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür (Çetin ve Gürler, 1989).

MIC (Minimal inhibisyon konsantrasyonu) değerlerinin belirlenmesi için, petri denemelerinde inhibisyon zonu gözlemlenen suşlar seçilmiştir. MİK belirlenmesi tüp dilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilerek Müeller Hinton Broth ve Sabouraud Dextrose Broth içerisinde gözlemlenebilir gelişmeyi önleyen tüplerdeki en düşük konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Çalışma 0,5-8 mg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

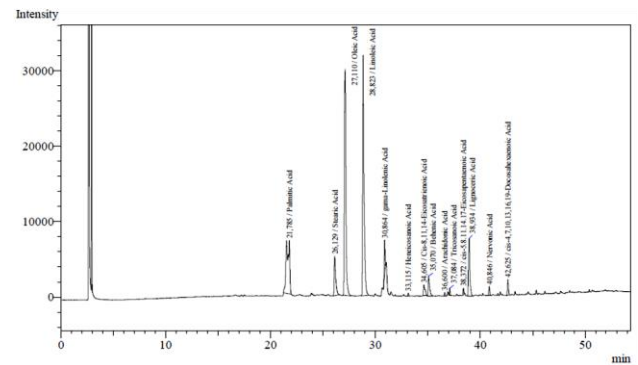
Bulgular ve Tartışma

Yağ Asidi Kompozisyonu

Özütün yağ asidi kompozisyonuna ait veriler Çizelge 1.'de ve GC-MS kromatogramı Şekil 1.'de verilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre Hibiskus özütlerinde, 6 tanesi doymuş 8 tanesi doymamış olmak üzere toplamda 14 adet yağ asidi tayin edilmiştir. Analize göre Hibiskus özütünün başlıca yağ asidi bileşenlerini palmitik asit (%15,25), oleik asit (%32,18) ve linoleik asit (%30,77) oluşturmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) en yüksek oranda bulunurken, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve doymuş yağ asitleri (SFA) ve benzer oranlarda tanımlanmıştır (Çizelge 1). Oleik (C18:1) ve linoleik asitler (C18:2) numunedeki ana yağ asitleridir ve sonuç olarak daha yüksek doymamış yağ asidi seviyelerine katkıda bulunur. PUFA'ların kalp damar hastalıkları ve kanserin önlenmesinde, obezite ve diyabetin engellenmesinde, anti-enflamatuar ve ateroskleroz, bağışıklık artırıcı özellikleriyle çoklu fizyolojik işlevler sergilediği bildirilmiştir (Pelliccia ve ark., 2013; Jabeur ve ark., 2017).

Çizelge 1. Hibiskus özütlerinin yağ asidi kompozisyonları (%)
Table 1. Fatty acid compositions of Hibiscus extracts (%)

Karbon Sayıları	Yağ Asitleri	Miktar (%)
1	C16:0 Palmitic Acid	15,25
2	C18:0 Stearic Acid	5,38
3	C21:0 Eicosenoic Acid	0,24
4	C22:0 Behenic Acid	2,52
5	C23:0 Tricosanoic Acid	0,39
6	C24:0 Lignoceric Acid	6,38
7	C18:1 Oleic Acid	32,18
8	C24:1 Nervonic Acid	0,75
9	C18:2 Linoleic Acid	30,77
10	C18:3 gama-Linolenic Acid	2,54
11	C20:3 Cis-8,11,14-Eicosatrienoic Acid	1,56
12	C20:4 Arachidonic Acid	0,22
13	C20:5 cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic Acid	0,48
14	C22:6 cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic Acid	1,34
Doymuş Yağ asidi Oranı (SFA)		30,16
Tekli Doymamış Yağ Asidi Oranı (MUFA)		32,93
Çoklu Doymamış Yağ Asidi Oranı (PUFA)		36,91



Şekil 1. Hibiskus özütlerinden elde edilen GC-MS kromatogramları

Figure 1. GC-MS chromatograms obtained from Hibiscus extracts

Literatürde Hibiskus'un tohum yağ asidi profili ile ilgili pek çok çalışma varken, aslında gıda olarak kullanılan kaliksler üzerinde çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalar da oleik-linoleik-palmitik asitlerin Hibiskus'taki baskın yağ asitleri olduğuna atıfta bulunmaktadır (Da-Costa-Rocha ve ark., 2014; Jabeur ve ark., 2017; Jabeur ve ark., 2019). Jabeur ve ark. (2017 ve 2019) tarafından yapılan her iki çalışmada, mevcut çalışmada elde edilen daha fazla yağ asidi (18 adet) ve doymuş yağ asidi (14 adet) ortaya çıkarmışlardır. Linoleik asit oranları ise her üç çalışmada da farklı iken, diğer iki çalışmada palmitik asit yüzdesinin (sırasıyla %27,73 ve %34,03) bu çalışmaya oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat bu çalışmada oleik asidi diğer iki çalışmaya kıyasla (sırasıyla %9,1 ve 14,3) oldukça yüksek bulunmuştur. Oranlar değişse de benzer bir yağ asidi profili gözlenmiştir. Sonuç olarak, bitki numunelerin kökeninin, Hibiskus çiçeğinin kimyasal bileşimi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Toplam Fenolik, Flavonoid İçerikleri ve Antioksidan Aktivite

Bitkisel özütlerinin eldesinde farklı polaritedeki çözücüler kullanılabilir (Zarkani, 2016; Gutiérrez-Alcántara ve ark., 2016; Sivan ve Anna Sheba, 2019; Alebrahim-Dehkordy ve ark., 2020). Bu çalışmada da Hibiskus özütlerinin elde edilmesinde etanol tercih edilmiştir. Çizelge 2'ye göre Hibiskus bitkisinin fenolik miktarları USB özütlerinde ortalama 23,29 mg/g; soksalet ekstraktlarında ise 16,96 mg/g olduğu belirlenmiştir. Bitkinin flavonoid miktarları ise USB özütlerinde 3,08 mg/g, soksalet özütlerinde 1,99 mg/g olduğu görülmüştür. Özütlerdeki IC₅₀ değerleri 0,61 (USB) ve 0,93 (soksalet) mg/mL ve FRAP değerleri ise 47,54-20,06 µg/g olarak elde edilmiştir. Yapılan tüm in-vitro testlerde USB ile elde edilen özütlerin soksaletle nazaran biyoaktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak her iki özütün de oldukça yüksek bir antioksidan potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan ekstraksiyon tipi açısından flavonoid ve fenolik bileşenler ele alındığında USB metodunun daha iyi olduğu görülmektedir (Çizelge 2). Araştırmacılar farklı ekstraksiyon yöntemleri, çözücüler ve farklı testler kullanarak Hibiskus özütlerinin in vitro ve in vivo antioksidan özelliklerini tanımlamışlardır (Sayago-Ayerdi ve ark., 2007; Olaleye, 2007; Mohd-Esa ve ark., 2010). Hepsi de bu bitkinin biyoaktif potansiyelini ve yüksek antioksidan gücünü, çiçek, tohum ve yaprak gibi farklı bitki kısımlarında bildirmişlerdir. Antioksidan aktivitede elde edilen en yüksek konsantrasyon, ürüne dahil edilecek miktarı tahmin etmek için kullanılabilir.

Antimikrobiyal Aktivite

Hibiskus kalikslerinden ultrasonik su banyosunda elde edilen özütlerinin oyuk agar yöntemi ile antimikrobiyal etkinliği değerlendirildiğinde, *S. cerevisia* hariç tüm test mikroorganizmaları üzerine bir inhibisyon etkisi tespit edilmiş olup (Çizelge 3), genel olarak gram pozitifler üzerine daha etkin olduğu gözlenmiştir. Nair ve Chandra (2006) Hibiskus'un da bulunduğu birçok bitkisel özütün antimikrobiyal aktivitesini araştırdığı çalışmada, gram pozitif bakterilerin gram negatiflere göre daha fazla hassasiyet gösterdiklerini belirtmişlerdir. Test konsantrasyonlarının tümünde sadece *B. subtilis* ve *E. faecalis* üzerinde inhibisyon zonu oluştururken en geniş inhibisyon zonu gram pozitif mikroorganizmalardan *E. faecalis* ve *S. lutea* da gözlenmiştir. Ancak hastane izolatu olan MRSA üzerinde ise en düşük inhibisyon zonu elde edilmiştir. Gram negatif organizmalardan ise en geniş inhibisyon *Proteus* sp.'de, en düşük ise klinik izolat olan *K. pneumonia*'da görülmüştür. Hibiskus özütü mayalardan *C. albicans* üzerine etki ederken *S. cerevisia* üzerine bir aktivite sergilememiştir. Çizelge 3'den de anlaşılacağı gibi Hibiskus özütleri doza bağlı bir antimikrobiyal etkinlik sergilemiştir. Hibiskus ekstraksiyonunun gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar üzerine olan antimikrobiyal aktivite bulguları diğer araştırmacıların bulguları ile uyumluluk göstermektedir (Edward-Jones, 2013; Higginbotham ve ark., 2014; Abdallah, 2016).

Çizelge 2. Toplam fenolik ve flavonoid içerik ile antioksidan aktivite değerleri

Table 2. Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activity values

	USB	Soksalet
Fenol <i>Phenol</i> (mg GAE g ⁻¹)	23,29±0,85	16,96±0,38
Flavonoid <i>Flavonoid</i> (mg QE g ⁻¹)	3,08±0,07	1,99±0,05
IC ₅₀ değeri <i>IC50 Value</i> (%DPPH) (mg mL ⁻¹)	0,61±0,02	0,93±0,05
FRAP <i>FRAP</i> (µg AAE g ⁻¹)	47,54±1,78	20,06±0,89

Çizelge 3. Hibiskus özütlerinin antimikrobiyal aktivite ve MİK değerleri.

Table 3. Antimicrobial activity and MIC values of extracts of Hibiscus.

Mikroorganizmalar	<i>H. sabdariffa</i>					Mik (mg/ml)	Kontrol		
	n	n/2	n/4	n/8	n/16		Gn	Lev	Nys
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16	11	8	5	2	2	22	25	TE
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	21	17	9	6	2	27	22	TE
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341NA	24	17	8	-	-	1	24	33	TE
MRSA*	13	9	3	-	-	1	17	14	TE
<i>Proteus</i> sp.	16	9	6	-	-	1	20	24	TE
<i>Escherichia coli</i> ATCC 309628	14	10	7	4	-	1	17	18	TE
<i>Klebsiella pneumonia</i> *	10	8	4	-	-	1	18	28	TE
<i>Candida albicans</i> *	12	10	7	3	-	2	TE	TE	19
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	-	-	-	-	-	-	TE	TE	23

*: Klinik izolat, n: 8 mg/ml, Gn: Gentamisin (10 µg), Lev: Levofloksasin (5 µg), Nys: Nistatin (100U) TE: Test Edilmedi

Hibiskus özütünün test konsantrasyonlarda gözlemlenen MIC değerleri 1 mg/ml ile 2 mg/ml arasında tespit edilmiştir. En düşük konsantrasyon 1 mg/ml ile *S. lutea*, MRSA, *Proteus* sp. *E. coli* ve *K. pneumonia* suşlarında kaydedilmiştir. Benzer ve farklı suşlardan elde edilen benzer mik değerleri Navarro García ve ark. (2006), Alsham ve Alharbi (2014), Bokaeian ve ark., (2014) tarafından rapor edilirken Márquez-Rodríguez ve ark (2020), Portillo-Torres ve ark., (2019)'da daha yüksek bulguları rapor etmişlerdir.

Hibiskus için Jung ve ark. (2013) antimikrobiyal aktiviteyi etanol özütlerinde suya göre kısmen daha etkin olduklarını gözlemlenmişlerdir. Bu çalışmada antimikrobiyal aktivite tayininde çözücü tercihi ise etanol olmuştur. Hibiskus taç yaprak ekstraktlarından birçok bileşen tanımlanmış (Ramirez-Rodrigues ve ark., 2011) olmasına rağmen, hangi bileşiğin tek başına veya mevcut bileşiklerin sinerjik olarak antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu tam olarak ortaya konmamıştır. Ancak, fenolik ve flavonoid bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri bilinmektedir (Mounnissamy ve ark., 2002; Higginbotham ve ark., 2014; Riaz ve Chopra, 2018). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise Hibiskus bitkisindeki kimyasal bileşiklerden antosiyaninler, polifenol, protokateşik asit, Hibiskus asit gibi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerden sorumlu oldukları tahmin edilmektedir (Liu ve ark., 2005; Nair ve Chandra, 2006; Yin ve Chao, 2008). Hibiskus özütlerinin antimikrobiyal etki mekanizmaları ise bakteri hücre duvarlarında kompleks bileşiklerin oluşumundan (Cowan, 1999), plazma membranlarının geçirgenliğinin değiştirilmesinden dolayı iyon dengesinin bozulmasından (Walsh ve ark., 2003) ve elektron taşınımı, protein translokasyonu, fosforilasyon basamaklarının ve diğer enzim kaynaklı reaksiyonların inhibisyonu (Fullerton ve ark., 2011) sayesinde olabileceği belirtilmektedir.

Sonuç

Yağ asitleri sonuçlarına göre, sağlık için yararları bilinen oleik ve linoleik asitçe zengin olması kaliks özütlerinin değerini arttırmaktadır. Yüksek fenolik ve flavonoid değerlerinin yanı sıra, özellikle kaliks özütlerinin IC₅₀ değerinin çok düşük olması, bitkinin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu çalışmada Hibiskus özütünün, test edilen gram pozitif ve gram negatif bakteriler yanında patojen *C. albicans* 'a karşı antimikrobiyal etkisi ortaya konmuştur. *S. cerevisia* üzerine ise herhangi bir inhibisyon özelliğinin olmaması ve antimikrobiyal etkili doğal gıda katkısı olarak birçok üründe ve barsak florasının korunmasında kullanılabileceğini göstermiştir. Yine de daha fazla araştırmanın detaylı bir şekilde yapılmasına ihtiyaç vardır. Gıda şirketleri tarafından, farklı demleme yöntemleriyle hazırlanan ya da yeşil çözücü olarak değerlendirilen etanol ile ekstrakte edilmiş Hibiskus kaliksinden eklenen bir öze, potansiyel olarak işlevsel yiyecekler geliştirebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

Abdallah E. 2016. Antibacterial efficiency of the Sudanese roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *J Intercult Ethnopharmacol*, 5(2): 186-90.

- Alebrahim-Dehkordy E, Rafieian-Kopaei M, Zamanzad B, Deris F, Sharifih A, Reyhanian A. 2020. Antimicrobial effect of chloroform *Hibiscus sabdariffa* extract on pathogenic bacteria. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 11(1):15-18.
- Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.*, 239(1): 70-76.
- Bokaeian M, Sheikh M, Shahi Z, Saeidi S. 2014. Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* extract against human pathogen. *Int J Adv Biol Biomed Res*, 2(2): 433-439.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CLWT. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*, 28(1): 25-30.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.*, 10(3): 178-182.
- Comlekcioglu N. 2019. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of Endemic and Native *Isatis* spp in Turkey. *Braz Arch Biol Technol*, 62.
- Çetin TE, Gürler N. 1989. Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık deneylerinin yapılması. *Kükem Derg.*, 12: 2-3.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.*, 12:564-582.
- Da Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. 2014. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165: 424-443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>.
- Edwards-Jones V. 2013. Alternative antimicrobial approaches to fighting multidrug-resistant infections. In: Rai M, Kon K, editors. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Amsterdam. Elsevier Inc., p. 1-9.
- El Naim AM, Ahmed SE. 2010. Effect of weeding frequencies on growth and yield of two roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) varieties under rain fed. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4(9): 4250-4255.
- Fullerton M, Khatiwada J, Johnson JU, Davis S, Williams LL. 2011. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. *J Med Food.*, 14(9): 950-956.
- Guo ML, Perez C, Wei YB, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F. 2007. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bioeffects. *Dalton Trans*, 43: 4951-4961.
- Gutiérrez-Alcántara EJ, Gómez-Aldapa CA, Román-Gutiérrez AD, Rangel-Vargas E, González-Olivares LG, Castro-Rosas J. 2016. Antimicrobial Activity of Roselle *Hibiscus Sabdariffa* Calyx Extracts on Culture Media and Carrots Against Multidrug-Resistant *Salmonella* Strains Isolated from Raw Carrots. *Journal of Food Safety*, 36(4): 450-8.
- Higginbotham KL, Burris KP, Zivanovic S, Davidson PM, Stewart CN. 2014. Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Aqueous Extracts against *Escherichia Coli* O157:H7 and *Staphylococcus Aureus* in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *J. Food Prot.*, 77: 262-268.
- Jabeur I, Pereira E, Barros L, Calhelha RC, Soković M, Oliveira MBP, Ferreira IC. 2017. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International*, 100: 717-723.
- Jabeur I, Pereira E, Caleja C, Calhelha RC, Soković M, Catarino L, Ferreira IC. 2019. Exploring the chemical and bioactive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces from Guinea-Bissau (West Africa). *Food & function*, 10(4): 2234-2243.
- Jung E, Kim Y, Joo N. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J Sci Food Agric.*, 93:3769-3776.
- Khalid H, Abdalla WE, Abdelgadir H, Optaz T, Efferth T. 2012. Gems from traditional north-African medicine: medicinal and aromatic plants from Sudan. *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2: 92-103.

- Leung AY, Foster S. 1996. Encyclopaedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics (2nd ed.), John Wiley and Sons, New York.
- Liu KS, Tsao SM, Yin MC. 2005. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother. Res.*, 19, 942–945.
- Maganha EG, Halmenschlager RD, Rosa RM, Henriques JAP, Ramos ALLD, Saffi J. 2010. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chem.*, 118: 1-10.
- Mahadevan N, Kamboj P. 2009. *Hibiscus sabdariffa* Linn.—an overview. *Nat. Prod. Radiance*, 8 (1): 77-83.
- Marquez-Rodriguez AS, Nevarez-Baca S, Lerma-Hernandez JC, Hernandez-Ochoa LR, Nevarez-Moorillon GV, Gutierrez-Mendez N. 2020. In Vitro Antibacterial Activity of *Hibiscus sabdariffa* L. Phenolic Extract and Its In Situ Application on Shelf-Life of Beef Meat. *Foods*, 9(8).
- Mohammed FS, Daştan T, Sevindik M, Selamoglu Z. 2019. Antioxidant, antimicrobial activity and therapeutic profile of *Satureja hortensis* from Erzincan Province. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 41(3): 558-562.
- Mohammed FS, Şabik AE, Sevindik E, Pehlivan M, Sevindik M. 2020. Determination of Antioxidant and Oxidant Potentials of *Thymbra spicata* Collected from Duhok-Iraq. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(5): 1171-1173.
- Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yee CL. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry*, 122(4): 1055–1060.
- Mounnissamy V, Kavimani S, Gunasegaran R. 2002. Antibacterial activity of gossypetin isolated from *Hibiscus sabdariffa*. *Antiseptic*, 99: 81–82.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. M7-A3. Approved Standard. Villanova, Pa: NCCLS, 1993.
- Nair R, Chanda S. 2006. Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacterial strains. *Indian J Pharmacol*, 38: 142–144.
- Navarro García, VM, Rojas G, Zepeda LG, Aviles M, Fuentes M. 2006. Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. *Pharm Biol.*, 44: 297-300.
- Obanda M, Owuor PO, Taylor SJ. 1997. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2): 209-215.
- Olaleye MT. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1): 9–13.
- Ojulari OV, Lee SG, Nam JO. 2019. Beneficial effects of natural bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on obesity. *Molecules*, 24(1): 210.
- Pehlivan M, Sevindik M. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5): 628-631.
- Pehlivan M, Mohammed FS, Sevindik M, Akgul H. 2018. Antioxidant and oxidant potential of *Rosa canina*. *Eurasian Journal of Forest Science*, 6(4): 22-25.
- Pelliccia F, Marazzi G, Greco C, Franzoni F, Speziale G, Gaudio C. 2013. Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs. *International Journal of Cardiology*, 170: S3-S7.
- Portillo-Torres LA, Bernardino-Nicanor A, Gomez-Aldapa CA, Gonzalez-Montiel S, Rangel-Vargas E, Villagomez-Ibarra JR. 2019. Hibiscus Acid and Chromatographic Fractions from Hibiscus Sabdariffa Calyces: Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 8(4).
- Ramirez-Rodrigues MM, Plaza ML, Azeredo A, Balaban MO, Marshall MR. 2011. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.*, 76: C428–C435.
- Riaz G, Chopra R. 2018. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.
- Sayago-Ayerdi SG, Arranz S, Serrano J, Goni I. 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19): 7886–7890.
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z. 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresen Environ Bull*, 26(7): 4757-4763.
- Sivan K, Anna Sheba LA. 2016. Study on Phytochemicals, Antimicrobial, and Synergistic Antimicrobial Activities of *Hibiscus Sabdariffa*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019:198-201
- Walsh SE, Maillard JY, Russel AD, Catrenich CE, Charbonneau AL, Bartolo RG. 2003. Activity and mechanism of action of selected biocidal agents on Gram -positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol.*, 94:240–247.
- Yin MC, Chao CY. 2008. Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 127, 73–77.
- Zarkani AA. Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Sesbania grandiflora* extracts against some G– and G+ Strains. *Banat’s Journal of Biotechnology*. VII(13):17-23.