

**UMBELLIFERAE FAMILYASINA AİT  
BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gökalp İŞCAN**  
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Şubat 2002

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.  
Proje No: 001048**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gökalp İŞCAN'ın Umbelliferae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 05.02.2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisanüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mehmet Kuvancı	
Üye	: Prof. Dr. Mustafa Kemal Akdoğan	
Üye	: Prof. Dr. Nese Kırimer	
Üye	: Doç. Dr. Kıymet Günen	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Semra İLHAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..08.02.2002..tarih ve ....4/2.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. İmar ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
M ü d ü r ü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### UMBELLIFERAE FAMILYASINA AIT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökalp İŞCAN

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2002, 93 Sayfa

Bu tezde Umbelliferae Familyasına ait çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarının farklı yöntemler kullanılarak, seçilen mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile kullanılan uçucu yağların bakterilere karşı olan minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) belirlenirken, biyootografi metodu kullanılarak aktiviteden sorumlu olan uçucu yağ bileşenleri ortaya çıkarılmıştır. Kullanılan uçucu yağlar genel olarak insan patojenlerine karşı orta derecede antimikrobiyal etki gösterirken, bitki patojenlerine karşı oldukça güçlü antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Ayrıca kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip 2 uçucu yağın mutajenik etkileri Ames *Salmonella*/Mutajenite testi ile araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: MİK, Umbelliferae, Antimikrobiyal, Biyootografi, Ames

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM  
SOME UMBELLIFERAE SPECIES****Gökalp İŞCAN****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2002, 93 Pages**

**In this thesis, some plants specimens's volatile oils from Umbelliferae Family have been investigated against certain microorganisms using various antimicrobial screening methods. Using Microdilution Broth method, MIC values were determined, whereas the essential oils compounds which are responsible for the bioactivity were determined by bioautography technique. The volatile oils showed moderate antimicrobial activity against human pathogenic bacteria, on the other hand, they showed strong activity against plant pathogenic bacteria. None of the essential oil showed antifungal activity against filamentous fungi. Furthermore, the mutagenic effects of two essential oils with strongest antimicrobial activity have been investigated by the Ames *Salmonella*/Mutagenicity assay.**

**Keywords: MIC, Umbelliferae, Antimicrobial, Bioautography, Ames**

## TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezim boyunca Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya teşekkür ederim.

Özellikle uçucu yağların teminiyle, gerekli malzeme ve laboratuvarları kullanımına sunan Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi Müdürü, değerli hocam Sayın Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanma aşamalarında engin bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e ve Doç. Dr. Kıymet GÜVEN'e, çalıştığım uçucu yağların analizlerini yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mine KÜRKCÜOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Betül DEMİRCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar çalışmalarında, gerekse tez yazımı konusunda bilgilerinden faydalandığım ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, Sayın Yrd. Doç. Fatih DEMİRCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimdeki fotoğrafların çekilmesinde yardım eden, Sayın Yrd. Doç. Dr. Temel ÖZEK'e, Ames testinin yapılmasında bana rehberlik eden Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ ve Araş. Gör. Emel ERGENE'ye ve çalışmada kullandığım ratları temin eden Sayın Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince her konuda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Uçucu Yağlar.....	2
1.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri.....	4
1.2.1. Distilasyon.....	4
1.2.1.1. Su Distilasyonu.....	4
1.2.1.2. Buhar Distilasyonu.....	4
1.2.2. Soğukta Sıkma.....	5
1.2.3. Çözücü Ekstraksiyonu.....	6
1.2.4. Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon.....	6
1.3. Umbelliferae Familyasının Taksonomik Özellikleri.....	7
1.4. Umbelliferae Familyasının Biyoloji ve Kimyası.....	8
1.5. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Yöntemler.....	12
1.6. Ames <i>Salmonella</i> Mutajenite Testi.....	21
1.7. Mutasyon ve Mutasyon Çeşitleri.....	22
1.7.1. Sayısal Kromozom Mutasyonları.....	23
1.7.2. Yapısal Kromozom Mutasyonları.....	23
1.7.3. Gen Mutasyonları.....	23
1.7.3.1. Transition Mutasyonları.....	24
1.7.3.2. Transversiyon Mutasyonları.....	24
1.7.3.3. Yanlış Anlamlı (Missense) Mutasyonlar.....	25

1.7.3.4. Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.5. Doğal (Neutral) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.6. Sessiz (Silent) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.7. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları.....	25
1.8. Mutasyonun Nedenleri ve Mutajenler.....	26
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
2.1. Materyal.....	27
2.1.1. Kullanılan Uçucu Yağlar.....	27
2.1.2. Antimikrobiyal Testlerde Kullanılan Mikroorganizmalar .....	28
2.1.3. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Testinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	29
2.1.4. Deney Hayvanları .....	29
2.1.5. Antimikrobiyal Testler İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar .....	30
2.1.5.1. Mueller Hinton Broth (Merck) .....	30
2.1.5.2. Mueller Hinton Agar (Mast Diagnostic) .....	30
2.1.5.3. Sabouraud Dextrose Agar (Difco) .....	31
2.1.5.4. Nutrient Agar (Merck) .....	31
2.1.5.5. Yumuşak Agar .....	31
2.1.5.6. TTC Tuzu (Sigma) .....	32
2.1.5.7. Anisaldehit/Sülfirik Asit.....	32
2.1.5.8. McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı.....	32
2.1.5.9. McFarland No: 5 Bulanıklık Standardı.....	32
2.1.6. Ames Testi İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar.....	33
2.1.6.1. (50x) Vogel Bonner Medium.....	33
2.1.6.2. Histidin / Biotin Solusyonu (0.5mM) .....	33
2.1.6.3. Ampisilin Solusyonu.....	33
2.1.6.4. Kristal Viyole Çözeltisi (%0.1) .....	34
2.1.6.5. Biotin Çözeltisi (%0.13) .....	34
2.1.6.6. Histidin Çözeltisi (%0.5) .....	34
2.1.6.7. Glikoz Çözeltisi (%40).....	34

2.1.6.8. 4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD).....	35
2.1.6.9. 2-Aminofloren (2AF).....	35
2.1.6.10. 3-Metilkolontren.....	35
2.1.6.11. KCL Çözeltisi.....	35
2.1.6.12. S9 Karışımı.....	35
2.1.6.13. Top Agar.....	36
2.1.6.14. Histidin/Biotin Agar (HB Agar).....	36
2.1.6.15. Histidin/Biotin/Ampisilin Agar (HBA Agar).....	36
2.1.6.16. Minimal Glikoz Agar (MGA).....	37
2.1.6.17. Nutrient Agar.....	37
2.1.6.18. Nutrient Broth.....	37
<b>2.2. Yöntem</b>	
2.2.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi... 38	
2.2.1.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması.....	38
2.2.1.2. Mikrobroth Dilüsyon Tekniği.....	38
2.2.1.3. Agar Difüzyon Tekniği.....	40
2.2.2. Biyootografi Tekniği İle Uçucu Yağlardaki Antimikrobiyal Özellikteki Bileşiklerin Belirlenmesi.....	41
2.2.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Sistemi.....	41
2.2.2.2. Mikroorganizmaların Hazırlanması.....	41
2.2.2.3. Aktivite Tayini.....	42
2.2.2.4. Gaz Kromatografisi (GC).....	42
2.2.2.5. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)...	43
2.2.2.6. Preparatif İTK Plağının Hazırlanması.....	44
2.2.3. Ames <i>Salmonella</i> Mutajenite Deneyi.....	45
2.2.3.1. <i>Salmonella</i> Suşlarının Hazırlanması.....	45
2.2.3.2. <i>Salmonella</i> Suşlarının Genotip Kontrolleri.....	45
2.2.3.2.1. Histidin Gereksinim Kontrolü.....	45
2.2.3.2.2. <i>UvrB</i> Mutasyonu Kontrolü.....	46
2.2.3.2.3. <i>Rfa</i> Mutasyonunun Kontrolü.....	46
2.2.3.2.4. R Faktör Varlığının Kontrolü.....	46



2.2.3.2.5. Spontan Olarak Geriye Dönüşüm	
Sıklığının Kontrolü.....	47
2.2.3.3. Kullanılacak Sıvı Kültürdeki Bakteri Sayısının	
Hesaplanması.....	47
2.2.3.4. Uçucu Yağların Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	47
2.2.3.5. Memeli Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması.....	48
2.2.3.6. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	48
2.2.3.6.1. S9'suz Deney.....	49
2.2.3.6.2. S9'lu Deney.....	49
2.2.3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	50
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>51</b>
3.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etki Sonuçları.....	51
3.1.1. Mikrobrot Dilyon Yöntemiyle Aktivitenin Belirlenmesi.....	51
3.1.2. Agar Difüzyon Yöntemi ile Antifungal	
Aktivitenin Belirlemesi.....	53
3.2. Uçucu Yağlara Biyootografi Tekniğinin Uygulanması.....	55
3.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Genotip Kontrollerinin Değerlendirilmesi.....	62
3.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi.....	62
3.5. S9'lu ve S9'suz Mutajenite Deneylerinin Sonuçları.....	63
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>65</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>83</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Mikrobroth Dilüsyon Tekniğinde Kullanılan 96 (well) Kuyucuklu Mikrotitrasyon Petrisi .....	39
3.1. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları ( <i>Aspergillus flavus</i> ).....	54
3.2. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları ( <i>Fusarium solani</i> ) .....	54
3.3. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları ( <i>Sclerotium rolfsii</i> ).....	54
3.4. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları ( <i>A. parasiticus</i> ) .....	54
3.5. <i>C. albicans</i> plağında 9 adet uçucu yağın biyogramı ve yağlara ait referans İTK plağı .....	55
3.6. <i>Echinophora teunifolia</i> subsp. <i>sibtorphiana</i> (A) bitkisine ait uçucu yağın ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı .....	57
3.7. <i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>ternatum</i> (B) bitkisine ait uçucu yağın ve ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı .....	57
3.8. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile $\delta$ -3-Karen'in Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü .....	61
3.9. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile Metil öjenol'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü .....	61
3.10. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile 1-Oktanöl'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü .....	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Uçucu Yağları Elde Edilen Bitki Türleri ve Kaynakları.....	27
2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları .....	28
3.1. Uçucu Yağların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK- $\mu\text{g/ml}$ )	52
3.2. Standart Antifungal Ketokonazol'ün Oluşturduğu İnhibisyon Zonu Çapları (mm) .....	53
3.3. <i>E. teunifolia subsp. sibtorphiana</i> (A) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları.....	56
3.4. <i>H. sphondylium subsp. ternatum</i> (B) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları.....	56
3.5. Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Saf Maddelerin ve Ait Oldukları Uçucu Yağların MİK Değerleri ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	59
3.6. Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA98 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	64
3.7. Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA100 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	64

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>GC/MS</b>	: Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi
<b>MİK</b>	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>MBK</b>	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>R<sub>f</sub></b>	: Retention Factor (Tutunma Faktörü)
<b>ESSE</b>	: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
<b>İSTO</b>	: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Herbaryumu
<b>MHA</b>	: Mueller Hinton Agar
<b>MHB</b>	: Mueller Hinton Broth
<b>SDA</b>	: Sabouraud Dextrose Agar
<b>TTC</b>	: 2,3,5- Trifenil Tetrazolyum Klorid
<b>NPD</b>	: 4-Nitro- <i>o</i> -fenilendiamin
<b>2-AF</b>	: 2-Aminofloren
<b>HBA</b>	: Histidin/Biotin/Ampisilin
<b>MGA</b>	: Minimal Glikoz Agar

## 1. GİRİŞ

Dünya üzerinde 750 bin-1milyon arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Gıda elde etmek için yetiştirilen türler 3 bin civarındadır. Antik çağlardan 19.yy başlarına kadar geçen sürede artış göstererek, bugün dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan bitki sayısı 20 bine ulaşmıştır. Türkiye’de bu sayının 500 civarında olduğu bildirilmiştir [1].

Tıbbi bitkiler, içlerindeki biyolojik olarak aktif bileşiklerin varlığı bilinmeden, antik çağlardan beri insanlar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmışlardır. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar ve bunlara karşı olan ilgi çok artmıştır. Çünkü, bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı mümkün olmaktadır. Ayrıca tedavi alanına sokulan yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler ancak kullanıma girdikten sonra tam olarak anlaşılmakta ve onarılması mümkün olmayan zararlara sebep olmaktadır. Buna karşılık bitkiler çok uzun zamandan beri kullanıldıkları için yan etkileri çok iyi bilinmektedir [1,2].

Türk halkı, çoğunluğunun kırsal bölgede yaşaması nedeniyle, yabani bitkiler ile yakından ilgilidir. Halk yabani bitkilerin bir bölümünden gıda, baharat, boyar madde veya ilaç olarak yararlanmaktadır. Bir kısım bitki ise zehirli bileşikler taşıması nedeniyle halk ve hayvan sağlığı nedeniyle önem taşımaktadır. Anadolu’da yabani bitkilerin gıda ve baharat olarak kullanılışı oldukça yaygındır. Birçok yabani bitkinin toprak üstü kısmı veya kökleri sebze olarak tüketilmektedir. Gıda olarak kullanılan yabani bitkilerin başında halk arasındaki isimleriyle Kenger, Evelik, Madımak, Ebegümece, Ciriş, Çörtük sayılabilir. Bunların dışında *Allium*, *Origanum*, *Mentha*, *Thymus* gibi cinslerde yemeklere koku ve tat vermek amacıyla kullanılmaktadır [1].

Bir çok aromatik bitki de halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerden çoğunlukla tedavi maksatlı kokulu çaylar hazırlanmaktadır. Aromatik bitkilerden hazırlanan drogların bir çoğu sindirim sistemi üzerinde etkilidir. Bunlar, gaz söktürücü, midevi, hazmı kolaylaştırıcı, safra salgısını arttırıcı olarak kullanılırlar. Bir kısım bitkiler ise, idrar söktürücü ve böbrek taşlarını düşürücü etki göstermektedir. Diğer bir kısmı solunum yolları üzerinde etkilidir. Antiseptik

özellikleri yanında solunumu uyarırlar. Bazı aromatik bitkiler de sinir sistemi üzerinde etki göstererek yatıştırıcı olarak kullanılırlar. Bunların dışında, kurt düşürücü, spazm giderici, enflamasyon dağıtıcı, adet ve romatizma ağrılarını giderici ve mikrop öldürücü gibi çeşitli etkilere sahip olan çok sayıda aromatik bitki vardır [1, 3].

Aromatik bitkilerin en önemli özellikleri sahip oldukları hoş koku ve tatlarıdır. Bu özelliklerini taşıdıkları uçucu yağlara borçludurlar. Aromatik drogların ve onlardan elde edilen uçucu yağların gıda maddelerinin hazırlanmasında, parfümeri ve kozmetoloji sanayiinde, tıp ve eczacılık alanlarında geniş bir kullanımı vardır [1-4].

Bu çalışmada Umbelliferae familyasına ait 14 adet bitki türünün uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri çeşitli bakteri ve funguslara karşı denenmiştir. Test bitkileri halk arasında ilaç ya da gıda olarak kullanılan bitkilerden seçilmiştir. En kuvvetli antimikrobiyal aktiviteye sahip olan uçucu yağların kompozisyonu aydınlatılmış ve aktiviteden sorumlu olan ana bileşenleri ortaya çıkarılmıştır. Bu ana bileşenlere sahip uçucu yağlar veya bunların elde edildiği bitkiler halk arasında gıda olarak kullandıkları için bunların karsinogenik etkileri Mikrozom/Ames testi ile ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

### 1.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan genellikle su veya buhar distilasyonu yöntemleri ile elde edilen, kendilerine has koku, tat, renk ve görünüme sahip karışımlardır. Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar ve açığa bırakıldıklarında kolaylıkla buharlaşma özelliğine sahiptirler.

Uçucu yağların çoğu sudan hafiftir ve suyla karışmadıklarından suyun üzerinde toplanırlar. Ancak bileşimindeki oksijenli bileşiklerin bir kısmı suda çözünür. Bu özelliklerine dayanarak aromatik sular hazırlanabilmektedir.

Uçucu yağlar, bitkilerin başta çiçek ve yaprakları olmak üzere herhangi bir organında (herba, kabuk, kök, odun, meyve, tohum) bulunabilirler. Bazen bitkinin bütün dokularında, bazen de sadece özel organ ve dokularında meydana gelirler. Uçucu yağlar bitkinin bağlı olduğu familyaya göre belirli bir oranda salgı

tüylerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve salgı ceplerinde bulunurlar. Bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmayan bu maddelerin ne amaçla oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları, yaralanmalara karşı oluşan reçineyi çözebilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Yaydıkları kokular sayesinde de böcekleri cezbederek tozlaşmaya yardımcı olduğu ya da bunun tam tersi etki göstererek zararlı böcekleri bitkiden uzaklaştırarak bitkiyi korumada yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle sıcak iklimlerde yetişmesi nedeniyle uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlediği düşünülmektedir. Bu bitkileri taşıyan başlıca familyalar ise Coniferae, Rutaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rosaceae, Labiatae, Umbelliferae, Iridaceae, Zingiberaceae ve Graminae'dir [6].

Uçucu yağlar petrol eteri, hekzan, eter, etanol gibi organik çözücülerin çoğunda çözümlenir. Uçucu yağların belli derecedeki etanoldeki çözünürlük oranı saflık kontrolünde yardımcı olmaktadır. Uçucu yağların kalitesi genellikle yoğunluk, kırılma indisi, optik çevirme gibi fizikokimyasal özelliklerle belirlenir. Optikçe aktifler ve kırılma indisleri yüksektir. Çoğu uçucu yağlar çok sayıda bileşiğin karışımından oluşmuşlardır. Bu yüzden kimyasal kompozisyonları oldukça karmaşıktır. Hatta aromatik bitkilerin coğrafik bölgelerindeki mevsimsel, iklimsel ve ontojenik değişiklikler bile bitkinin uçucu yağını oluşturan bileşenlerde dikkate değer derecede farklılıklar ortaya çıkarmaktadır. Kimyasal bileşimleri, Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS) sistemi ile belirlenebilmektedir [5, 6].

Uçucu yağlar genellikle hidrokarbonlar ve oksijenli türevlerinden meydana gelmişlerdir. Bu hidrokarbonların çoğu terpenoit kökenlidir. Çok az bir kısmında aromatik benzen türevleri terpenlerle karışım halindedir. Terpenler  $(C_5H_8)_n$  genel formülüne uyan hidrokarbonlardır ve 2 izopren molekülünün kondensasyonu ile meydana gelirler [5].

İki izopren molekülünden oluşan 10 karbonlu terpenler "Monoterpen" ( $C_{10}H_{16}$ ), 3 izopren molekülünden oluşan 15 karbonlu terpenler "Seskiterpen" ( $C_{15}H_{24}$ ), 4 izopren molekülünden oluşan 20 karbonlu terpenler "Diterpen"

(C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>) olarak adlandırılırlar. 25 karbonlular “Sesterterpen” (C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>) adını alır ve uçucu yağların bileşiminde bu ana yapılara rastlanır.

Terpenlerin oksitlenmesiyle oluşan oksijenli türevler yağa özgü tat ve koku veren bileşiklerdir. Bu oksijenli türevler alkol, keton, ester, aldehit, oksit, eter ve bunlara benzer yapılarda bulunabilirler [5, 6].

## **1.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri**

Uçucu yağ eldesinde 4 temel yöntem kullanılır, bunlar; distilasyon, soğukta sıkma, çözücü ekstraksiyonu ve sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon yöntemleridir [7].

### **1.2.1. Distilasyon**

Bütün tıbbi uçucu yağlar, Limon esansı ve Ardiç katranı hariç, distilasyon yoluyla elde edilirler. Distilasyon ile uçucu yağ eldesinde farklı uygulamalar mümkündür [8].

#### **1.2.1.1. Su distilasyonu (Hidrodistilasyon)**

Uçucu yağ eldesinde bilinen en eski yöntemdir. Yaş ya da kuru materyalden uçucu yağ suyla distilasyon yoluyla elde edilir. Drog su ile birlikte kaynatılınca oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaşır Florentin Kabı adı verilen toplama kabında yoğunluğuna göre suyun üstünde veya altında birikir. Laboratuar ölçekli uçucu yağ miktar tayini için de bu yöntem kullanılır. Endüstride ki uygulamalara gül yağı üretimi örnek verilebilir [8].

#### **1.2.1.2. Buhar distilasyonu**

Bu yöntemde bitki materyali kaynar suyla değil, su buharı ile temasta bırakılır. Modern uçucu yağ distilasyon sistemlerinde drog delikli tava veya sepetlere yerleştirilir. Bir buhar kazanında üretilen ve drog üzerine gönderilen su



buharı yağı sürükleyerek soğutucuya (kondenser) götürür. Sıvılaştan su-yağ karışımı toplama kabında yoğunluk farkından dolayı iki tabakaya ayrılır ve uçucu yağ bu şekilde elde edilir. Bu yöntem buhar distilasyonu denir. Suyun, distilasyon kazanının alt kısmındaki ayrı bir bölmede kaynatılması ve oluşan buharların delikli ızgaranın üstündeki drog tabakasına gönderilmesi halinde yöntem "Su-Buhar Distilasyonu" adı verilir. Bu yöntem az gelişmiş ülkelerde ve kırsal kesimde yapılan distilasyonlarda kullanılır, buhar distilasyonu kadar verimli değildir. Florentin kabı yağın sudan ayrılmasını sağlayan toplama kabıdır. Sudan hafif olan yağlar kabın üst kısmında toplanır ve üst kısmında bulunan bir musluktan yağ alınır. Sudan ağır olanlar ise dipte toplandıklarından dipte bulunan bir musluktan tahliye edilir. Uçucu yağla doymuş haldeki su sisteme yeniden gönderilebilir veya tekrar distile edilebilir. Bu durumda 2. yağ ilk yağ ile karıştırılır ve yağından arındırılmış su "aromatik su" olarak değerlendirilir [8].

### 1.2.2. Soğukta Sıkma

Narenciye esansları gibi bazı uçucu yağlar distilasyon yöntemi ile bozulurlar. Bu yağların elde edilmesi için narenciye kabuklarının yağ içeren hücreleri patlatılır ve açığa çıkan yağ suyla yıkayarak kabuktan alınır. Ayrılan Yağ-su emülsiyonunun santrifüj edilmesiyle narenciye esansı elde edilir. Eskiden kabuklar sünger içinde sıkılır ve süngere geçen yağ sıkılmak suretiyle elde edilirdi. Narenciye usare ve uçucu yağlarının üretimi için günümüzde 2 tip ekstraktör kullanılmaktadır. FMC In Line adı verilen ekstraktör de meyvenin alt ve üst kısımları kesilir. Üzerinde delikleri olan bir boru meyvenin içine usareyi almak üzere yerleşirken üstten dışa doğru inen bıçaklar kabukları dilimleyerek ayırır. Bu esnada salgı ceplerinin parçalanmasıyla açığa çıkan uçucu yağ etraftan püskürtülen su ile emülsiyon yaparak dış kanaldan sürüklenir. İç borudan alınan usare iç kanaldan ilerler. Böylece usarede kabuktan gelebilecek istenmeyen acı lezzet önlenmiş olur. Polisitrus ekstraktörde ise meyveler helezon şeklinde ve rendelerle kaplı ekstraktörün içinde ilerlerken perikarptaki salgı cepleri patlar ve uçucu yağ su ile sürüklenerek toplanır. Her iki şekilde de elde edilen uçucu yağ-su emülsiyonu santrifüjler yardımıyla ayrılır. Sadece Misket limonunda sıkma

işleminde sonra buhar distilasyonu da uygulanır. Sıkma yoluyla elde edilen Narenciye esansları soğutulduklarından kumarin türevi maddelerden ibaret bir çökelti vermektedirler [8].

### 1.2.3. Çözücü Ekstraksiyonu

Drog uygun bir organik çözücü ile (benzen, hekzan, heptan gibi) ekstre edilir. Organik çözücüye geçen uçucu yağ, sabit yağ, renk maddeleri ve mumlar çözücünün alçak basınçta uçurulması sonucu elde edilirler. Bu bakiyeye konkret adı verilir. Konkret etanol ile tüketilirse kokulu maddeler alkole geçer. Alkollü ekstreden mum, yağ gibi maddelerin dondurarak ayrılması sonucu kalan ve absolü adı verilen sıvı kısım parfümeride kullanılır. Uçucu yağ eldesinde kullanılan en pahalı yöntem enfleurage (anfloraj) usulüdür. Bunun için taze drog (özellikle nadide çiçeklerin petalleri) ince bir kokusuz sabit yağ tabakası üzerine serilir. Bir müddet temasta bırakılır. Mekanik yolla veya elle toplanan petallerin yerine tazeleri konur ve petallerdeki uçucu yağların sabit yağa geçmesiyle bir süre sonra doyan sabit yağ kazınarak alınır ve etanolle ekstre edilir. Etanolün alçak basınçta yoğunlaştırılması ile absolü elde edilir. Bu usul halen, nadir de uygulansa, Fransa'da nadide parfümlerin hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir [8].

### 1.2.4. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon

Aslında genel bir ekstraksiyon yöntemidir. CO<sub>2</sub> gibi sıvılaştırılmış gazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Saf CO<sub>2</sub>'in sıvı ve gaz fazda aynı anda bulunabileceği en yüksek sıcaklık ve basınç kritik sıcaklık ve basınçtır. Bu nokta dışında gaz sıkıştırılarak sıvılaştırılmaz. CO<sub>2</sub> 'in kritik noktası 31.1°C ve 73.8 kg/cm<sup>2</sup> basınçta ve 31°C de dir. CO<sub>2</sub> inert olduğu ve toksik olmadığı için tercih edilir. İşlem sıvılaştırılmış gazın kritik noktasının civarında yüksek basınçlı ekstraksiyon kabında sirkülasyonu ile gerçekleştirilir. Çözücü gaz ekstreden basıncın değiştirilmesi ile buharlaştırılarak tamamen uzaklaştırılır. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak tekrar kullanılabilir. Elde edilen ürün diğer metotlarla elde edilenlere oranla çözücü artığı taşımadığından tercih edilmektedir. Aynı zamanda seçici bir yöntemdir [8].

### 1.3. Umbelliferae Familyasının Taksonomik Özellikleri

Tek veya çok yıllık nadiren çalimsı bitkilerden oluşmuştur. Yapraklar genellikle alternat bazen karşılıklı veya halka şeklinde dizilmiş, pennat veya ternat çok parçalı, nadiren basit ve tabanda okrea mevcuttur. Çiçek durumu genellikle birleşik umbella nadiren basit umbella, kapitulum veya indirgenmiş simoz durumu şekillerindedir. Brakte ve brakteoller çiçek durumunun tabanında bir halka şeklindedir. Her ikisinde bulunduğu gibi veya ikisi de eksik olabilir. Çiçekler alt durumlu (epigin), hermafrodit veya tek eşeylidir (bazen bitki dioik olabilir). Sepaller küçük veya eksiktir. Petaller 5 adet genellikle tepede geriye kıvrılmıştır, eşit boyda veya dıştakiler, içtekilerden daha uzundur; beyaz, sarı, sarımsı yeşil, açık mavi veya pembe renklerde olabilir. Stamenler 5 tane, ovaryum 2 nadiren tek karpelli her gözde birer ovullü, stilus 2 tane genellikle tabanında stilopodyum denilen şişkin bir bölüm bulunur. Meyve şizokarp, 2 nadiren tek karpelli, karpeller silindirik veya yandan ya da sırttan basık, karpeller genellikle birleşik veya yandan ya da sırttan basık, karpeller genellikle birleşik veya karpafor denilen bir sapla ayrılmıştır. Olgunlukta merikarplar ayrılır. Her merikarp genellikle 5 birincil (kosta), bazen aralarda 4 adet ikincil çıkıntı görülür. Çıkıntılar bazen kanatlı veya dalgalı olabilir. Çıkıntılar arasında girintiler (valekulum) bulunur. Salgı kanalları genellikle mevcuttur.

Umbelliferae familyasında ayırt edici olarak kullanılan taksonomik karakterler şunlardır; Gövdenin alt kısmında kalan fibrilli kalıntılar, yaprak boyutları, yaprak tabanında bulunan okrea, yaprakların parçalanmış şekilleri, umbellerin sayısı ve uzunluğu, brakte ve brakteollerin şekli ve bulunup bulunmadıkları, çiçek rengi, meyve şekli, üzerindeki çıkıntı (kosta) ve girintiler (valekulum) ve salgı kanallarıdır [9].

#### 1.4. Umbelliferae Familyasının Biyoloji ve Kimyası

Umbelliferae (Apiacea), çok sayıda bitki türüne ve geniş yayılış alanına sahip bir familyadır. Karakteristik çiçek durumu ve meyveleri sayesinde muhtemelen tarihi bakımdan ilk sınıflandırılması yapılan bitki gruplarından. Bu familya üzerinde dünyanın çeşitli bölgelerinde bir çok laboratuvarında araştırmalar artan bir biçimde devam etmekte, elektron mikroskoplarında morfoloji ve anatomi çalışmalarından, sitoloji ve bitki kimyası alanlarına kadar çok geniş bir yelpazede araştırmalar sürmektedir. Bu familya sekonder metabolitler bakımından oldukça zengindir. Bir çok cinsinden, kumarin, flavanoit, asetilenik bileşikler, seskiterpenik laktonlar ve uçucu yağlar elde edilmekte ve bu bileşiklerden tıbbi ve ekonomik açıdan geniş ölçüde yararlanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda Umbelliferae familyasına ait uçucu yağlarda 760 adet farklı bileşen bildirilmiştir. Bu bileşikler; monoterpenler, seskiterpenler, terpen aldehit esterleri, fenilpropan türevleri, non-terpenik alifatik bileşikler, asetilenik bileşenler, fitaldehitler ve türevleri, sülfür içeren bileşikler, azot içeren bileşikler olmak üzere gruplandırılmıştır [10].

Familyanın çeşitli taksonlarındaki sınıflandırma problemleri, taksonomistler tarafından memnun edici düzeyde halledilmiş ve floral biyolojileri ile üreme sistemleri hakkında da bir çok bilgi edinilmiştir. Bunlara ilave olarak Umbelliferae familyası kimyasal profilleri hakkında iyi bilgi edinilmiş birkaç familyadan biridir. Ekonomik ve tıbbi açıdan bakıldığında ise bu familyanın gerçekten de çok ilginç özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Umbelliferae familyası altında iki bin ile üç bin arasında bitki türü vardır ve dünya üzerinde insanların yerleşim alanları dahil tüm büyük bölgelerde yayılış göstermektedirler. Bu bitkiler için nem, tropik alanlar ve çöllerdeki bitkiler kadar önem taşımamaktadır. Bu familya üyelerinin sık rastlanan ve en çok bilinen sıcaklıklarda ve dağlık alanlarda yayılış gösterdikleri bildirilmiştir [11].

Umbelliferae familyasının bazı üyeleri, diğer üyelerden farklı olarak köklerinde tuber yapısında şişkinlikler içerirler. Bu tip kök yapısına sahip bitkiler başlıca gıda maddelerini oluştururlar. Havuç (*Daucus carota* L.) buna örnek olarak verilebilir. Havuç, insan ve hayvanlar tarafından çokça tüketilen bir

bitkidir. Aynı zamanda diğer gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılırlar. Havucun bazen de değişik yollarla ilaç olarak da kullanıldığı kaydedilmiştir.

Şifalı ot ve baharat terimleri arasında çok fark olmasa da terminolojileri şu şekildedir. Şifalı otlar genellikle kişilerin kendi bahçelerinde yetiştirdikleri, yada doğada kendiliğinden yetişen, genellikle taze olarak gıda ve içeceklerde, bazen de ilaç ya da ilaç tatlandırıcısı olarak kullanılan bitkilerdir. Baharatlar ise daha çok ticari olarak üretilen, daha egzotik ve sadece tatlandırıcı amacıyla kullanılan bitkilerdir. Her iki kategoriye de Umbelliferae bitkileri dahil olmaktadır [11].

Bazı bitkilerin yağları gıda tatlandırıcısı olarak kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak *Anethum graveolens* L.(Dereotu), *Apium graveolens* L.(Kereviz), *Bunium bulbocastanum* L., *Carum carvi* L.(Frenkkimyonu), *Coriandrum sativum* L.(Kişniş), *Cuminum cyminum* L.(Kimyon), *Daucus carota* L.(Havuç), *Eryngium foetidum* L.(Devedikeni), *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer, *Lagoecia cuminoides* L. ve *Pimpinella anisum* L.(Anason) verilebilir. İçeceklerde *Angelica archangelica* L., (Melek Otu), *Laserpitium* sp. ve bir çok baharat tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Buna ilave olarak *Pimpinella anisum*, *Heracleum sphondylium* gibi birkaç tür de alkollü içkilerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.

Tıbbi amaçlarla kullanılan bitkilerin sayısı hayli yüksektir ve genellikle gıda olarak kullanılanlardan farklıdır. Umbelliferae familyasının bir çok türü bu gruba dahil olmaktadır. Bu familyadaki tıbbi bitkiler genellikle gastrointestinal bölgedeki rahatsızlıkların giderilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin Rezene, midevi rahatsızlıklarda ve gaz söktürücü olarak kullanılmaktadır. *Ferula* türleri kabızlığa ve öksürüğe karşı kullanılırken, kimyon ishale karşı, anason da iltihaplara karşı kullanılmaktadır. Özellikle *Eryngium* sp. gibi bazı türler ürogenital sistem rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Bunlar içinde menstrual döngüyü düzenleyen havuç örnek olarak verilebilir. *Centella asiatica* L. ise frengi hastalığında ve yara iyileştirmede kullanılan bir bitkidir [1,11].

Umbelliferler aynı zamanda kardio-vasküler rahatsızlıklarda kuvvetlendirici ve direnç arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında uyarıcı, sedatif, antispazmodik, afrodisyak etkilere de sahiptirler. Ayrıca pek çoğunun yaralar için topikal uygulamalarda, haşlanma, yanma, böcek sokmaları, ısırıklar

ve deri döküntülerinde kullanıldıkları bildirilmiştir. İlginç olmakla birlikte nadiren kellik, hıçkırık ve siğillere iyi geldiği, bazen de akıl hastaları ve alkol bağımlıları üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [11].

Tıbbi alanlarından farklı olarak Umbelliferea bitkilerinden elde edilen en önemli ürünlerden biri de reçine ve zamktır. Bu bitki eksudasyon maddeleri özellikle Akdeniz ülkeleri, İran ve Hindistan tarafından elde edilmektedir. Özellikle *Ferula assa-foetida* L. ve bu cinsin diğer üyelerinin kök ve gövdelerinden Asafoetida denilen bu zamk-reçine karışımı madde elde edilmektedir. Bu ürün aynı zamanda gaz giderici ve antispazmodik olarak da kullanılmaktadır.

Bazı Umbelliferae türleri de parfüm endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu türler arasında *Angelica archangelica*, *Carum carvi*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cymium*, *Daucus carota* ve *Ferula sumbul* sayılabilir. Umbelliferler tipik bahçe bitkileri değildir. Ancak bazı üyeleri süsleme amacıyla kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak *Astrantia*, *Eryngium*, *Heracleum* ve *Trachymene* verilebilir. Umbelliferlerin diğer kullanım alanları arasında boya, mürekkep sanayii, mobilyacılık ve tütsü imalatı da vardır [11].

İlk zamanlarda, baharatların ilaç olarak kullanılamayacağı düşünülmüştür. Bu kanı genel olarak doğrudur fakat baharat olarak üretilen bir çok bitki türünden yağ veya benzeri yan ürünler elde etmek mümkündür ve bunlar geleneksel ticari ilaç sanayinde büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bitkinin meyveleri, kökleri, yaprakları nadir olarak da çiçekleri kullanılmaktadır. Bu familyanın üyeleri, batı ülkelerinde şifalı bitkiler olarak kullanılmalarının yanında, modern ilaçlar içerisinde de bu bitkilerin bileşenleri bulunmaktadır. Ancak bitkisel kaynaklı doğal bileşikler modern çağın ilaçları içerisinde yerini alamamıştır. Bu durum dünyada bitkisel ilaç hammaddesi araştırmalarının yetersiz olduğunu göstermektedir. Umbelliferlerin kullanılmamasının bir diğer nedeni de bu familya bitkilerinin alkoloitler bakımından çok zengin olmamasıdır [1, 11].

Bu çalışmaya da konu olan Umbelliferae familyasına ait bazı bitkilerin halk arasında ilaç ya da diğer amaçlarla kullanımları bildirilmiştir. Örneğin; *Angelica* türleri salatalarda sebze, gıda tatlandırıcısı ve katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Tıbbi olarak doğum kolaylaştırıcı, baş dönmesine karşı, soğuk

algınlığında, romatizmal rahatsızlıklarda, kan basıncını düzenlemede, öksürük tedavisinde kullanılırken, antispazmodik, diüretik, midevi, uyarıcı, diaforetik özelliklere de sahiptir. Halk arasında iyi bilinen Kışniş'in (*Coriandrum sativum*) meyve ve yağları gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmakta ilaç olarak ise meyveleri midevi, diüretik ve afrodisyak özelliklere sahiptir. Nadir de olsa bazı sinir hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Özellikle Ege ve Akdeniz yörelerinde yetiştirilen Rezene, (*Foeniculum vulgare*) gıda, içki tatlandırıcısı ve sebze olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında parfümeri, çeşnicilik, likör, sabun ve ekmek sanayiinde kullanımları mevcuttur. İlaç olarak; uyarıcı, midevi, öksürük kesici özelliklere sahiptir. İran'da yemeklerde baharat, katkı maddesi ve hayvan yemi olarak kullanılan *Heracleum persicum* ve *Heracleum sphondylium* bitkisinin tıbbi olarak da ishal ve dizanteriye karşı kullanıldığı bildirilmiştir. *Laser trilobum* özellikle veteriner hekimliğinde karminatif (gaz giderici) olarak kullanıldığı, *Laserpitium* cinslerinin de deri hastalıklarında kullanıldığı kaydedilmiştir. Bir diğer tıbbi bitki olan *Seseli* sp. diüretik, midevi, karminatif, diaforetik (terletici) olarak kullanılırken, bazı türleri de hayvan zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılmaktadır [1, 11].

*Ferulago trachycarpa* baharat şeklinde, tat ve koku verici, tazesi salatalarda sebze olarak kullanılmaktadır. Tıbbi bakımdan, yatıştırıcı, hazmı kolaylaştırıcı, gaz söktürücü, kurt düşürücü ve afrodisyak olarak kullanılmaktadırlar [1, 12]. Ülkemizde yaygın olarak bulunan *Echinophora teunifolia* L. subsp. *sibtorphiana* (Guss.) halk arasında "çördük, çörtük, tarhana otu" olarak bilinmektedir. Bazı yörelerde bitkinin toprak üstü kısımları kurutulduktan sonra fungusit olarak kullanıldığı bunun dışında hoş bir koku vermek üzere turşulara katıldığı bildirilmiştir [13].

### 1.5. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Yöntemler

Bitkisel ekstreler ve uçucu yağlar çeşitli amaçlar için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır [1-13]. Ancak son yıllarda farklı özelliklerinden yararlanılarak daha geniş amaçlı kullanımları ve bununla ilgili araştırmalar büyük bir hızla sürdürülmektedir. Üzerinde en çok durulan konu ise antimikrobiyal özellikleridir [14]. Bu özelliklerinden yararlanılarak uçucu yağlar, çiğ ve işlenmiş gıdaların korunmasında, modern ilaçlarda katkı maddesi ve doğal tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır [2]. Bitki ekstreleri ve uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yayınlanmış çok fazla sayıda makale bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bir çeşit uçucu yağ bir çok patojen mikroorganizmaya karşı denenirken bazen de bir çok bitki ekstresi ve yağ tek bir mikroorganizma hedef alınarak çalışılmıştır [2, 15-17].

Bu bilgiler çoğu zaman kullanışlıdır ancak, her çalışmada yöntemsel farklılıklar bulunmaktadır. Kullanılan antimikrobiyal test metotları birbirlerinden farklılıklar göstermektedir. Ayrıca seçilen yağların ya da bunların elde edildiği bitkilerin gerek toplandığı yer bakımından gerekse ekstraksiyon yöntemleri bakımından farklılıklar mevcuttur. Bu faktörlerden dolayı çalışma sonuçları arasında bazı farklılıklar olma ihtimali yüksektir [2, 14].

1960'lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç, özellikle antibiyotik duyarlılık testleri için bir çok yöntem veya bu yöntemlerin değişik bir çok modifikasyonları bildirilmiştir. Her yöntemin üstünlüğü ve kullanım alanları sınırlıdır. Sonuçları en yüksek düzeyde yorumlamak için yöntemin tüm özellikleri iyi kavranmalıdır. Bakterilerin antibiyotik duyarlılığını tayin etmede kullanılan başlıca iki temel yöntem vardır. Bu yöntemler, antibiyotiklerin seri halde dilüe edildikten sonra mikroorganizmalar ile etkileştirildiği "Titrasyon (Dilüsyon veya Sulandırma) Yöntemleri" ve besiyerine test edilecek kültürün ekilmesinden sonra besiyeri yüzeyine test maddesi emdirilmiş kağıt disk yerleştirmek suretiyle yapılan "Difüzyon Yöntemleri"dir [18].

Antibiyotiklerin duyarlılıklarını belirlemede kullanılan testler, uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Geçen



yüzyıl boyunca uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesini belirlemede birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Genelde uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek zordur. Çünkü, uçucu olmaları yanında sudaki çözünürlüklerinin az olması ve karmaşık yapıda olmaları deneyleri güçleştirmektedir. Yapılan deneyi ve sonuçları etkileyen en önemli faktörler ise; deneyin yapılış tekniği, kullanılan besi yeri, kullanılan mikroorganizma ile uçucu yağın yapısal özellikleridir [15].

Uçucu yağların, uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde aktivite gösteren özel kokulara sahip olması gibi özellikleri vardır. Uçucu yağlar, organik maddelerin kompleks bir karışım halinde bulunduğu heterojen karışımlardır. Bu son özellikleri, özellikle kokulu olanların biyolojik olarak aktif olabileceklerini ortaya koymaktadır. Gerçekten de, uçucu yağların çeşitli farmakolojik aktiviteleri bulunmaktadır. En çok rapor edilen özellikleri antimikrobiyal olanlarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkarıldığı testler belli bir standartizasyona bağlı değildir ve gelişigüzel her laboratuarda yapılabilmektedir. Kullanılan teknikler genel olarak agar difüzyon ve dilüsyon yöntemleridir [15].

Dilüsyon teknikleri bir mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılığını tayin etmek için geliştirilmiştir. Ancak bitki ekstraları veya uçucu yağlarında antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Antimikrobiyal maddenin seri olarak dilüe edilmesi ve üzerine bakteri kültürünün inoküle edilmesi esasına dayanmaktadır. İnkübasyondan sonra test edilen antimikrobiyal maddenin, kullanılan mikroorganizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olduğu üremenin varlığına veya yokluğuna göre belirlenmektedir. Üremenin varlığı ya da yokluğu bulanıklık tayiniyle yapılmakta ve üremenin olmadığı en düşük son konsantrasyon değeri, Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) değeri olarak tanımlanmaktadır [16, 18-20]. Bu teknik uzun yıllardan beri standart deney tüplerinde gerçekleştirilen makro-broth dilüsyon tekniğidir. Son yıllarda antibiyotikler dışındaki, sentetik ya da doğal antimikrobiyal maddelerin test edilmesinde, bu yöntem prensibiyle hareket eden ancak çok daha az miktarlarda besiyeri ve test maddesine ihtiyaç duyan bir yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan diğer difüzyon tekniklerine göre de çoğu zaman daha avantajlı olan ve oldukça doğru bir biçimde MİK değerini ortaya koyan mikro tüp dilüsyon ya da

mikrobroth dilüsyon metodudur. Bu metotta, ticari olarak geliştirilmiş, 80, 96 veya daha fazla kuyucuğa sahip plaklar kullanılmaktadır. Bu kuyucuk serilerinde madde dilüsyonları hazırlanmakta ve az miktarda kültürün ilavesiyle, madde ve mikroorganizma etkileştirilmektedir. İnkübasyondan sonra bulanıklık tayiniyle üremenin varlığı veya yokluğu belirlenmektedir. Bulanıklık tayin işlemi basitçe gözlem yapmak ya da özel bulanıklık okuyucuları kullanmak suretiyle de yapılabilmektedir. Bu yöntem en çok antibiyotikler için kullanılsa da bitki ekstraları ve uçucu yağlar için de kullanılmaktadır. En önemli avantajı 10-25 µl uçucu yağ ile deneyin gerçekleştirilmesidir. Çünkü uçucu yağların bol miktarda elde edilmesi oldukça zordur. Bir diğer avantajı da aynı anda bir çok maddenin test edilmesine imkan sağlamasıdır [14, 18-22].

Bu yöntem kullanılarak çeşitli maddelerin antimikrobiyal özellikleri ortaya konmuştur [2, 21, 23]. Hammer ve ark. [2] yaptığı bir çalışmada 20 bitkiye ait uçucu yağ mikrodilüsyon broth yöntemini kullanarak test etmiş, 16 uçucu yağın %2 lik (v/v) konsantrasyonunda, kullandıkları tüm test mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiğini diğer 4 uçucu yağın ise MİK değerlerinin %8 (v/v) değerinden büyük olduğunu ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada 22 uçucu yağ, 6 adet fungusu karşı denenmiş, uçucu yağların zayıf antifungal aktiviteye sahip olduğu ve MİK değerlerinin 5000 µg/ml den büyük olduğu ortaya çıkarılmıştır [23]. Mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada da *Combertum molle* bitkisinin ekstresi, *Staphylococcus aureus*' a karşı denenmiş ve MİK değerini 0.56 mg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma da tetrazolyum tuzları kullanılarak mikrotitrasyon petrilerinde sonucu değerlendirmenin daha kolay olduğu ortaya konmuştur [21].

Antimikrobiyal testlerde kullanılan bir diğer metot da agar difüzyon metodudur. Uçucu yağların test edilmesinde kolaylığından dolayı en çok bu teknik tercih edilmektedir. Agar difüzyon tekniği, 1940'ların başından beri çeşitli maddelerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kalitatif ve yarı kantitatif bilgiler bu metotla ortaya çıkarılabilmektedir. Agar difüzyon tekniğinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir çukur sistemiyle, test organizmasının bulunduğu uygun bir besiyeri kullanılmaktadır. Besiyerine üzerine, belirli ölçüde açılan çukurlara homojen olarak çözülmüş

uçucu yağ koyulur. Çukurlar besiyeri ile temas halindedir. Bu yöntemde bazen besiyeri üzerinde çukur açmak yerine, uçucu yağ emdirilmiş kağıt disklerde kullanılmaktadır. Sonuç olarak gerek çukurlardan gerekse kağıt disklerden önceden mikroorganizma ile aşılınmış besi yerine, uçucu yağ difüze olmaktadır. Kullanılan maddenin yapısal özelliği difüze olma yüzdesini veya süresini etkileyebilmekte bu durum da deney sonuçlarında etkili olabilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında belirgin, üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmaktadır. Bu yöntemde uygulanan yağ miktarı ve kullanılan diskin veya çukurun çapı önemli parametrelerdir. Çünkü inkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları bu parametrelerin kontrolündedir. Çukurun açıldığı besiyerinin kalınlığı da inhibisyon zonunun çapını etkilemektedir. İnhibisyon zonunun oluşması için belirli bir sürenin geçmesi gerekir. Bu süreye “kritik zaman” ( $T_{crit}$ ) denilmektedir. Bu zamandan önce inhibisyon zonları belirginleşmeyebilir ya da bu sürenin üzerinde inkübasyon yapıldığında oluşan zonlar kaybolmaya başlamaktadır. Bunun yanında kullanılan inokulumun yoğunluğunun da belirli ve sabit olması gerekmektedir. Çünkü, normalde etki gösterecek olan bir madde, yüksek mikroorganizma konsantrasyonundan dolayı etkisiz görünecek, inhibisyon zonu oluşturmayacaktır veya gerçek ölçülerde olmayacaktır. Bu nedenle inokulum konsantrasyonu kritik seviyede tutulmalıdır. Eğer mikroorganizma yoğunluğu olması gereken değerinde ise inkübasyon süresinin uzunluğu o kadar da önemli olmamaktadır. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları bir cetvelle ölçülerek kaydedilir. Çukurcuklara maddenin artan ya da azalan konsantrasyonları koyularak oluşan zonların çaplarının da doğru orantılı olarak artması ya da azalması beklenir. Ancak agar difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapları değerleri ve buna karşılık gelen madde konsantrasyonları ile gerçek MİK değerleri arasında kesinlikle bir paralellik olduğu ancak elde edilen zon çaplarının MİK değerleriyle gereken uyumu göstermediği bildirilmiştir [14, 15, 17, 18, 20].

Yapılan bir çalışmada *Peucedanum cervaira* (L.) bitkisinin köklerinden izole edilen Falcarindiol ve Juglon maddeleri, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* ve *Fusarium avenaceum* mikrofunguslarına karşı kağıt disk difüzyon yöntemi kullanılarak denenmiştir. 9mm'lik kağıt disklere 20µl maddenin

çözeltilisinden emdirilerek, üzerinde  $10^4$  cfu/ml spor solüsyonu bulunan besiyerine yerleştirilmiştir. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve kağıt diskteki madde miktarı MİK değeri olarak verilmiştir. Aynı zamanda mikrodilüsyon broth metodu da denenmiş ve iki yöntem sonuçlarının hemen hemen birbirine benzediği rapor edilmiştir [20]. Yapılan bir diğer çalışmada çeşitli ticari bitkisel ekstraların, bir grup bakteri ve fungusa karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Deneyin sonucunda 7 mm den 31 mm ye kadar değişen inhibisyon zonları kaydedilmiş, simültane olarak denenilen standart antibiyotik ve antifungal maddelerden kimi zaman daha yüksek inhibisyon zonlarının meydana geldiği bulunmuştur. Araştırma sonucunda genel olarak maddelerin daha çok antibakteriyel etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur [24]. Seçilen 35 Türk tıbbi bitkisinden 76 ekstrenin elde edildiği bir çalışmada, bu ekstralar *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans*'a karşı agar difüzyon yöntemiyle denenmiştir. 1 ile 11 mm arasında inhibisyon çapları ölçülmüş ve en güçlü aktivite *Perganum harmala* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinin ekstralarında gözlenmiştir [25]. Mehrabian ve ark. [26] tarafından yapılan bir çalışmada *Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* ve *Juglans regia* bitkilerinin sulu, metanolik ve kloroformik ekstralarının, havayla taşınan bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal etkileri agar difüzyon yoluyla belirlenmeye çalışılmıştır. Saboraud Dextrose Agar plakları üzerinde 6.4 mm çapında çukurcuklar açılarak içlerine 200'er µl ekstre koyulmuştur. Çalışma sonucunda özellikle *Carthamus tinctorius* bitkisinin sulu ekstresinin tüm mikroorganizmalara karşı, (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*) etki gösterdiği ve 25-40 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturduğu bildirilmiştir. Diğer bitki ekstralarının da orta derecede antimikrobiyal etkiye sahip oldukları kaydedilmiştir.

Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan diğer bir yöntem de biyootografidir. Biyootografi yöntemi bitki ekstralarının veya saf maddelerin hem bitki hem de insan patojenlerine karşı denenmesinde oldukça kolay ve doğru sonuçlar veren bir yöntemdir. Bu yöntemde uçucu yağın antibakteriyel özellikleri yanında asıl olarak

uçucu yağı oluşturan organik bileşenlerden hangisinin aktiviteden sorumlu olduğu ortaya koyulmaktadır. Bu yöntem agar difüzyon tekniğinin prensiplerine dayanmaktadır. Ancak test edilecek maddenin uygulanaşı ve sonuçların değerlendirilmesi bakımından farklılıklar göstermektedir. En büyük farklılık yöntemde ince tabaka kromatografisi (İTK) tekniği kullanılmakta, uçucu yağ İTK plaklarına uygulandıktan sonra test mikroorganizmalarıyla etkileştirilmektedir. İTK tekniği yardımıyla uçucu yağdaki bileşenler kabaca ayrılarak, aktiviteden sorumlu bileşen ortaya çıkarılmaktadır. Yöntemde test maddesi iki İTK plağına birden uygulanmakta ve plaklardan biri referans plak olarak kabul edilmektedir. Diğer deneyde mikroorganizmaların uygulandığı plaktır. Referans plak reaktiflerle renkli hale getirilerek ya da 254 veya 366 nm UV ışığı altında incelenerek fraksiyonlar işaretlenmektedir. Deneyde kullanılan plağın inkübasyonundan sonra, hangi maddenin üzerinde inhibisyon zonu olduğu belirlenerek o maddenin  $R_f$  değeri hesaplanmaktadır.  $R_f$  değeri (Retention Factor, Tutunma Faktörü), maddenin plak üzerinde yürüdüğü mesafenin, çözücünün yürüdüğü mesafeye oranı hesaplanarak bulunmaktadır. Referans olarak saklanan İTK plağındaki maddeler ile inhibisyon zonlarının oluştuğı maddelerin  $R_f$  değerleri karşılaştırılarak zonu oluşturan madde işaretlenmekte ve bu aşamadan sonra zonu oluşturan madde çeşitli yöntemlerle referans plaktan izole edilerek tayin yoluna gidilmektedir. Aslında biyootografi yöntemi antibiyotikler gibi antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan bileşikler ortaya çıkarmak için uygundur. Bitki ekstraheleri veya benzeri organik bileşikler içinden de en aktif olan bileşenleri ortaya çıkarmaktadır. Bu güne kadar üç biyootografik metot bildirilmiştir. Bunlar; mikroorganizmanın doğrudan İTK plağı üzerinde geliştirildiğı direk biyootografi yöntemi (a), İTK plağında yürütülen maddenin plaktan izole edilerek mikroorganizma ile inoküle edilmiş bir besiyerine aktarılmasıyla gerçekleştirilen kontak biyootografi yöntemi (b) ve son olarak da belirli bir mikroorganizma ile inoküle edilmiş besiyerinin İTK plağının üzerine dökülmesiyle gerçekleştirilen immersiyon biyootografi ya da “Agar-overlay biyootografi”(c) yöntemleridir. Bu son yöntem direk biyootografi ile kontak biyootografinin birleştirilmesinden oluşmaktadır. Direk biyootografi daha çok bakteriler ve spor üreten funguslar için kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça duyarlıdır ve deney sonunda oldukça net

inhibisyon zonları gözlenebilmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı da İTK plağı üzerinde mikroorganizmaların gelişme zorluğudur. Kontak biyootografi yönteminde bu sorun yoktur ancak İTK plağından maddenin izolasyonu ve transferi bazı problemler doğurmaktadır. Alınan madde miktarı veya İTK da birbirine çok yakın gelmiş maddeler birlikte alındığı için sonuçların duyarlılığı ve doğruluğu tartışmalı hale gelmektedir. Olması gerekenden daha büyük inhibisyon zonları oluşmakta, bu da aktif bileşenler arasındaki ayrımın tam olarak yapılamamasına neden olmaktadır. Her iki yöntemin karışımı olan immersiyon biyootografi tekniğinin ise daha çok mayalar ve bakteriler için kullanıldığı bildirilmiştir. Belirli miktarda besiyerinin İTK plağının üzerine dökülmesiyle aktif bileşenler yerinde test edilmekte ve yeteri kadar besi yeri kullanıldığı için herhangi bir üreme problemi olmamaktadır. Aktif bileşenlerin farklı difüze olma katsayıları bu tekniğin problemidir. Buna çözüm olarak İTK plağı üzerine dökülen besiyerindeki agar miktarı azaltılarak yumuşak bir besi ortamı elde edilmekte bu sayede plak üzerindeki bileşenlerin inoküle edilmiş agar içine difüzyonları kolaylaştırılmaktadır. Bu üç yöntemden hangisi kullanılırsa kullanılsın, inkübasyondan sonra oluşması beklenen inhibisyon zonlarının belirlenmesi ya da gözle görülür bir hal almasını sağlamak için genel olarak tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Bu reaktif maddeler mikroorganizmaların mor bir renk almasını sağlayarak, mor bir arka planda renksiz inhibisyon zonlarının oluşmasını sağlamaktadır [14-16, 27-32].

Rahalison ve ark. [28] *Swartzia madagascariensis* (Leguminosae) bitkisinin ekstrelerini biyootografi yöntemiyle *Candida albicans*'a karşı değerlendirmişler ve deneyin sonucunda İTK plağı üzerinde  $R_f$  0.5 ve 0.82 değerlerinde iki ayrı inhibisyon zonu gözlemişlerdir. Reaktif madde uygulanan referans plakta gözlenen maddelerin, zonu oluşturanlarla birebir aynı konumda oldukları gösterilmiş ancak zonu oluşturan maddelerin tayini yapılmamıştır. Ayrıca bu ekstrenin mikrobrot dilüsyon yoluyla *C. albicans*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği de bildirilmiştir.

Biyootografi yöntemiyle yapılan bir diğer çalışmada, *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) bitkisinin farklı çözücülerle elde edilmiş ekstreleri, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* ve *Pseudomonas*

*aeruginosa* 'ya karşı denenmiş ve *S. aureus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Biyogram plağında 14 ayrı aktif fraksiyon olduğu, ve bu fraksiyonların üzerinde net gözlenebilen zonların olduğu bildirilmiştir. Ancak bu fraksiyonların hangi maddeler olduğu aydınlatılmamıştır [30].

Nostro ve ark. [31] tarafından *Staphylococcus aureus* kullanarak, *Helichrysum italicum*, *Hieracium pilosella*, *Lonicera caprifolium*, *Nepeta cataria*, *Phytolacca dodecandra* ve *Plantago lanceolata* bitkilerinin çeşitli organlarından hazırlanan ekstreler biyootografi tekniği ile denenmiş ve *N. cataria*, *H. italicum*, *P. dodecandra* ekstrelerinin çok net gözlenebilen zonlar oluşturdukları bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada da farklı ülkelere ait *Mentha piperita* L. (nane) uçucu yağları *Candida albicans*'a karşı biyootografi yöntemi kullanılarak denenmiş ve inhibisyon zonları gözlenmiştir. Bu zonları oluşturan maddeler izole edilmiş ve GC/MS analizi ile tayin edilmiştir. Sonuç olarak nane uçucu yağının *C. albicans*'a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etkinin mentolden ileri geldiği bildirilmiştir [33].

Uçucu maddelerin özellikle de bitkisel uçucu yağların buhar fazındaki antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. En kullanışlı yöntem mikro-atmosfer metodudur. Bu yöntemin genellikle filamentli funguslar için daha uygun olduğu bildirilmiştir. Yöntemde, besiyeri içeren 120 mm ebatlı petri kapları kullanılmaktadır. Steril distile suda hazırlanan fungal sporlar, son konsantrasyonu  $10^4$  spor/spot olacak şekilde besiyerinin merkezine spotlar halinde inoküle edilir. Petri kabının çapı ebadında filtre kağıdına test edilecek yağ, saf olarak değişik miktarlarda emdirilir. Kontrol olarak kullanmak amacıyla plaklardan birine yalnızca mikroorganizma inoküle edilir, test maddesi uygulanmaz. Uçucu yağın farklı miktarlarını denemek için ayrı ayrı petri kapları kullanılmaktadır. Hazırlanan filtre kağıdı petrinin kapağına yerleştirilerek, petri kabı kapatılır ve ters şekilde de 2 ve 12 gün süreyle inkübe edilir. Bu 12 günlük süre boyunca plaklar kontrol edilerek inoküle edilen mikroorganizmanın gelişme durumu kontrol edilmektedir. Bu yöntem ile havadaki fungal ya da bakteriyel yükün yok edilmesi veya zararsız hale getirilmesinde uçucu yağların

kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Bu sayede insanlara zarar vermeden kütüphane, müze, hastane, sinema vb. mekanların atmosferini mikrobiyal flora için uçucu yağlarla koruma şansının olabileceği bildirilmiştir. [23]. Bu yöntemin bazı modifikasyonları mevcuttur. Bazı araştırmacılar saf uçucu yağ filtre kağıdına emdirmek yerine, petri kabının kapak kısmına direk olarak koymak yoluyla inhibisyonu gözlemişlerdir. Uçucu yağın kaybını engellemek için petri kabının çevresi parafilm ile kaplanmakta ve yine ters biçimde inkübasyona bırakılmaktadır. 3 günlük inkübasyon süresi sonunda petri kabı açılarak uçucu yağın buharı salınmakta ve bir 3 gün daha inkübasyona bırakılmaktadır. Bu ikinci kez yapılan inkübasyon uçucu yağın antimikrobiyal etkisinin bakterisidal özellikte olup olmadığının belirlenmesini sağlamaktadır. Eğer uçucu yağ buharı yalnızca mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmişse bu süre sonunda plaktaki mikroorganizmaların gelişeceği bildirilmiştir [34]. Bazı araştırmacılar, uçucu yağları değişik çaplarda filtre kağıtlarına emdirip, farklı miktarlarda uygulayarak, uçucu yağın değil de buhar basıncının bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla uçucu saf maddeler denenmiş ve sonuç olarak buhar basıncının uçucu yağın buhar faz aktivitesini desteklemediği ortaya konmuştur [15].

Mikro-atmosfer yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 37 bitkiye ait uçucu yağ, müze ve kütüphane havasından izole edilen funguslara karşı denenmiş, *Cymbopogon martinii* ve *C. nardus* bitkilerine ait uçucu yağların buhar fazlarının *Aspergillus amstelodami*, *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, *Stachybotrys atra* ve *Myrothecium verrucaria*'ya karşı güçlü fungistatik aktivite gösterdiği bildirilmiş ve bu iki bitkiye ait uçucu yağların kapalı mekanların korunmasında kullanılabileceği rapor edilmiştir [23].

Basım ve ark. [34] *Thymbra spicata* L. var. *spicata* bitkisinin uçucu yağını, ekonomik bakımdan önemli bitki patojenleri olan *Erwinia amylovora*, *E. caratovora* pv. *caratovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* bakterilerine karşı denemiş ve sırasıyla 59, 569, 91, 684, 98 ve 41mg/ml lik konsantrasyonları minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) olarak bildirmişlerdir.



## 1.6. Ames *Salmonella* Mutajenite Testi

Gıda ve gıda katkı maddeleri, baharat veya folklorik olarak çok geniş kullanım alanı bulan bitkisel kaynaklı her türlü madde insanlar tarafından kullanıldıklarından, insan sağlığı üzerinde birebir etkilidir. Bu maddelerin çoğunun artık ticari olarak üretildiği göz önüne alınırsa bunların toksikolojik ve kanserojenik etkilerinin belirlenmesi insan sağlığının korunması bakımından kaçınılmazdır [35].

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en doğru yaklaşım deney hayvanlarında tümör indükasyonudur. Fakat bu testlerin sonuçlanması uzun sürmekte ve maliyeti yüksek olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar karsinojenite taramalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuçlanan ve düşük maliyetli birçok mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye olanak sağlamaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel test sistemleridir. Bunlara örnek olarak, SCE (Sister Chromatid Exchange) yöntemi, Comet testi, CA (chromosome abberation) testi, Mikronukleus testi, UMU testi ve Ames *Salmonella*/mikrozom yöntemleri sayılabilir. Bakteriyel testlerin tercih edilme nedenleri; bakterilerin basit ortamlarda hızla üreyebilmeleri, çabuk ve ucuz uygulanabilmeleridir [36].

Ames tarafından geliştirilmiş olan ve Ames testi olarak da adlandırılan *Salomonella*/Mikrozom test sistemi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir. Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş ( $\text{His}^-$  = oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamelesinden sonra tekrar bir mutasyon geçirip  $\text{His}^+$  haline dönüşmesi esasına dayanır. Geri dönüşen (revertanat) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normal olarak mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler de olmaktadır. Mutajenik etkiden söz edebilmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni sayılması gerekmektedir. *S. typhimurium* TA 98 suşu için kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı 30-50, TA 100 suşu için ise 120-200

koloni arasında bulunmuştur. Kullanılan bu suşların genetik bazı özellikleri vardır:

**Histidin Mutasyonu:** Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesi ile ortaya çıkan baz değişimleri ya da bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Test edilen bileşiğin neden olduğu mutasyonun esas mekanizması, moleküler düzeyde bu suşlarla gösterilebilir. Başlangıçta geliştirilen His<sup>-</sup> mutantlarının çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını arttırmak üzere, bu suşlara bazı mutasyonlar daha eklenmiştir.

**Rfa Mutasyonu:** Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Hücre duvarının lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasını sağlayan rfa mutasyonu sonucu normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerin hücre içine girişi kolaylaştırılmıştır.

**UvrB Mutasyonu:** Bu mutasyon, DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan *uvrB* genindeki delesyon sonucu oluşturulmuştur. *UvrB* mutasyonu, bir çok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. Ancak, teknik nedenlerden dolayı *uvrB* geninin kesilerek uzaklaştırılması sırasında bu delesyon, biotin (bio) genine kadar uzanmaktadır. Bu nedenle, bakteriler üreyebilmeleri için histidinin yanı sıra biotine de gereksinim duyarlar.

**R Faktörü:** Mutajenlerin daha iyi tayin edilebilmeleri amacıyla *S. typhimurium* TA1538 ve TA1535 suşlarına, ampisilin antibiyotiğine karşı dirençlilik geni taşıyan pKM 101 R faktörü plazmidin eklenmesiyle *S. typhimurium* TA98 ve TA100 suşları elde edilmiştir [37, 38].

### 1.7. Mutasyon ve Mutasyon Çeşitleri

Organizmaların genetik olarak bir kalıtsal durumdan diğerine değişme eğilimi vardır. Genetikçiler, mutasyonun yer aldığı iki farklı durumu belirlemişlerdir. Gen mutasyonunda bir gen aleli değişerek farklı bir alel olur. Böyle bir değişim tek bir gen içinde olduğundan ve bir kromozomal lokusta haritalandığından gen mutasyonuna bazen nokta mutasyonu da denir. Diğer mutasyon çeşidi de kromozom mutasyonları olup, kromozom segmentleri, bütün

kromozomların ve hatta kromozomun tüm takımının değişimi anlamında kullanılır. Başka bir ifadeyle, kromozom mutasyonları, sayısal kromozom mutasyonları ya da yapısal kromozom mutasyonları başlıkları altında incelenir [39].

### **1.7.1. Sayısal Kromozom Mutasyonları**

Kromozom sayıları mayoz ve mitoz bölünmeler sırasında kendiliğinden hücre içinde değişebilir. Bu sayede organizmalarda kromozom sayıları farklı hücrelerin oluşmasına neden olur. Bu olay gezegende yaşam var olduğundan beri sürmektedir. Gerçekten kromozom sayısındaki değişimler, evrim sürecinde genomun oluşmasında araç olmuştur. Kromozom sayılarının anormalliği öploidi (monoploit kromozom sayısının çoklu katlarının oluşması) ve anöploidi (normal kromozom setinden bir kromozomun eksilmesi ya da ilave olması durumu) olmak üzere iki tiptedir [39].

### **1.7.2. Yapısal Kromozom Mutasyonları**

Genel olarak, kromozomlar kendiliğinden kırılabilir, ya da iyonize edici radyasyon, fiziksel stres ya da kimyasal bileşiklerle kırılabilir. Kromozom mutasyonlarında kromozom sayısı aynı kalmakla birlikte, kromozomlarda bazı parçaların kaybolması (delesyon), fazlalaşması (duplikasyon), kromozomal bir segmentteki dizilişin değişmesi (inversiyon) ve kromozomal segmentlerin ve taşıdıkları gen dizisinin pozisyon değiştirmesi gibi durumlar sayesinde genetik materyal değişime uğramaktadır [38, 39].

### **1.7.3. Gen Mutasyonları**

Bir genin genomdaki sayısı veya kromozom üzerindeki yeri değişmeden yapısının değişmesine gen mutasyonu denir. Bu yapı değişimleri o gene ait baz çiftlerinin değişmesi, eklenmesi veya delesyonu ile gerçekleşmektedir. Bu mutasyonlar DNA üzerindeki tek bir baz çiftini etkiledikleri için nokta

mutasyonlar adını da almaktadır. Mutasyonlar kendiliğinden olabilmektedir. Fakat laboratuvar ortamlarında mutantlar yaratmak için fiziksel veya kimyasal ajanlar kullanılarak mutasyon oranı yükseltilmektedir. Bu oran spontan mutasyon oranından oldukça yüksektir. Her iki şekilde de gerçekleşen mutasyonlar arasında kalitatif farklılıklar yoktur. Gen mutasyonları mikroskopla gözlenemezler, baz sırasının veya AT/GC oranının değişmesi o genin ürettiği proteinin kaybolmasına ve etkisinin azalmasına ya da yok olmasına neden olur. Gen mutasyonları somatik hücrelerde, gametlerde veya onları verecek olan ana hücrelerde oluşabilir. Mutasyonlar sonucunda genellikle dominant genler resesif hale geçer. Bazı durumlarda ise mutasyonla meydana gelen resesif bir gen başka bir mutasyonla tekrar kendisini veren dominant gene dönebilmektedir. Bu olaya geri mutasyon adı verilmektedir. Geri mutasyonun meydana gelme olasılığı, mutantı oluşturan ileri mutasyonun meydana gelme olasılığından düşüktür. Nokta mutasyonların da bazı çeşitleri vardır:

#### **1.7.3.1. Transisyon mutasyonları**

Baz çiftinin değişimi daha spesifik olmaktadır. Yani bir pürin yerine başka bir pürinin, bir pirimidin yerine başka bir pirimidinin girmesi ile meydana gelmektedir. 4 tipi vardır. AT yerine GC, GC yerine AT, TA yerine CG veya CG yerine TA baz çiftlerinin gelmesiyle gerçekleşir [39].

#### **1.7.3.2. Transversiyon mutasyonları**

Diğer bir spesifik baz değişim şeklidir. Bir pürin-pirimidin baz çifti yerine pirimidin-pürin baz çifti gelmektedir. 4 tipi vardır. AT yerine TA, GC yerine CG, AT yerine CG veya GC yerine TA baz çiftlerinin gelmesiyle gerçekleşir.

### 1.7.3.3. Yanlış anlamlı (Missense) mutasyonlar

DNA'daki bir baz çiftinin değişmesi ile mRNA kodonunda değişikliğe neden olan ve farklı bir aminoasitin polipeptide katılmasını sağlayan dolayısıyla fenotipe yansıyan mutasyonlardır.

### 1.7.3.4. Anlamsız (Nonsense) mutasyonlar

DNA'daki bir baz çiftinin değişmesi, translasyon sırasında olmaması gereken yerde aminoasit zinciri sonlandırma kodonu (UAG, UAA veya UGA) haline dönüşerek polipeptid zincirinin sentezini yanlış yerde durdurmasıyla, tamamlanmamış protein parçalarının oluşmasına neden olan mutasyonlardır.

### 1.7.3.5. Doğal (Neutral) mutasyonlar

Anlamsız mutasyonlarda olduğu gibi DNA'daki bir baz çiftinin değişmesi ile mRNA kodonunda değişikliğe neden olan ve farklı bir aminoasitin polipeptide katılmasını sağlayan ancak, oluşan bu aminoasitin kimyasal bakımdan asıl oluşması gerekenden bir farklılık göstermediği mutasyonlardır. Yani sonuçta oluşan proteinin kimyasal ya da fonksiyonel özelliğini değiştirmeyen mutasyonlardır.

### 1.7.3.6. Sessiz (Silent) mutasyonlar

Aynı anlamsız mutasyonda olduğu gibi bir baz çiftinin yer değiştirmesiyle meydana gelir, ancak meydana gelen aminoasit zaten kodlanması gereken aminoasittir.

### 1.7.3.7. Çerçeve kayması (Frameshift) mutasyonları

Gene bir ya da daha fazla sayıda baz çiftlerinin eklenmesi veya genden eksilmesiyle gerçekteşir. Bir baz çiftinin eklenmesi veya eksilmesi ile mRNA

kodonu okunduğunda mutasyonun gerçekleştiği yerden itibaren tüm bölge değişecektir ve sonuç olarak sentezlenen proteinin yapı ve fonksiyonu tümüyle bozuk olacaktır.

### **1.8. Mutasyonun Nedenleri ve Mutajenler**

Bir gen yapısındaki nükleotidlerin sırasındaki değişiklikler, DNA kendini eşlerken meydana gelen tesadüfi hatalarla olabileceği gibi belirli etkenlerden dolayı da ileri gelebilmektedir. Mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal özellikte etkenler belirlenmiştir. Fiziksel mutajenlere; iyonize edici ışınlar, UV ışınları, ısı, basınç ve nem değişimleri örnek olarak verilebilir. Kimyasal mutajen çeşitleri çok daha fazla sayıda olup günümüzde sürekli geliştirilip çoğaltılmaktadır. Kimyasal mutajenlerin etki mekanizmaları birkaç şekilde olmaktadır. Bazlarda yapısal değişiklikler meydana getirebilirler, mevcut bazların yerine baz analogları olarak geçebilirler. DNA replikasyonu sırasında bir nukleotidi eksilterek veya ekleyerek ya da bazların birbirleri ile yer değiştirmesini sağlayarak etki gösterebilirler [38, 39].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Uçucu Yağlar

Çalışmada kullanılmak amacıyla, Umbelliferae familyasına ait 14 farklı bitki türünden (Çizelge 2.1.) hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilmiş uçucu yağlar ve çalışmada kullanılan 1-Oktanol,  $\delta$ -3-Karen ve Metil öjenol, Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi'nden (TBAM) temin edilmiştir.

Çizelge 2.1. Uçucu Yağları Elde Edilen Bitki Türleri ve Kaynakları

Kod	Bitki Türü	Elde Edilen Kısım	Kaynak
A	<i>Echinophra teuifolia</i> subsp. <i>sibtorphiana</i> (Guss.) Tutin	Herba	ESSE: 13039
B	<i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>ternatum</i> (Velen) Brummit	Dövülmüş meyve	ESSE: 12874
C	<i>Heracleum persicum</i> Desf.	Dövülmüş meyve	K.H.C. Başer, İran, 1996
D	<i>Heracleum argaeum</i> Boiss.&Bal.	Dövülmüş meyve	Z. Aytaç, No: 7502
E	<i>Heracleum platytaenium</i> Boiss.	Dövülmüş meyve	ESSE: 10636
F	<i>Seseli campestre</i> Besser	Dövülmüş meyve	ESSE: 12431
G	<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	Dövülmüş meyve	H. Yörükoğlu, İzmir, 1993
H	<i>Laserpitium petrophilum</i> Boiss.&Heldr.	Herba	ESSE: 11323
I	<i>Laser trilobum</i> (L.) Borkh	Dövülmemiş meyve	H. Şahin Kekik ve Baharat Ticaret, Alanya, 1991
J	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Dövülmüş meyve	K.H.C. Başer, Silifke, 1994
K	<i>Ferulago asparagifolia</i> Boiss.	Dövülmüş meyve	ESSE: 11644
L	<i>Ferulago trachycarpa</i> Boiss.	Herba	ESSE: 12667
M	<i>Ferulago cassia</i> Boiss.	Dövülmüş meyve	ESSE: 11540
N	<i>Angelica sylvestris</i> L. var. <i>sylvestris</i>	Dövülmüş meyve	K. Günaydın, İSTO: 27599

ESSE : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu

İSTO.: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Herbaryumu

### 2.1.2. Antimikrobiyal Testlerde Kullanılan Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal etki testlerinde kullanılmak üzere farklı kaynaklardan toplam 22 adet mikroorganizma temin edilmiştir (Çizelge 2.2.).

**Çizelge 2.2.** Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları

	Mikroorganizma	Kaynak
1	<i>Escherichia coli</i> (NRRL B-3008)	U.S. Agricultural Research Service
2	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
4	<i>Enterobacter aerogenes</i> (NRRL B-3567)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
5	<i>Proteus vulgaris</i> (NRRL B-123)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
6	<i>Salmonella typhimurium</i> (NRRL B-4420)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
8	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
9	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
10	<i>Bacillus cereus</i> (NRRL B-3711)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
11	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
12	<i>Xanthomonas campestris</i> (NRRL B-1459)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
13	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (TPPB 5001)	Ankara Ziraat Araştırma Merkezi, K. Benlioğlu
14	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ırk-1 (TPPB 4101)	Ankara Ziraat Araştırma Merkezi, K. Benlioğlu
15	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (TPPB 4212)	Ankara Ziraat Araştırma Merkezi, K. Benlioğlu
17	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (TPPB 4250)	Ankara Ziraat Araştırma Merkezi, K. Benlioğlu
18	<i>Candida albicans</i> (Klinik İzolat)	Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi
19	<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 9807)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
20	<i>Aspergillus paraciticus</i> (NRRL-2999)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
21	<i>Fusarium solani</i> (ATCC 12820)	Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
22	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi



### **2.1.3. Ames *Salmonella*/Mikrozom Testinde Kullanılan Mikroorganizmalar**

İn-vitro mutasyonlarla elde edilen *Salmonella typhimurium* TA98, (NRRL B-4279) ve *Salmonella typhimurium* TA100, (NRRL B-4280) suşları Ames testinde kullanılmak üzere Birleşik Devletler Tarımsal Araştırma Merkezi'nden (Northern Regional Research Laboratory) temin edilmiştir.

### **2.1.4. Deney Hayvanları**

Üzerinde çalışılan uçucu yağların metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak için kullanılması gereken mikrozom ekstresi, 200 gr ağırlığında erkek ratlardan (Wistar) hazırlanmıştır. Ratlar, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

## 2.1.5. Antimikrobiyal Testler İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

### 2.1.5.1. Mueller Hinton Broth (Merck)

#### Tek Kuvvet

Et Ekstresi.....	2.0 gr
Kazein Hidrolizatı.....	17.5 gr
Nişasta.....	1.5 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

#### Çift Kuvvet

Et Ekstresi.....	4.0 gr
Kazein Hidrolizatı.....	35 gr
Nişasta.....	3.0 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.

### 2.1.5.2. Mueller Hinton Agar (Mast Diagnostic)

Et Ekstresi.....	5 gr
Agar.....	12.0 gr
Kazein Hidrolizatı.....	17.5 gr
Nişasta.....	1.5 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 15'er ml 90 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

### 2.1.5.3. Sabouraud Dextrose Agar (Difco)

Bacto Pepton.....	10 gr
Bacto Dekstroz.....	40 gr
Bacto Agar.....	15 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 25'er ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüş ve düz bir zeminde katılaşması sağlanmıştır.

### 2.1.5.4. Nutrient Agar (Merck)

Nutrient Agar.....	20 gr
Distile Su.....	1000 ml

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 20'şer ml 120 mm çapındaki steril petri kaplarına dökülmüştür.

### 2.1.5.5. Yumuşak Agar

Mueller Hinton Broth (Merck).....	21 gr
Bakteriyolojik Agar (Acumedia).....	7.5 gr
Distile Su.....	1000 gr

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 100 ml'lik steril erlenlere 20'şer ml aktarılmıştır.

### 2.1.5.6. TTC Tuzu (Sigma)

2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride.....	250 mg
Etanol (%96).....	100 ml

Madde tartılarak etanolde iyice çözülmüş ve sprey özellikli cam şişe içinde buzdolabında saklanmıştır.

### 2.1.5.7. Anisaldehit/Sülfirik Asit

Anisaldehit.....	15 gr
Etanol (%96).....	250 ml
Konsantre Sülfirik asit.....	2.5 ml

Karışım etanolde çözüldürülerek, cam şişede +4°C de saklanır.

### 2.1.5.8. McFarland No: 0.5 bulanıklık standardı

BaCl <sub>2</sub> (%1.175).....	0.5 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.36N).....	99.5 ml

BaCl<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karıştırılarak 15 ml lik kapaklı tüplere dağıtılır. Kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

### 2.1.5.9. McFarland No: 5 bulanıklık standardı

BaCl <sub>2</sub> (%1.0).....	0.5 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%1.0).....	9.5 ml

BaCl<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karıştırılarak 15 ml lik kapaklı tüplere dağıtılır. Kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

## 2.1.6. Ames Testi İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

### 2.1.6.1. (50x) Vogel Bonner Medium

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	10 gr
Sitrikasit Monohidrat.....	100 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	500 gr
NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O).....	175 gr
Distile Su (45°C).....	670 ml

Maddeler sırasıyla, manyetik karıştırıcı üzerinde, suya ilave edilerek çözündürülür ve hacim 1 litreye tamamlanır. 121°C de 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir [37].

### 2.1.6.2. Histidin / Biotin solusyonu (0.5mM)

D-Biotin (Merck).....	30.9 mg
L-Histidin (Fluka).....	24.0 mg
Distile Su.....	250 ml

D-Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür daha sonra L-Histidin ilave edilerek otoklavlanır. +4°C de saklanır [37].

### 2.1.6.3. Ampisilin solusyonu

Ampisilin Trihidrat (Sigma).....	0.8 gr
0.02M Sodyum Hidroksit.....	100 ml

Ampisilin Trihidrat, 0.02M NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0.22 µm çaplı membran filtreden geçirilir. +4°C de saklanır.

**2.1.6.4. Kristal Viyole çözeltisi (% 0.1)**

Kristal Viyole.....	0.1 gr
Distile Su.....	100 ml

Kristal Viyole ve su karıştırılarak, solüsyon ışık geçirmeyen koyu renkli bir kaptaki +4°C de saklanır.

**2.1.6.5. Biotin çözeltisi (% 0.13)**

D-Biotin.....	0.65 gr
Distile Su.....	50 ml

D-Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklavda steril edilir. +4°C de saklanır.

**2.1.6.6. Histidin çözeltisi (% 0.5)**

L-Histidin.....	2.0 gr
Distile Su.....	400 ml

L-Hisitidin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklavda steril edilir. +4°C de saklanır.

**2.1.6.7. Glikoz çözeltisi (% 40)**

Glikoz.....	40 gr
Distile Su.....	100 ml

Glikoz distile su içinde çözülerek otoklav edilir ve +4°C de saklanır.

#### 2.1.6.8. 4-Nitro-*o*-Fenilendiamin (NPD)

200 µg/petri olmak üzere DMSO (Carlo-Erba)'da çözülerek kullanılır. Oda sıcaklığında saklanır.

#### 2.1.6.9. 2-Aminofloren (2AF)

1 mg/petri olmak üzere DMSO (Carlo-Erba)'da çözülerek kullanılır. 0-4 °C de saklanır.

#### 2.1.6.10. 3-Metilkolontren

3-Metilkolontren.....64 mg  
Mısır Yağı.....1 ml

Mısır yağında çözülerek 0.5 ml intraperitoneal olarak enjekte edilir.

#### 2.1.6.11. KCL çözeltisi

KCL.....11.275 gr  
Distile Su.....1000 ml

KCL bir miktar distile su içinde çözülerek toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda steril edilerek +4°C de saklanır.

#### 2.1.6.12. S9 Karışımı

Ticari olarak alınan S9 mutajenite tabletleri (Boehringer Mannheim) 14 ml distile su içinde (1 tablet için) çözülür ve 3ml rat mikrozomu ilave edilerek toplam hacim 20 ml'ye tamamlanır. 0-2 °C de kullanıma kadar saklanır.

### 2.1.6.13. Top Agar

Agar (Difco).....	6 gr
NaCl.....	5 gr
Distile Su.....	1000 ml

Maddeler distile su içinde çözülerek, 121°C de 20 dk otoklavlanarak steril edilir [37].

### 2.1.6.14. Histidin/Biotin Agar (HB Agar)

Agar.....	15 gr
%40 Glikoz.....	50 ml
Histidin Solüsyonu.....	10 ml
Biotin Solüsyonu.....	6 ml
Distile Su.....	914 ml

Agar ve su karıştırılarak otoklav edilir. 45°C ye kadar soğutulup, %40'lık glikoz, 50XVB tuzları ve Histidin çözeltisi eklenir. Son olarak biotin solüsyonu eklenerek karışım steril petri kutularına dökülür [37].

### 2.1.6.15. Histidin/Biotin/Ampisilin Agar (HBA Agar)

Agar.....	15 gr
Distile Su.....	910 ml
50xVB Tuzları.....	20 ml
%40 Glikoz.....	50 ml
Histidin Solüsyonu.....	10 ml
Biotin Solüsyonu.....	6 ml
Ampisilin Solusyonu.....	3.15 ml



Agar ve su otoklavlanır, 45°C'ye kadar soğutulup, %40 glikoz, 50xVB tuzları ve histidin solusyonu eklenerek karıştırılır. Son olarak biotin ve ampisilin solusyonları eklenerek, karışım steril petrilere dökülür. Bu plaklar +4°C de 2 ay süreyle saklanabilir [37].

#### 2.1.6.16. Minimal Glikoz Agar (MGA)

Agar.....	15 gr
Distile Su.....	930 ml
50xVB Tuzu.....	20 ml
%40 Glikoz.....	50 ml

Agar ve distile su otoklavlandıktan sonra 45°C ye kadar soğutulur. %40Glikoz ve 50xVB tuzları eklendikten sonra iyice karıştırılarak steril petri kaplarına dökülür [37].

#### 2.1.6.17. Nutrient Agar

Oxoid Broth No:2.....	25 gr
Agar.....	15 gr
Distile Su.....	930 ml

Agar, N.B. ve distile su karıştırılarak otoklavlanır ve petri kutularına dökülür.

#### 2.1.6.18. Nutrient Broth

Oxoid Broth No:2.....	5 gr
Distile Su.....	200 ml

Nutrient Broth ve su karıştırılarak otoklavlanır ve +4°C de saklanır.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

#### 2.2.1.1. Mikroorganizmaların canlandırılması

Liyofilize kültürler halinde bulunan bakteriler, tüplerinden aseptik şartlar altında çıkarılmış ve canlandırılmak üzere Nutrient Broth tüplerine aktarılmıştır. 37°C de 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, kültürlerin Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarına tek koloni ekimleri yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda mikroorganizmaların saflıkları kontrol edilmiş ve önceden hazırlanan ve içlerinde 1.5 ml %15'lik steril gliserol çözeltisi bulunan 2 ml lik mikro-reaksiyon tüplerine (eppendorf) bir öze dolusu aktarılmışlardır. Bu tüpler – 85°C de daha sonra kullanılmak üzere saklanmışlardır. Filamentli funguslar ise, yatık Sabouraud Dextrose Agar (SDA) tüplerine inoküle edilmiş, geliştikten sonra ağzıları parafilmle kapatılıp daha sonra kullanmak üzere +4°C de saklanmışlardır.

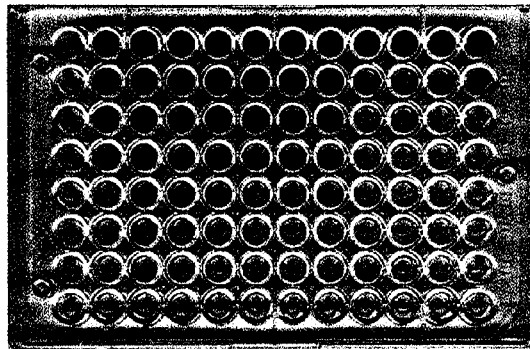
#### 2.2.1.2. Mikrobrot dilüsyon tekniği

Kültürler canlandırılmak üzere -85°C den çıkarılarak içinde MHA bulunan petrilere ekilerek, 37°C de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde gelişen kolonilerden alınarak içinde 10 ml tek kuvvet Mueller Hinton Broth (MHB) bulunan tüplere aktarılmış ve tekrar 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland No:0.5 (yaklaşık  $10^8$  cfu/ml) tüpüne göre bulanıklık ayarı yapılarak çift kuvvet MHB tüplerine belirli miktarlarda aktarılmıştır.

Test edilecek olan uçucu yağlar, 4 mg olmak üzere steril flakonlara tartılmış ve üzerlerine 2'şer ml steril %25 lik Dimetil-Sülfoksit (DMSO) eklenerek çözülmüştür. Uçucu yağların DMSO içerisinde tam olarak çözünmeleri, homojen bir karışım hale gelmeleri sağlanmıştır. Elde edilen stok çözeltilerden başlayarak uçucu yağların, içinde steril distile su bulunan mikro-reaksiyon tüplerinde (eppendorf) iki katlı seri dilüsyonları hazırlanarak, uçucu yağların 2

mg/ml den 1.95 µg/ml ye kadar (1, 1/2, 1/4, 1/8, ...) seri konsantrasyonları elde edilmiştir.

Deney için 96 “U” tipi kuyucuklara sahip mikrotitrasyon petrileri (Brand) kullanılmıştır (Şekil 2.1.). Dilüe edilmiş karışımlardan sırasıyla her bir kuyucuk sütun serisine mikropipetörler yardımıyla 100’er µl aktarılmıştır. Test edilecek uçucu yağların yanı sıra çözücü kontrolü için DMSO, ayrıca standart antibiyotik olan kloramfenikol (Sigma) bakteriler için, standart antifungal madde olan ketokonazol de (Sigma) *C. albicans* için pozitif kontrol olarak test edilmiştir. 12. sütun mikroorganizmaların kontrolü için boş bırakılmış sadece 100 µl steril distile su koyulmuştur. Tüm konsantrasyonlar kuyucuklara aktarıldıktan sonra, mikroorganizmaların eklenmesine geçilmiştir. Bunun için önceden bulanıklığı McFarland No:0.5’e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri multikanal otomatik pipetörlere göre imal edilmiş rezervuarlara aktarılmış ve daha sonra bu pipetörler yardımıyla her bir kuyucuk satırına bir mikroorganizma gelecek şekilde 100’er µl pipetlenmiştir. Son sütunun mikroorganizma kontrolüne ayrıldığı gibi son satır da test maddesinin kontrolüne ayrılarak mikroorganizma eklenmemiştir. Bu işlemlerden sonra mikrotitrasyon petrilerinin kapakları kapatılarak 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üremenin varlığının ya da yokluğunun daha iyi gözlemlenebilmesi için petri üzerine bir miktar TTC tuzunun çözeltilisinden püskürtülmüştür. Daha sonra renklenme için 37°C de 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda renklenmeyen alanlar üremenin olmadığı konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir [14, 18-21]. Deneyler çift paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 2.1. Mikrobrot Dilyasyon Tekniğinde Kullanılan 96 (well) Kuyucuklu Mikrotitrasyon Petrisi

### 2.2.1.3. Agar difüzyon tekniği

Agar difüzyon tekniği filamentli funguslara karşı antimikrobiyal etkinin denenmesinde kullanılmıştır ve çift paralel olarak tekrar edilmiştir. Bunun için önce 120 mm çapındaki steril cam petrilere 25'er ml Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dökülmüş ve petrilere düz bir satış üzerinde donmaya bırakılmıştır. Kullanılacak olan funguslar 1 hafta önceden yine SDA plaklarında geliştirilmiştir. Hazırlanan %1 lik Tween 80 çözeltisinden, fungusların bulunduğu petrilere üzerine, misellerin yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde aktarılmış, 30-40 dk bekledikten sonra steril drigalski spatülu yardımıyla sporlar toplanmaya çalışılmış ve steril tüplere bu solüsyon aktarılmıştır. Her fungus için yapılan bu işlemlerden sonra, önceden hazırlanan içlerinde 9'ar ml steril distile su bulunan tüplere aktararak 10luk katlar halinde dilüe edilmiştir. Bu dilüsyonlardan alınan örnekler Thoma lamında sayılarak yaklaşık mililitresinde  $10^6$  spor bulunan tüpler elde edilmiştir. Daha sonra bu spor solüsyonundan 1'er ml alınarak önceden hazırlanan 120 mm çapındaki petri kaplarına aktarılmış ve steril drigalski spatülu ile sporların besiyeri yüzeyine tamamen yayılması sağlanmıştır. Daha sonra bu petrilere, kapağı yarı açık halde steril kabin içinde kurumaya bırakılmıştır. Yüzeyleri kuruyan besiyerlerinin üzerine 6 mm çaplı steril kork-borer ile her petride yaklaşık 6 adet olacak şekilde rezervuarlar açılmıştır. Bu rezervuarlar birbirlerinden 2.5 cm petri kenarlarından 1.5 cm olacak şekilde açılmıştır. Uçucu yağlar 1 mg tartılmış ve 1 ml DMSO içinde çözülmüştür ve çift katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 1 mg/ml den 15.6 µg/ml ye kadar uçucu yağ konsantrasyonları elde edilmiştir. Bu dilüsyonlardan besiyeri üzerinde açılan çukurlara 50'şer µl pipetlenmiştir. Pipetleme işlemleri bittikten sonra, maddelerin besiyerlerine difüze olması için 30 dk beklenmiş ve daha sonra 28°C de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Standart antifungal olan ketokonazol de aynı uçucu yağlar gibi DMSO içinde dilue edilerek uygulanmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO da distile suda dilüe edilmiş ve antifungal etkisi denenmiştir [14, 15, 17, 18, 20].

## 2.2.2. Biyootografi Tekniği İle Uçucu Yağlardaki Antimikrobiyal Özellikteki Bileşiklerin Belirlenmesi

### 2.2.2.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) sistemi

Alüminyum destek üzerine 0.2 mm kalınlığındaki silikajel 60 GF<sub>254</sub> adsorbanla kaplanmış 20x20 cm hazır ince tabaka kromatografi plakları (Aldrich) uygun ebatlara getirilerek kullanılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında nemsiz ve karanlık özel muhafazalı kutularında saklanmıştır. Kılcal boru ile saf haldeki uçucu yağlar 1'er µl olacak şekilde plaklara uygulanmıştır. 9:1 (v/v) oranında Hexan-Etil Asetat çözücü sistemi 20 ml hazırlanarak, kapaklı dikdörtgen prizma şeklinde cam bir kaba koyulmuştur. Yağların uygulandığı yerler işaretlenerek belirlenmiş İTK plağı, çözücünün içine dik şekilde daldırılmış, ancak çözücünün yüksekliğinin yağların uygulandığı yere ulaşmamasına dikkat edilmiştir. İTK plakları çift olmak suretiyle bu sistemde geliştirilmiştir. Çözücünden alınan plaklardan birisi deney için bekletilirken diğerinin üzerinden çözücü uçurularak 254 ve 364 nm dalga boylarında incelenmiş ve UV aktif spotlar işaretlenmiştir. UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde renk reaktifi olarak anisaldehit/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi spreyleneş ve plak 110°C de 1-3 dakika ısıtılmıştır. Deneyin daha sonraki aşamaları için farklı sayılarda uçucu yağ uygulanmış, farklı ebatlarda İTK plakları hazırlanmıştır [32].

### 2.2.2.2. Mikroorganizmaların hazırlanması

Biyootografi yöntemi için *C. albicans*, *E. coli* ve *A. flavus* olmak üzere 3 farklı mikroorganizma kullanılmıştır. *C. albicans* 18 saat önceden Mueller Hinton Broth (MHB) sıvı besiyerinde geliştirilerek, Thoma lamında (Hawksley) sayılmış ve 10<sup>7</sup> hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. *A. flavus*' unda %1 lik Tween 80 yardımıyla spor solüsyonu hazırlanarak Thoma lamında sayılmış ve 10<sup>7</sup> spor/ml'lik spor solüsyonu hazırlanmıştır. Aynı şekilde 1 gün önceden MHB besiyerinde geliştirilmiş *E. coli* kültürü de Mc Farland No:5 e göre

bulanıklığı ayarlanarak MHB içinde yaklaşık  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml'lik hücre süspansiyonu elde edilmiştir.

### 2.2.2.3. Aktivite tayini

Önceden hazırlanarak 20'şer ml erlenlere dağıtılan yumuşak (molten) agar  $45^\circ\text{C}$  lik su banyosunda tutularak içlerine *C. albicans* ve *A. flavus* için 200'er  $\mu\text{l}$  hücre ve spor süspansiyonlarından koyularak, yumuşak agardaki son hücre konsantrasyonu *C. albicans* için  $10^5$  cfu/ml, *A. flavus* için  $10^5$  spor/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. *E. coli* süspansiyonundan 2 ml kültür yumuşak agara ilave edilerek son konsantrasyon  $1.5 \times 10^8$  cfu/ml olarak elde edilmiştir. Nutrient Agar dökülmüş petriyer üzerine, önceden hazırlanan ve reaktif uygulanmayan İTK plakları yerleştirilmiştir. Üzerine, sıcak su banyosunda bulunan ve mikroorganizmalar ile inoküle edilmiş yumuşak agar iyice karıştırıldıktan sonra 1 mm'yi geçmeyecek biçimde ince bir tabaka halinde dökülmüştür. *C. albicans* ve *E. coli*'ye ait plaklar  $37^\circ\text{C}$  de, *A. flavus*'un bulunduğu plak  $28^\circ\text{C}$  de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, TTC (Trifenil Tetrazolyum Klorid) çözeltisi püskürtülerek, 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zonları ve onlara karşılık gelen referans plaktaki fraksiyonların  $R_f$  değerleri ölçülerek kaydedilmiştir [14, 15, 27-32].

### 2.2.2.4 Gaz kromatografisi (GC)

Uçucu yağ içinde bulunan bileşikler aşağıda belirtilen şartlarda gaz kromatografisi kolonunda tutunma sürelerine ( $R_t$ ) göre ayrılarak relatif oranlarına göre değerlendirilmiştir.

### GC Analiz Koşulları

Sistem	: Shimadzu GC-17A
Kolon	: CPSil 5CB
Taşıyıcı Gaz	: Azot (1ml/dk)
Split Oranı	: 50:1
Dedektör	: FID
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250°C
Kolon	: 60°C//5°C/dk//260°C-20 dk.
Dedektör	: 250°C

### **2.2.2.5. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)**

Uçucu yağ içindeki bileşenler, gaz kromatografisi kolonunda ayrıldıktan sonra dedektör görevi gören kütle spektrometresinde her birinin tek tek spektrumları alınmıştır. Değerlendirmeler öncelikle “TBAM Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca Wiley ve Adams-LIBR kütüphanesi tarama yazılımları ve “The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data” sistemleri kullanılmıştır.

### GC/MS Analiz Koşulları

Sistem	: Shimadzu GCMS-QP5050A
Kolon	: CPSil 5CB (25m x 0.25 mm i.d.)
Taşıyıcı Gaz	: Helyum (1ml/dk)
Sıcaklıklar	
Enjeksiyon	: 250°C
Kolon	: 60°C//5°C/dk//260°C-20 dk
Split Oranı	: 50:1
Elektron Enerjisi	: 70 eV
Kütle Aralığı	: 35-400 <i>m/z</i>

### 2.2.2.6. Preparatif İTK plağının hazırlanması

Uçucu yağ içindeki aktif bileşiklerin izolasyonu için 20x20 ebadında hazır kaplanmış İTK plağı preparatif amaçla kullanılmıştır. Plağa saf halde uçucu yağ ince bir çizgi halinde uygulanmış hexan:etilasetat (9:1 v/v) çözücü sisteminde İTK tankında ayrılmıştır. Bu işlem sonunda İTK plağının dikey kenarından ince bir parça kesilerek bu kısım 254-364 nm UV ışığı altında incelenmiş ve ardından anisaldehit/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaktifi uygulanarak izole edilecek fraksiyonun R<sub>f</sub> değeri belirlenmiştir. Daha sonra reaktif uygulanmayan plağın yanına bu örnek plak parçası koyularak R<sub>f</sub> değeri dikkate alınarak hedef maddenin bulunduğu bölge belirlenmiş ve Alüminyum destek üzerindeki silikajel kazınarak ayrılmıştır. Silikajel ve madde karışımı, içinde cam pamuğu bulunan cam huniye aktarılmış ve üzerine çözücü olarak aseton ilave edilmiştir. Madde asetonla birlikte çözünerek silikajelden ayrılmış ve alttaki erlende toplanmıştır. Daha sonra vakumlu rotavapor kullanılarak 40 °C'de çözücü uzaklaştırılmış, analiz ve aktivite tayini için yeterli miktarda madde elde edilmiştir [32].



### 2.2.3. Ames *Salmonella* Mutajenite Deneyi

#### 2.2.3.1. *Salmonella* suşlarının hazırlanması

Liyofilize tüplerde temin edilen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları içlerinde 2'şer ml Nutrient Broth (No:2) bulunan tüplere alınarak 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Histidin/Biotin/Ampisilin Agar (HBA) plaklarına çizgi ekim yapılmış 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tek tek düşen bakteri kolonilerinden birer tane alınarak tekrar HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak inkübe edilmiş ve saf bakteri kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen master plaklar +4°C de iki ay süreyle kullanıma hazır tutulmuştur. Test suşlarının mutant özelliklerini koruyabilmeleri ve uzun zaman canlı kalabilmeleri için kültürler stoklanmıştır. Bu amaçla HBA agarda üretilmiş olan *Salmonella* suşlarından, platin öze ile tek bir koloni alınarak içinde 2 ml Nutrient Broth bulunan tüplere aktarılmış ve 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 1 ml bakteri kültürü ve 0.09 ml DMSO steril mikro-reaksiyon tüplerine aktarılmış ve -20°C de dondurularak, -85°C de saklanmıştır.

#### 2.2.3.2. *Salmonella* suşlarının genotip kontrolleri

Test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığı test güvenilirliği açısından bilinmelidir. Bu amaçla bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir [37].

##### 2.2.3.2.1. Histidin gereksinim kontrolü

Bakteriler Minimal Glikoz Agar (MGA) plaklarına ekilerek his<sup>-</sup> ve his<sup>+</sup> bakteriler birbirinden ayırt edilebilir. Bunun için bir gecelik kültüre alınan bakterilerden içinde histidin bulunmayan MGA ve içinde histidin bulunan Histidin Biotin Agar (HB) plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37°C de 48-72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda HB ve MGA plaklarında üremenin varlığı ya da yokluğu gözlenmiştir.

#### **2.2.3.2.2. *UvrB* mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon ile bakterilerin, UV ışınlarının neden olduğu hataların düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir. Mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bunun için, içinde Nutrient Broth bulunan tüplerde 1 gece geliştirilen bakteri kültürlerinden 1 öze dolusu alınıp Nutrient Agar plaklarına paralel çizgiler halinde ekilmiştir. Plağın yarısı plastik bir plaka ile kapatılmış, 15 watt gücünde UV lambası altında (33 cm), 8 saniye süreyle UV ışığına maruz bırakılmıştır. Bu işlemde sonra petri kapları 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda UV ye maruz bırakılan kısımda üremenin varlığına bakılmıştır.

#### **2.2.3.2.3. *Rfa* mutasyonunun kontrolü**

Mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuş ve hücre duvarının geçirgenliğinin artırılmasına dayanmaktadır. Bu mutasyonun kontrolü için Kristal Viyole duyarlılık testi yapılmıştır. Nutrient Broth da 1 gece geliştirilmiş bakteri kültüründen 0.1 ml, su banyosunda 45°C deki top agar içine karıştırılmıştır. İnoküle edilmiş top agar Nutrient Agar plaklarına dökülmüş ve donduktan sonra ortasına %0.1 Kristal Viyole çözeltisinden 10 µl damlatılmış steril filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Plaklar 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kağıt disk etrafındaki üreme durumu değerlendirilmiştir.

#### **2.2.3.2.4. R Faktör varlığının kontrolü**

Bakterilerin ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi için bakterilerde R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı test edilmiştir. Bunun için Nutrient Broth içinde geliştirilen bakteri kültürlerinin, ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekimi yapılmış ve 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin plazmid taşıyıp taşımadıkları, ampisilinli ortamdaki gelişmelerine göre değerlendirilmiştir.

### 2.2.3.2.5. Spontan olarak geriye dönüşüm sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının spontan olarak his<sup>-</sup> durumdan his<sup>+</sup> durumuna dönüşebilmesi belirli sınırlar içerisinde olabilmektedir. Kendiliğinden geriye dönen kolonilerin sayısını bulmak amacıyla Nutrient Broth da 1 gecelik kültürü yapılan bakterilerden 0.1 ml alınarak 45°C deki top agar içine ilave edilmiştir. Ayrıca 0.2 ml Histidin-Biotin solüsyonundan da eklenerek, iyice karıştırılmış ve MGA plakları üzerine dökülmüşlerdir. Plaklar 37°C de 48 saat inkübe edilerek, bu süre sonunda oluşan koloniler sayılmıştır. *S. typhimurium* TA98 suşu için kendiliğinden geriye dönen koloni sayısı 30-50, TA100 suşu için ise 120-200 arasında koloni sayısı normal kabul edilmiştir [37].

### 2.2.3.3. Kullanılacak sıvı kültürdeki bakteri sayısının hesaplanması

Deneyde kullanılan gecelik kültürün mililitresinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından bir koloni alınarak Nutrient Broth içinde süspansiyon edilmiş ve çalkalamalı etüvde 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gecelik kültürün bir seri seyreltmeleri yapılmıştır. Bu seyreltmelerden Nutrient Agar plaklarına damla ekim yapılarak sayılmış ve bakteri kültürünün ml'inde yaklaşık  $1 \times 10^9$  bakteri olduğu belirlenmiştir [36].

### 2.2.3.4. Uçucu yağların sitotoksik etkilerinin saptanması

Bu test, Ames testi için seçilen iki uçucu yağın, test bakterileri için öldürücü dozunu saptayabilmek için yapılmıştır. 45°C deki top agar içine, 1 gecelik bakteri kültürlerinden 0.1'er ml ve uçucu yağların farklı dozlarından 0.1'er ml eklenmiş daha sonra yumuşak haldeki top agar, NA plakları üzerine dökülmüştür. Sonuçları değerlendirebilmek için uçucu yağlar eklenmeden sadece mikroorganizmaların bulunduğu kontrol plakları da hazırlanmıştır. Plaklar 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler sayılmış ve kontrol plaklarındaki sayım sonuçlarıyla karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir.

### 2.2.3.5. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanması

Test edilen uçucu yağların metabolik ürünlerinin mutajenik etkilerinin araştırılması için kullanılan mikrozom ekstresi Wistar cinsi ratlardan elde edilmiştir. bunu için ratlara, öldürmeden önce 80 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak 3-metilkolontren enjekte edilerek mikrozomal enzim artışı uyarılmıştır [37].

Mikrozom izolasyonuna başlamadan önce tüm malzemeler steril edilmiştir. Deneyde kullanılan ratlar enjeksiyonu takip eden 5 gün sonunda boynu kırılarak (servikal dislokasyon) öldürülmüştür. Ratlar aseptik koşullar altında açıldıktan sonra karaciğer zedelenmeden çıkarılmış ve ağırlığı bulunmuştur. 1gr karaciğere 1 ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ile karaciğer yıkandıktan sonra 1 gr karaciğere 3 ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl eklenmiştir. Karaciğer steril pens ve makas yardımıyla küçük parçalara ayrılarak homojenize tüpüne alınmış ve bıçaklı homojenizatörde (Junge Kunkel Ultra Turrax) 24000 rpm de homojenize edilmiştir. Homojenat 9000 G'de 0-2°C de 10 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım soğuk steril eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek amacıyla homojenat 0.25 µm çaplı selüloz membran filtreler ile steril edilmiştir. Sterillğin kontrolü için mikrozomal fraksiyondan 0.1 ml Nutrient Agar ve Histidin Biotin Ampisilin Agar plaklarına ekilmiş ve 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.

### 2.2.3.6. Ames Mutajenite testinin yapılışı

Deneyin amacı, önceden gelişebilmesi için histidin aminoasidine gereksinim duyan oksotrofik bakteri suşların, kullanılan test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşüp dönüşmediğinin belirlenmesidir [36-38, 40].

### 2.2.3.6.1. S9'suz deney

İçlerine 0.2 ml histidin-biotin solüsyonu ilave edilmiş 2'şer ml lik top agar tüpleri 45°C de su banyosuna alınmıştır. Top agar içine 0.1 ml uçucu yağların farklı dozlarından ve 0.1 ml 16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler agar donmadan hızlıca çalkalanarak, önceden hazırlanmış MGA plaklarına dökülerek 8 hareketiyle homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. 10-15 dk besiyerlerinin donması beklendikten sonra, ters biçimde 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılarak kaydedilmiştir. Deney, her uçucu yağ dozu için 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için aynı zamanda, spontan kontroller, çözücü (DMSO) kontrolü ve pozitif kontroller yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak standart bir mutajen olan 4-Nitro-*o*-Fenilendiamin kullanılmıştır [36, 37, 40].

### 2.2.3.6.2. S9' lu deney

Deney için, tablet başına 3 ml mikrozomal enzim olacak şekilde S9 karışımı hazırlanmış ve buz içinde bekletilmiştir [36]. 45°C de su banyosunda bulunan ve 0.2 ml histidin-biotin çözeltisi içeren 2 ml'lik yumuşak agar (top agar) tüplerine, 0.1 ml test maddesi, 0.1 ml 16 saatlik mikroorganizma kültürü ve buzda bekletilen S9 karışımından ilave edilmiştir. Tüpler çalkalanarak agar donmadan, önceden hazırlanan MGA plaklarına dökülmüştür. Plaklar donduktan sonra 37°C de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda his<sup>+</sup> kolonilerin sayımı yapılmış ve kaydedilmiştir. Ayrıca deneye paralel olarak TA98 ve TA100 suşlarının spontan mutasyon kontrolü, çözücü (DMSO) kontrolü ve pozitif kontrolleri yapılmıştır. Pozitif kontrol için, 1/100g/μl 2-Aminofluoren kullanılmıştır [36, 37, 40].

### 2.2.3.7. Sonuçların değerlendirilmesi

Seçilen uçucu yağların mutajenite testleri, her doz için u paralel plak aynı anda test edilmiş ve birbirinden farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca test maddelerinin etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonu sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında da deney aynen tekrarlanmıştır. Sonuçların, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan “*Student-t* Testi” ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü’nden alınan “SPSS-WINDOWS” paket programı kullanılmıştır. Uçucu yağların dozlarına ve kontrollere ait revertant koloni sayılarının ortalamaları “ortalama  $\pm$  stn hata” şeklinde gösterilmiştir (izelge 3.5, 3.6).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etki Sonuçları

##### 3.1.1. Mikrobroth Dilüsyon Yöntemiyle Aktivitenin Belirlenmesi

Mikrobroth dilüsyon yöntemi kullanılarak, *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A), *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B), *Heracleum persicum* (C), *Heracleum argaeum* (D), *Heracleum platytaenium* (E), *Seseli campestre* (F), *Foeniculum vulgare* (G), *Laserpitium petrophilum* (H), *Laser trilobum* (I), *Coriandrum sativum* (J), *Ferulago asparagifolia* (K), *Ferulago trachycarpa* (L), *Ferulago cassia* (M), *Angelica sylvestris* var. *sylvestris* (N), bitkilerine ait uçucu yağların gösterdikleri antimikrobiyal etki sonuçları Çizelge 3.1 de gösterilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi, standart antimikrobiyal maddeler ile karşılaştırıldıklarında tüm uçucu yağlar kullanılan mikroorganizmalara karşı orta derecede aktivite göstermişlerdir. Tüm uçucu yağların insan patojenlerine karşı, 62.5 µg/ml den 2000 µg/ml ye kadar değişen konsantrasyonlarda etki gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanında bitki patojeni bakterilere karşı 31.25 µg/ml den 1000 µg/ml ye kadar değişen konsantrasyonlarda antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Özellikle *E. teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A), *H. sphondylium* subsp. *ternatum* (B) ve *F. asparagifolia* (K) bitkilerine ait uçucu yağlar bitki patojenlerine karşı güçlü sayılabilecek antibakteriyel etki göstermişlerdir. *E. teunifolia* subsp. *sibtorphiana* bitkisine ait uçucu yağın sırasıyla 31.25 ve 62.5 µg/ml lik konsantrasyonlarda *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ve *X. campestris* bakterilerine karşı etkili oldukları saptanmıştır. Yine *H. sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisinin uçucu yağının 31.25 µg/ml lik konsantrasyonda *X. campestris* pv. *phaseoli*, *X. campestris* ve *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bakterilerinin üremelerini, inhibe etmiştir. Başta B ve E uçucu yağları olmak üzere, C, F, K ve L uçucu yağları özellikle *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. epidermidis*' e karşı 62.5 µg/ml den 1000 µg/ml ye kadar değişen Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1. Uçucu Yağların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK-µg/ml)**

Mikroorganizma/Maddeler	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	ST
<i>Escherichia coli</i>	500	500	500	1000	500	1000	1000	2000	500	1000	500	1000	1000	2000	31.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	500	1000	1000	62.5	1000	250	250	1000	3.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	1000	1000	2000	1000	1000	2000	1000	62.5	1000	500	1000	2000	62.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	500	2000	500	500	1000	1000	1000	1000	62.5
<i>Proteus vulgaris</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	250	2000	500	1000	15.6
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	500	500	500	1000	1000	1000	500	500	500	250	2000	1000	2000	31.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1000	125	125	250	250	125	1000	2000	250	2000	1000	2000	2000	1000	1.9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	250	125	500	500	250	500	1000	1000	250	1000	125	2000	2000	1000	1.9
<i>Listeria monocytogenes</i>	500	125	250	500	125	125	1000	1000	500	500	250	62.5	1000	1000	1.95
<i>Bacillus cereus</i>	500	125	250	500	500	250	2000	1000	500	1000	250	125	250	500	15.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	250	250	1000	1000	250	500	1000	1000	500	2000	1000	500	2000	500	3.9
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	500	125	250	250	500	250	1000	250	250	1000	500	250	500	250	15.6
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	500	500	500	250	1000	500	500	1000	250	1000	1000	500	1000	500	1.95
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	125	31.25	500	500	250	250	250	62.5	250	250	31.25	250	62.5	500	15.6
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	31.25	31.25	125	500	250	500	500	500	125	250	250	62.5	250	250	3.9
<i>Xanthomonas campestris</i>	62.5	31.25	250	1000	125	1000	500	250	250	125	62.5	250	250	31.25	3.9
<i>Candida albicans</i>	500	500	500	1000	1000	2000	500	1000	1000	500	250	1000	500	2000	*62.5

ST: Standart Antimikrobiyal Maddeler (Kloramfenikol,\*Ketokonazol)



*Coriandrum sativum* (Kişniş) bitkisine ait uçucu yağı ise 62.5 µg/ml konsantrasyonda *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı inhibe edici etki göstermiştir. Standart antibakteriyel olan kloramfenikol ile karşılaştırıldıklarında kişniş uçucu yağının *P. aeruginosa*'ya karşı kloramfenikol'le aynı konsantrasyonda etkili oldukları belirlenmiştir. Kullanılan tek maya olan insan patojeni *C. albicans*'a karşı tüm uçucu yağlar, 250-2000 µg/ml konsantrasyonları arasında etki göstermiştir.

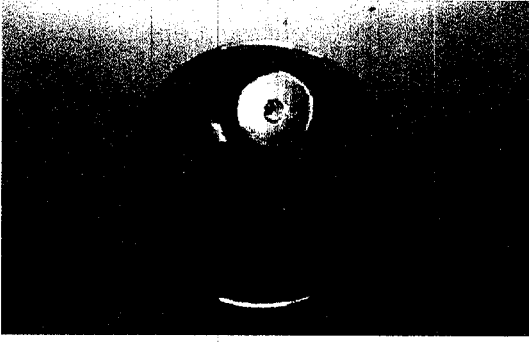
### 3.1.2. Agar Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Aktivitenin Belirlemesi

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak tüm uçucu yağlar (A-N) ve standart antifungal Ketokonazol, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus paraciticus*, *Fusarium solani* ve *Sclerotium rolfsii*'ye karşı denenmiştir. Deneyin sonucunda uçucu yağların hiçbir konsantrasyonda etki göstermediği saptanmıştır. En yüksek olan 1 mg/ml de ve çözücü kontrolü için uygulanan saf DMSO'nun da herhangi bir antifungal aktivite göstermediği gözlenmiştir. Uygulanan uçucu yağ konsantrasyonu 4 mg/ml ye çıkarılmış ve tekrar denenmiştir. Ancak bu yüksek konsantrasyon değerinde bile herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Uygulanan standart antifungal madde ketokonazolün ise çapları 40 mm den 10 mm ye kadar değişen inhibisyon zonlarını oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2, Şekil 3.1, 3.2, 3.3).

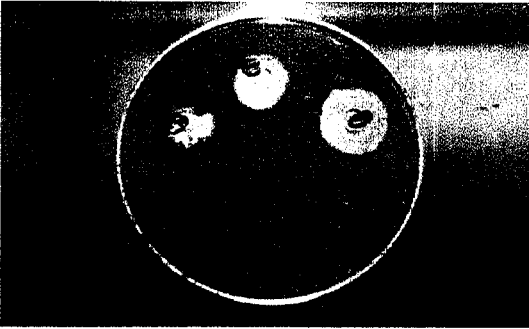
**Çizelge 3.2.** Standart Antifungal Ketokonazol'ün Oluşturduğu İnhibisyon Zonu Çapları (mm)

Kullanılan Funguslar/Dozlar-µg/ml	1000	250	125	62.5	31.25	15.62
<i>Aspergillus flavus</i>	40	36	34	26	22	16
<i>Aspergillus paraciticus</i>	30	26	22	19	17	14
<i>Fusarium solani</i>	27	24	22	15	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i>	26	24	22	18	17	10

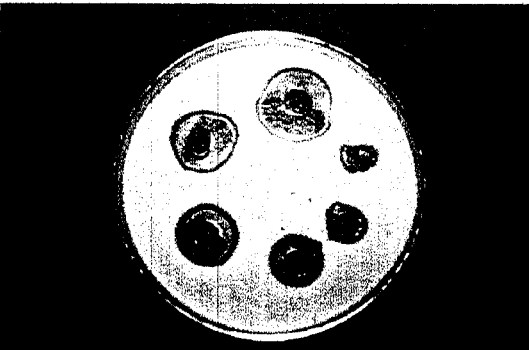
(-): İnhibisyon zonu gözlenmeyen konsantrasyonlar



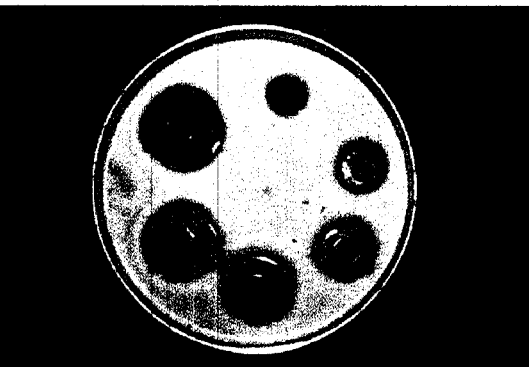
Şekil 3.1. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (*Aspergillus flavus*)



Şekil 3.2. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (*Fusarium solani*)



Şekil 3.3. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (*Sclerotium rofsii*)



Şekil 3.4. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (*Aspergillus parasiticus*)

### 3.2. Uçucu Yağlara Biyootografi Tekniğinin Uygulanması

Mikrobroth dilüsyon sonuçlarına göre seçilmiş, güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip 9 bitkiye ait uçucu yağ biyootografi yöntemiyle denenmiş ve antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşikler belirlenmeye çalışılmıştır. *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A), *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B), *Heracleum persicum* (C), *Seseli campestre* (F), *Laser trilobum* (I), *Coriandrum sativum* (J), *Ferulago asparagifolia* (K), *Ferulago cassia* (M) ve *Laserpitium petrophilum* (H), bitkilerine ait olmak üzere toplam 9 adet uçucu yağ İTK plaklarına uygulanmış ve seçilen 3 mikroorganizmaya karşı denenmiştir. Şekil 3.4 de görüldüğü gibi, 9 uçucu yağ arasında, *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) uçucu yağına ait *C. albicans* ve *E. coli* ile inoküle edilmiş plaklarda iki fraksiyonda birden ( $R_f$ : 0.54 ve 0.97) net inhibisyon zonları belirlenirken, *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B) uçucu yağının biyogramında ise bir fraksiyonda ( $R_f$ : 0.3) inhibisyon zonu belirlenmiştir. *Aspergillus flavus* ile inoküle edilen plakta ise herhangi bir inhibisyon zonu gözlenememiştir.



Şekil 3.5. *C. albicans* plağında 9 adet uçucu yağın biyogramı ve yağlara ait referans İTK plağı

Değişik fraksiyonlarında inhibisyon zonları oluşturduğu belirlenen *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) ve *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B) bitkilerine ait uçucu yağlarda aktiviteden sorumlu bileşenlerin belirlenmesinde kullanılmak üzere GC ve GC/MS analizleri yapılmıştır. GC ve

GC/MS analizleriyle uçucu yağ kompozisyonundaki ana maddeler belirlenerek, relatif yüzdelerine göre Çizelge 3.3 ve 3.4 de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** *E. teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları

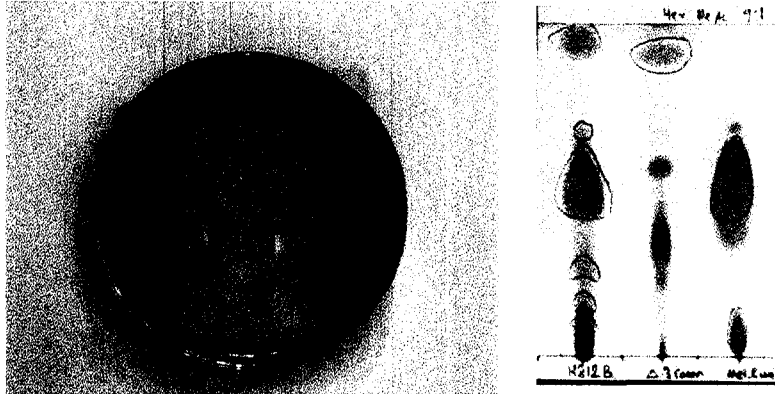
Ana Bileşikler	%
Metil öjenol	38.8
$\delta$ -3-Karen	31.0
<i>p</i> -Simen	9.0
$\alpha$ -Fellandren	4.4
$\beta$ -Fellandren	1.8
Mirsen	1.2
$\alpha$ -Fellandren epoksit	1.1
Limonen	1.0

**Çizelge 3.4.** *H. sphondylium* subsp. *ternatum* (B) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları

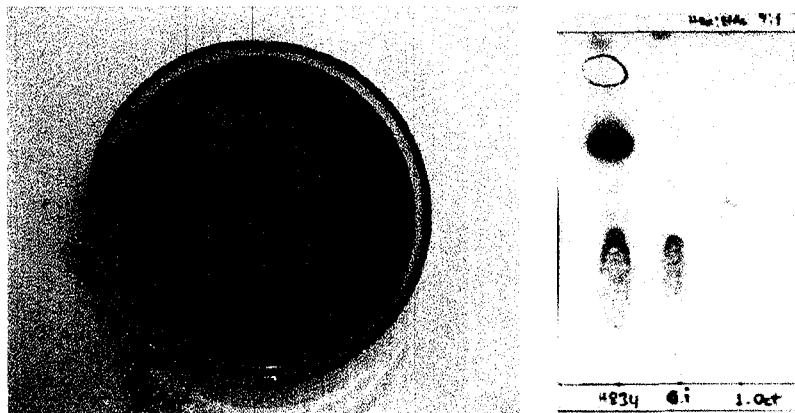
Ana Bileşikler	%
1-Oktanöl	50.3
Oktil bütirat	24.6
Oktil asetat	7.3
Miristisin	2.4
Oktanal	1.2
Oktil hekzanoat	1.2
( <i>Z</i> )-Oktenil bütirat	1.1

Bu sonuçlardan yola çıkılarak, *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* ve *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkilerine ait uçucu yağların ana bileşenlerinden relatif yüzdeleri yüksek olanların, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olabilecekleri düşünülerek, bunu doğrulama yoluna gidilmiştir. Bu amaçla *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağına ait Metil öjenol ve  $\delta$ -3-Karen maddeleri ile *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağına ait 1-Oktanöl saf olarak temin edilmiş ve uçucu yağlarla karşılaştırılmalı olarak biyootografi tekniği kullanılarak denenmiştir. Bunun için *C. abicans* kullanılmış ve aynı İTK plağına hem *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) uçucu

yağı hem de Metil öjenol ve  $\delta$ -3-Karen uygulanmıştır. Aynı şekilde *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B) uçucu yağı için, uçucu yağın kendisi ve 1-Oktanol aynı İTK plağına uygulanarak, mikroorganizma ile etkileştirilmiştir. Ayrıca B uçucu yağının, preparatif İTK plağı yapılarak, biyootografi plağı üzerinde inhibisyon zonunu oluşturan aktif madde izole edilmiş ve GC/MS analizi yapılmıştır. Analiz sonunda izole edilen bu maddenin 1-Oktanol olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bu madde, B uçucu yağı ve 1-Oktanol ile birlikte biyootografi plağında denenmiştir. Biyogram plakları referans İTK plakları ile karşılaştırılmıştır. Şekil 3.6 ve 3.7 de görüldüğü gibi A ve B uçucu yağlarına ait olan ve daha öncede gözlenip  $R_f$  değerleri kaydedilen inhibisyon zonlarının (Şekil 3.5), saf maddelerin oluşturduğu zonlarla aynı bölgelerde olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.6. *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) bitkisine ait uçucu yağın ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı



Şekil 3.7. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B) bitkisine ait uçucu yağın ve ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı

Şekil 3.6.da da görüldüğü gibi *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının aktif fraksiyonlarında meydana gelen ( $R_f$ : 0.54 ve 0.97) inhibisyon zonlarıyla saf halde uygulanan Metil öjenol ( $R_f$ : 0.52) ve  $\delta$ -3-Karen ( $R_f$ : 0.96) maddelerine ait inhibisyon zonlarının ihmal edilebilir derecede küçük farklılıklar göstermekle birlikte aynı  $R_f$  değerlerine sahip oldukları bulunmuştur. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının biyogramı incelendiğinde ise (Şekil 3.7), uçucu yağa ait inhibisyon zonunun  $R_f$  değeriyle ( $R_f$ : 0.3), preparatif İTK plağından izole edilerek GC/MS sistemiyle 1-Oktanol olarak tanımlanan maddenin inhibisyon zonunun  $R_f$  değerlerinin aynı olduğu belirlenmiştir. Saf olarak uygulanan ticari 1-Oktanol'un inhibisyon zonunun ise  $R_f$ : 0.33 değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Antimikrobiyal akiviteden sorumlu oldukları belirlenen uçucu yağlara ait saf bileşiklerin Mikrodilüsyon Broth ve Agar Difüzyon yöntemleriyle antimikrobiyal aktiviteleri ayrıca belirlenerek biyootografi sonucunda çıkan aktiviteleri doğrulanmıştır. Çizelge 3.5 de görüldüğü gibi *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağına ait bileşiklerden, Metil öjenol'un, *Bacillus cereus*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *Xanthomonas campestris* haricinde tüm mikroorganizmalara karşı, 125  $\mu\text{g/ml}$  den, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar değişen MİK değerleriyle,  $\delta$ -3-Karen'den daha etkili olduğu gözlenmiştir. Metil öjenolün MİK değerleriyle, ait olduğu uçucu yağın (*Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana*) MİK değerlerinin çoğunlukla birbirine benzediği belirlenmiştir.  $\delta$ -3-Karen ise *P. syringae* pv. *tomato* ve *Xanthomonas campestris* bakterilerine karşı sırasıyla, 125 ve 62.5  $\mu\text{g/ml}$  lik konsantrasyonlarda metil öjenolden (1000 ve 125  $\mu\text{g/ml}$ ) daha kuvvetli etki göstermiştir. Hatta *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı 125  $\mu\text{g/ml}$ 'lik MİK değeriyle ait olduğu uçucu yağdan daha kuvvetli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde *Staphylococcus epidermidis* ve *P. syringae* pv. *phaseolicola* bakterilerine karşı Metil öjenol de 125'şer  $\mu\text{g/ml}$ 'lik inhibisyon konsantrasyonlarıyla, 250 ve 500  $\mu\text{g/ml}$  MİK değerine sahip olan uçucu yağdan daha kuvvetli antimikrobiyal etki göstermiştir. İlginç olarak, *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağı *P. syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* bakterilerine karşı 125 ve 31.25  $\mu\text{g/ml}$  de gösterdiği MİK değerlerinin, saf maddelerin 2000-500  $\mu\text{g/ml}$  arasında olan MİK değerlerinden

daha yüksek olduğu bulunmuştur. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisine ait uçucu yağın ana bileşeni olan 1-Oktanol'ün ise Çizelge 3.5. de görüldüğü gibi uçucu yağla genel olarak benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş ancak *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı 250 µg/ml'lik inhibisyon konsantrasyonuyla, 500 µg/ml inhibisyon konsantrasyonu değerine sahip olan *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağından daha güçlü bir aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *syringae*, *X. campestris* pv. *phaseoli* ve *X. campestris* bakterilerine karşı izole edildiği uçucu yağdan daha zayıf antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

**Çizelge 3.5.** Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Saf Maddelerin ve Ait Oldukları Uçucu Yağların MİK Değerleri (µg/ml)

Mikroorganizma	A	δ-3-Karen	M.öjenol	B	1-Oktanol
<i>Escherichia coli</i>	500	500	500	500	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	1000	500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	2000	1000	1000	1000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	500	2000	500	500	500
<i>Proteus vulgaris</i>	500	2000	500	500	1000
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	2000	500	500	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1000	4000	1000	125	500
<i>Yersinia enterocolitica</i>	250	1000	250	125	125
<i>Listeria monocytogenes</i>	500	500	250	125	125
<i>Bacillus cereus</i>	500	1000	1000	125	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	250	500	125	250	250
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	500	2000	125	125	500
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	500	125	1000	500	250
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	125	2000	1000	31.25	1000
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	31.25	1000	500	31.25	1000
<i>Xanthomonas campestris</i>	62.5	62.5	125	31.25	500
<i>Candida albicans</i>	500	1000	500	500	500

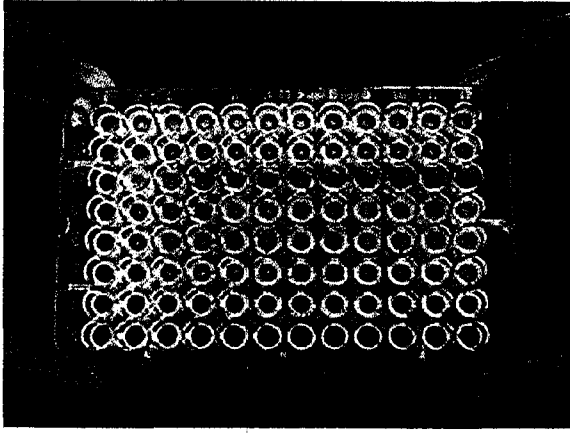
A: *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* bitkisine ait uçucu yağ

B: *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisine ait uçucu yağ

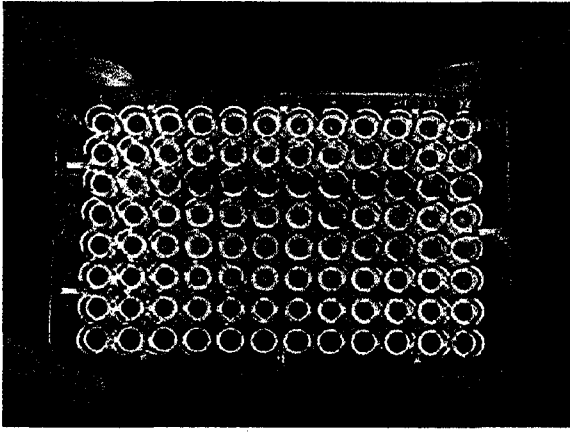
Mikrobroth dilüsyon tekniği ile MİK değerleri belirlenmeye çalışılan ana bileşiklerin, mikrotitrasyon petrilerindeki sonuçları Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10 da gösterilmiştir. Őekillerde görüldüğü gibi mikrotitrasyon petrisinin 12. stnuna, sadece mikroorganizmalar inoküle edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda gelişerek oluşturduğu bulanıklık kontrol olarak kabul edilmiştir. “H” satırı ise mikroorganizma ile inoküle edilmemiş, sadece uçucu yağın seri dilüsyonları aktarılmıştır. Bu sayede uçucu yağdan kaynaklanabilecek bulanıklığın kontrolü sağlanmıştır.

Uçucu yağlara ait ana bileşiklerin, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium solani* ve *Sclerotium rolfsii* funguslarına karşı, antifungal aktiviteleri agar difüzyon yöntemiyle belirlenmeye çalışılmıştır. Deney sonucunda, bu dört tür fungusa ait plaklarda maddelere ait ukuruklarda en yüksek konsantrasyon değerleri olan 4 mg/ml’de bile herhangi bir inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

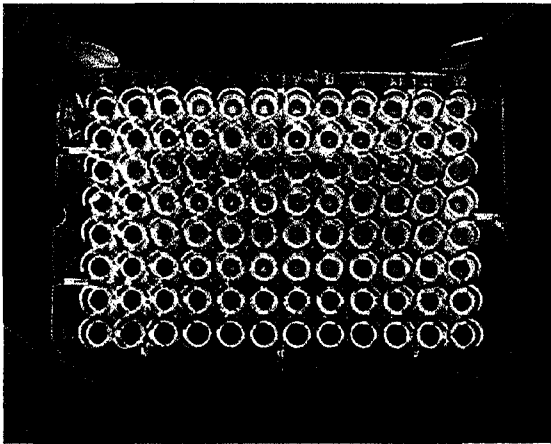




Şekil 3.8. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile  $\delta$ -3-Karen'in Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü



Şekil 3.9. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile Metil öjenol'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü



Şekil 3.10. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile 1-Oktanol'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü

### 3.3. *Salmonella* Suşlarının Genotip Kontrollerinin Değerlendirilmesi

Yapılan histidin gereksinimi kontrolü sonucunda, MGA ve HB plaklarına ekilen bakteriler, histidin bulunmayan MGA plaklarında üremezken, histidin solüsyonu ilave edilmiş HB plaklarında üremişlerdir. Böylece kullanılan bakterilerin halen his<sup>-</sup> mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır. *UvrB* mutasyonu kontrolü yapılan bakterilerden UV ışığına bırakılanların üremedikleri gözlenmiştir. Kullanılan UV dozu, bu mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek seviyededir ve DNA tamir mekanizmalarını engellemiştir. *Rfa* mutasyon kontrolünde ise bakterilerin üzerine yerleştirilen Kristal viyole diski etrafında üremenin inhibe olduğu bir zon meydana gelmiştir. Bu zonun oluşması bakteri hücre duvarlarının geçirgenliğinin artırılmış olmasından dolayı Kristal viyoleyi hücre içine alarak ölmeleriyle açıklanmaktadır. Ampisiline dirençlilikte ise içinde belirli miktarda ampisilin solüsyonu bulunan besiyerine (HBA) ekilen bakterilerin inkübasyon sonunda üreme gösterdikleri yani halen eklenen plazmidi taşıdıkları anlaşılmıştır.

### 3.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi

Sitotoksik dozun belirlenmesinde seçilen üç doz için maddeler, hiç madde eklenmeyen kontrol petrileriyle karşılaştırılmıştır. Kontrol petrisinde gelişen koloni sayısının yarısı ya da daha az sayıda koloni sayılan plaklara ait dozların sitotoksik oldukları belirlenmiştir. Denemeler iki farklı zamanda üç paralel olacak şekilde yapılmıştır. Deneylemlerin sonucunda, *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* bitkisine ait uçucu yağın 1100 µg/ml'lik dozunun sitotoksik olduğu belirlenmiş ve deneyde 1000, 900 ve 800 µg/ml'lik ardışık üç doz kullanılmıştır. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisine ait uçucu yağın ise 500 µg/ml de sitotoksik olduğu belirlenmiş ve deneyde 400, 200 ve 100 µg/ml'lik dozlar kullanılmıştır.

### 3.5. S9'lu ve S9'suz Mutajenite DeneYlerinin Sonuçları

DeneYler her iki suş için S9 mikrozoMal fraksiyon yokluğunda ve varlığında olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının sitotoksik olmadıkları belirlenen 1000, 900 ve 800 µg/ml dozları ile *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının 400, 200 ve 100 µg/ml lik konsantrasyonları TA98 ve TA100 suşlarına karşı denenmiş ve sonuçlar standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan Student-t testi ile, çözücü kontrolü olan DMSO sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. TA98 için olan sonuçlar Çizelge 3.6. da, TA100 için olan sonuçlar ise Çizelge 3.7. de verilmiştir. Çizelgelerde, test maddelerinin her doz için revertant koloni sayılarının ortalamaları "ortalama±standart hata" şeklinde gösterilmiştir. Her deneyde paralel olarak spontan revertant kontrol, çözücü kontrolü ve pozitif kontroller yapılmıştır.

Çizelge 3.6 ve 3.7'de görüldüğü gibi *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının S9'suz deneYlerinin sonucunda TA98 suşu için 1000 µg/ml ( $P<0.05$ ) ve 900 µg/ml ( $P<0.001$ ) konsantrasyonlarında anlamlı değerler elde edilirken, S9 (+) deneYlerinin sonucunda ise 1000 µg/ml ( $P<0.001$ ), 900 µg/ml ( $P<0.001$ ) ve 800 µg/ml ( $P<0.01$ ) konsantrasyonlarında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu uçucu yağın TA 100 suşu için S9'suz deney sonuçlarında 1000 µg/ml'lik konsantrasyonlarında anlamlı değerler ( $P<0.01$ ) elde edilmiştir. 900 ve 800 µg/ml'lik konsantrasyonlarda ise revertant koloni sayıları DMSO koloni sayılarından düşük çıkmıştır. Aynı uçucu yağın TA100 için S9(+) deney sonucunda 1000, 900 ve 800 µg/ml'lik dozlarında (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.001$ ) anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. TA 98 suşu için S9'suz deneyde spontan revertant koloni sayısı DMSO kontrol revertant koloni sayılarından yüksek çıkarken, S9(+)'lu deneyde DMSO kontrolü revertant kolonilerin sayısında spontan kontrol koloni sayısına göre artış gözlenmiştir.

**Çizelge 3.6.** Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA 98 ile verdikleri revertant koloni sayıları

Test Bileşikleri	Uygulanan Doz (µg/ml)	Revertant Koloni Sayısı (TA98)	
		S9 (-)	S9 (+)
<i>E. teunifolia</i> subsp. <i>sibtorphiana</i> (A)	1000	48.83±6.64 *	196.16±6.32 ***
	900	60.66±6.98 ***	246.16±15.93 ***
	800	28.66±8.30	248.66±40.95 ***
<i>H.sphondylium</i> subsp. <i>ternatum</i> (B)	400	32.16±5.67	119.16±20.24
	200	51.16±5.15 ***	171.50±21.22 *
	100	25.0±3.20	194.66±15.51 ***
Spontan Kontrolü	-	34.50±3.80	36.0±5.46
DMSO Kontrolü	100 µl/plak	20.16±1.70	53.33±5.35
NPD	1000 µg/plak	1119.50±45.27	1239.66±34.08

4-Nitro-o-Fenilendiamine (NPD) S9'lu ve S9'suz deneylerde TA98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılırken, DMSO çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak olarak test edilmiş ve sonuçların ortalamaları alınarak (ort±st.h.) tabloya kaydedilmiştir. (\*\*\*: P<0.001, \*\*: P<0.01, \*: P<0.05)

**Çizelge 3.7.** Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları

Test Bileşikleri	Uygulanan Doz (µg/ml)	Revertant Koloni Sayısı (TA100)	
		S9 (-)	S9 (+)
<i>E. teunifolia</i> subsp. <i>sibtorphiana</i> (A)	1000	132.16±5.47 **	288.33±13.0 *
	900	83.33±3.48	326.16±17.01 *
	800	75.16±2.22	348.16±12.60 ***
<i>H. sphondylium</i> subsp. <i>ternatum</i> (B)	400	94.00±4.71	141.16±16.85
	200	91.33±8.63	244.83±23.21 *
	100	113.0±4.28 **	133.83±9.98
Spontan Kontrolü	-	140.33±16.50	199.66±4.30
DMSO Kontrolü	100 µl/plak	96.16±2.34	146.33±29.40
NPD	1000 µg/plak	1088.0±64.66	-
2AF	1000 µg/plak	-	1047±16.80

4-Nitro-o-Fenilendiamine (NPD) S9'suz deneyde, 2-Aminofloren (2AF) S9'lu deneyde TA100 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılırken, DMSO çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak olarak test edilmiş ve sonuçların ortalamaları alınarak (ort±st.h.) tabloya kaydedilmiştir. (\*\*\*: P<0.001, \*\*: P<0.01, \*: P<0.05)

Diğer uçucu yağ olan *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının TA 98 suşu için S9'suz deneylerinde 200 µg/ml dozda anlamlı sonuç ( $P<0.001$ ) elde edilirken, S9(+) deneyleri sonucunda 200 ( $P<0.05$ ) ve 100 µg/ml ( $P<0.001$ ) dozlarında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının TA 100 suşu için S9'suz deneylerinde 100 µg/ml konsantrasyonda anlamlı sonuç ( $P<0.05$ ) gözlenirken, S9(+) deneyinde ise 200 µg/ml dozda anlamlı sonuç ( $P<0.05$ ) elde edilmiştir. Diğer dozlarda mutajenik bir etkiye rastlanmamıştır. S9 (-) ve S9 (+) deney sonuçlarının her ikisinde de DMSO kontrol revertant kolonilerinin sayısı spontan kolonilerin sayısından fazla çıkmıştır. TA 98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılan 4-Nitro-*o*-Fenilendiamin (NPD) plaklarında revertant koloni sayıları, DMSO kullanılan çözücü kontrolü revertant koloni sayılarından oldukça yüksek çıkmıştır. TA 100 için kullanılan 2Aminofloren (2AF) ve NPD revertant sayıları DMSO kontrol revertant koloni sayılarından da hayli yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.7.). Deneylerde inkübasyon sonunda, Maron ve ark.[37] bildirdiği bakteri halısı üzerindeki tipik revertant koloni görünümü tüm plaklarda elde edilmiştir.

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uçucu yağlar ve bileşenleri, tedavi edici özellikleri yanında, sahip oldukları sitotoksik aktiviteleri ve bitki patojeni fungus ve zararlı böceklere karşı olan toksik etkilerinden dolayı, uzun yıllardan beri biyolojik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağlar, sahip oldukları antibakteriyel ve antifungal özelliklerinden dolayı da, çeşitli gıdaların saklanması ve depolanması aşamalarında koruyucu görevini üstlenmektedirler. Bununla birlikte uçucu yağların, karmaşık ve değişken bir kimyasal yapıya sahip olmaları ve kullanılan antimikrobiyal test metodlarının spesifik olmamasından dolayı, antimikrobiyal özelliklerine göre sınıflandırılması çok güçtür. Bu olumsuzluklara rağmen, uçucu yağlar biyolojik aktiviteleri bakımından araştırılması gereken çok önemli organik bileşiklerdir [23].

Birçok bitkiye ait uçucu yağın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Aslında, bitkilerin bu özelliklerinin doğal ortamlarında devamlı etkileşim halinde buldukları bitki patojenlerine karşı geliştirdikleri kimyasal bir korunma mekanizmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Örneğin herbivorlar tarafından bitkilerde meydana getirilen kesik ve yaraların etrafında, fırsatçı patojen mikroorganizmalar yerlerini alırken, meydana gelen yaralanma ile uçucu yağların da içinde bulunduğu bezler parçalanmaktadır. Açığa çıkan bu bileşiklerin, yaranın etrafını sardığı ve sahip olduğu antimikrobiyal aktivite sayesinde fırsatçı patojen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek bitkiyi koruduğu saptanmıştır. Birçok aromatik ve tıbbi bitkinin, çok sık rastlanılan bitki hastalıklarına karşı kendini koruyabildiği bildirilmiştir [41]. Patojen fungusa ait bir spor, bitkinin yüzeyine geldiğinde ilk olarak mikro-iklim koşullarıyla karşılaşmaktadır. Sıcaklık, nem, ışık gibi koşullar uygun ise spor çimlenmekte ve bu aşamadan sonra büyümeye ve hücrelerinin sayısını arttırmaya başlamaktadır. Tam bu etapta, fungus sporları bitkinin savunma mekanizmasıyla karşı karşıya gelmektedir. Bu savunma mekanizmasının ilk kısmı, eğer bitkide herhangi bir yaralanma yoksa kalın kutikula tabakasıdır. Bu tabaka bitkiyi mekanik olarak korumaktadır. Diğer mekanizma ise bitki tarafından salınan eksudasyon sıvılarıdır. Eksudatlar sporun çimlenmesini ve gelişmesini engellemektedir. Bu

savunma mekanizması antifungal bileşikler içermektedir ve “Preinfeksiyonel Metabolitler” olarak isimlendirilmektedir. Bu maddeler fungus sporlarını ortadan kaldırmaları bile, gelişimini ve bitki dokularına penetrasyonunu büyük oranda geciktirmekte ve engellemektedirler [42]. Uçucu yağların bu mikroorganizmaların gelişimini hangi mekanizmalarla engellediğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, uçucu yağların sahip oldukları hidrofobik yapıdan dolayı, ilk hedeflerinin hücre membranları olduğu, lipofilik yapılarından dolayı da mikroorganizmaların hücre membranlarında biriktikleri ve hücrenin geçirgenliğini arttırdıkları belirlenmiştir. Böylece hücre membranlarındaki enzimatik reaksiyonların inhibe olduğu ve metabolitlerin hücreden dışarı anormal şekilde salındığı bildirilmiştir [43, 44].

Çalışmamızda da bitkilerin yetiştirme veya hasat sonrası aşamalarında, hastalıklara neden olan ve dünya çapında yılda % 20 oranında ürün kaybına neden oldukları bildirilen [20] bitki patojeni bazı bakteri ve funguslara karşı çeşitli bitkilere ait uçucu yağlar test edilmiştir. *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibiriana* bitkisinden elde edilen uçucu yağın, 31.25 ve 62.5 µg/ml lik konsantrasyonları bitki yapraklarında enfeksiyonlara neden olan [45] *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ve *X. campestris* bakterilerine karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisine ait uçucu yağın ise *X. campestris* pv. *phaseoli*, *X. campestris* ve özellikle fasulye bitkisinde kahverengi leke hastalığına neden olan [46] *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bakterilerinin üremelerini, 31.25 µg/ml lik konsantrasyonda inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca kullanılan *Ferulago* türlerine ait uçucu yağlar da bu patojenlere karşı 250 µg/ml den 31.25 µg/ml ye kadar değişen konsantrasyonlarda antibakteriyel etki göstermişlerdir. *Angelica sylvestris* var. *sylvestris*'in uçucu yağı da *Xanthomonas campestris*'e karşı 31.25 µg/ml lik konsantrasyonda etki göstermiştir (Çizelge 3.1.). Benzer olarak yapılan bir çalışmada, *Thymbria spicata* var. *spicata* bitkisine ait uçucu yağın, uçucu fazdayken sahip olduğu antimikrobiyal etkisini, aralarında *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* bakterisinin de bulunduğu bir grup bitki patojeni bakteriye karşı incelenmiş, uçucu yağın *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *Erwinia*

*caratovora* pv. *caratovora* haricindeki tüm bitki patojeni bakterilere karşı kuvvetli antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir [34].

Test ettiğimiz uçucu yağlar, 4 mg/ml gibi yüksek bir konsantrasyonda bile özellikle bitkilerin kök ve gövdelerinde çürüklere neden olduğu bildirilen [45] bitki patojenleri *Fusarium solani* ve *Sclerotium rolfsii* funguslarına karşı etkili olamamışlar, aynı şekilde insanlarda akciğer ve solunum yollarında nekrozlara neden oldukları gibi, bitkilerde de çeşitli çürüklere neden olan [47] *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* funguslarına karşı da herhangi bir antifungal etki göstermemişlerdir. Yapılan bir çalışmada ticari olarak satın alınan *Coriandrum sativum* bitkisine ait uçucu yağın tüp dilüsyon metodu kullanılarak antifungal etkisi araştırılmış, çalışmamızın sonuçlarından farklı olarak *C. sativum* uçucu yağının 200 µg/ml'lik konsantrasyonda *A. flavus*'un radial gelişimini %22.7 oranında indirdiği ve antifungal bir etkinin görüldüğü bildirilmiştir [48]. Benzer fungusların kullanıldığı bir çalışmada *Chrysanthemum coronarium* bitkisine ait uçucu yağın petri başına 20 µl'lik miktarlarının *Aspergillus flavus* ve *Fusarium solani* funguslarının gelişimlerini sırasıyla %82.6 ve %25.9 lik oranlarda inhibe ettiği bildirilmiştir [49]. Türküsay ve ark. [50] Ege Bölgesine ait bazı bitkilerden elde ettikleri ekstrelerin, *Alternaria alternata*, *A. solani*, *B. cinerea* ve *Drechslera sorokiniana*'ya karşı olan antifungal aktivitelerini araştırmış ve *Hedera helix*, *Ficus carica* ve *Avena sativa* bitkilerine ait ekstrelerin kullanılan bitki patojeni fungusların sporulasyon yoğunluğunu %12 ile 82 arasında engellediğini bildirmişlerdir [50]. Çalışmalarda farklı sonuçların ortaya çıkmasının en büyük nedeni kullanılan antimikrobiyal test metotlarının farklı olması olabilir. Kullandığımız agar difüzyon yöntemiyle fungusun gelişiminin tamamen inhibe olduğu alanlar belirlenmekte, ancak diğer çalışmada kullanılan yöntemde uçucu yağın, test fungusunun gelişim oranını ne oranda indirdiği belirlenmektedir. Ayrıca kullanılan uçucu yağların kaynaklarının yani, türleri aynı olsa bile elde edildikleri bitkilerin farklı olmasından dolayı, gösterdikleri antimikrobiyal etkinin de farklı olması muhtemeldir [15].

Çalışmamızda kullanılan uçucu yağlar *Candida albicans*'a karşı 250 ile 2000 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda etkili olarak orta derecede bir antimikrobiyal etki göstermiştir.



Yapılan bir çalışmada çeşitli uçucu yağların farklı konsantrasyonları, agar dilüsyon yöntemiyle *Candida albicans*'a karşı denenmiş, *Coriandrum sativum* uçucu yağının %0.25'lik (v/v) konsantrasyonda etkili olduğu bildirilmiştir [51]. Aynı araştırmacıların yaptığı bir diğer çalışmada *Foeniculum vulgare* uçucu yağının *C. albicans*'a karşı %0.5'lik (v/v) konsantrasyonda etkili olduğu saptanmıştır [2]. Çalışmamızda bu iki bitkiye ait uçucu yağın *C. albicans*'a karşı 500 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Janssen ve ark. [52] yaptıkları bir çalışmada da *Coriandrum sativum* ve *Foeniculum vulgare* uçucu yağlarının saf halde uygulandığı disk difüzyon yöntemiyle *C. albicans*'a olan etkileri araştırılmış, *Coriandrum sativum* uçucu yağının 11 mm, *Foeniculum vulgare* uçucu yağının ise 7 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada *Heracleum persicum* uçucu yağının 17 mm çapındaki inhibisyon zonuyla, *C. albicans*'a karşı kuvvetli bir etki gösterdiği belirlenirken, çalışmamızda ise *H. persicum* uçucu yağının 500 µg/ml konsantrasyonda *C. albicans*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur [52]. Bu çalışmaların bizim çalışmamızın sonuçlarıyla tam olarak karşılaştırılması kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan dolayı güçleşmektedir. Farklı sonuçlar daha önce de bahsedildiği gibi, uçucu yağların farklı kaynaklardan sağlanmış olmaları ya da kullanılan *Candida albicans* kültürlerinin farklı suşlar olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızda kullanılan uçucu yağlar bitki patojenleri dışındaki mikroorganizmalara (Çizelge 2.2) karşı dikkat çekici bir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Kullanılan uçucu yağların, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. epidermidis*'e karşı 250-2000 µg/ml arasındaki konsantrasyonları etkili olurken, dikkat çekici olarak *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı *Coriandrum sativum* (Kişniş) uçucu yağının 62.5 µg/ml'lik konsantrasyonunun etkili olduğu bulunmuştur. Standart bir antibakteriyel ajan olan kloramfenikol'ün de *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı 62.5 µg/ml de etkili olduğu gözlenmiştir. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının ise *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus*' a karşı 125 µg/ml konsantrasyonda etki gösterdiği saptanırken, *L. monocytogenes*'e karşı 62.5 µg/ml konsantrasyonu ile en güçlü etkiyi *Ferulago trachycarpa* uçucu yağının

gösterdiği belirlenmiştir. *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının ise en güçlü etkiyi bitki patojeni bakterilere gösterdiği, diğer mikroorganizmalara karşı ise 250-1000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda etkili olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.1). Yapılan benzer bir çalışmada *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi çeşitli bakteri ve funguslara karşı test edilmiş, uçucu yağın % 0.05 ve 0.1 lik konsantrasyonlarında, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhi* ve *S. aureus* bakterilerine karşı, bizim bulgularımızdan farklı olarak, herhangi bir antibakteriyel etki göstermediği bildirilmiştir [53]. Bu durum araştırmacıların, uçucu yağın oldukça düşük konsantrasyonlarını test etmiş olmalarından kaynaklanabileceği gibi, farklı yöntemlerin ya da uçucu yağların kullanılmasın da olabilir. Yapılan diğer bir çalışmada *Laser trilobum* uçucu yağının % 0.1 oranında *B. cereus* ve *S. typhimurium*'u tamamen inhibe ettiği, mayalar ve küfler üzerine ise daha az etkili olduğu bildirilmiştir [54]. Bu çalışma sonuçlarına paralel olarak çalışmamızda *L. trilobum*'a ait uçucu yağ, *B. cereus* ve *S. typhimurium*'a karşı 500 µg/ml konsantrasyonda etkili olurken kullanılan funguslara karşı herhangi bir etki göstermemiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada, Umbelliferae familyasına ait *Angelica archangelica*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Heracleum persicum*, *Petroselinum sativum*, *Pimpinella anisum* bitkilerine ait uçucu yağların antimikrobiyal etkileri agar difüzyon tekniği kullanılarak, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı denenmiş, bunlardan *C. sativum* uçucu yağı bu bakterilere karşı sırasıyla 10.0, 9.0, 7.3 ve 11.3 mm'lik inhibisyon zonları oluşturarak etki göstermiştir. *F. vulgare* bitkisine ait uçucu yağın ise 10.3 mm inhibisyon zonuyla *S. aureus*'a karşı etki gösterdiği, *Bacillus cereus*'a karşı ise göstermediği bildirilmiştir [52]. Bu sonuçlara paralel olarak çalışmamızda da kullandığımız *F. vulgare* uçucu yağı *S. aureus*'a karşı 500 µg/ml konsantrasyonda etki gösterirken, *B. cereus*'a karşı ise daha yüksek bir konsantrasyonda, 2000 µg/ml'de etkili olmuştur. Hammer ve arkadaşlarının çeşitli familyalara ait bitkilerin uçucu yağlarıyla yaptıkları bir çalışmada, Umbelliferae familyasına ait *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare* ve *Pimpinella anisum* bitkilerinin uçucu yağlarının

*Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* ve *S. aureus*'a karşı olan antimikrobiyal etkilerini MİK değerleriyle birlikte belirlemişlerdir. Buna göre *Coriandrum sativum* uçucu yağının 0.25, 0.5, 2.0, 1.0 ve 0.25'lik (%v/v) konsantrasyonları sırasıyla *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* bakterilerinin üremelerini inhibe ederken, *Foeniculum vulgare* uçucu yağının ise aynı mikroorganizmaların üremelerini, sırasıyla 0.5, 2.0, 2.0, 1.0 ve 0.25 (%v/v) konsantrasyonlarda inhibe ettiği bildirilmiştir [2]. Çalışmamızdaki sonuçlarla karşılaştırıldığında *Foeniculum vulgare* uçucu yağı *S. aureus*'a karşı 500 µg/ml konsantrasyonda etki gösterirken, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*'a karşı 1000 µg/ml konsantrasyonda etki gösterdiği saptanmıştır. *Coriandrum sativum* uçucu yağının ise *S. aureus*'a karşı 62.5 µg/ml konsantrasyonda etki gösterdiği, *K. pneumoniae*'e ise 2000 µg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımızın benzer çalışmalarla tam bir uyum içinde olmamasının nedeni kullanılan uçucu yağların sahip olduğu farklı bileşenler olabilir. Bu farklılıkların nedenleri; kullanılan uçucu yağların, aynı tür bitkilerden elde edilmiş olmasına rağmen, yetiştikleri coğrafi bölgelerin, bu bölgelere ait iklimsel özelliklerin ve toplanma tarihlerinin farklı olmasıdır. Bunun yanında uçucu yağın farklı yöntemlerle elde edilmesi, bitkinin kuru ya da yaş olması, uçucu yağın eldesinde bitkinin hangi kısmının kullanıldığı ve bu kısmın dövülmüş ya da dövülmemiş olması bile uçucu yağ kompozisyonunda değişikliklere neden olmaktadır [2, 15]. Böylece farklı içeriğe sahip ancak aynı isimle anılan uçucu yağların birbirinden farklı antimikrobiyal etki göstermeleri muhtemel olmaktadır. Sonuçların karşılaştırılamamasının önemli nedenlerinden biri de antimikrobiyal aktivitenin araştırılmasında kullanılan tekniklerin tam bir standardizasyona oturtulmayıp araştırmacıdan araştırmacıya değişmesidir [2, 14, 15, 20, 23].

Çalışmamızda da antimikrobiyal etkilerin belirlenmesinde genel olarak diğer çalışmalarda da kullanılan agar difüzyon ve broth dilüsyon yöntemlerine yer verilmiştir. Bu tekniklerin birbirlerine göre bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan disk difüzyon tekniği ilk olarak bakteriler için geliştirilmiş olup sonradan filamentli funguslar için modifiye edilerek

kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemin oldukça benzeri olan ve kağıt diskler yerine besiyerinde açılan çukurların kullanıldığı agar difüzyon yönteminin, uçucu yağlar gibi polar bileşiklerin antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesinde oldukça kullanışlı olduğu bildirilmiştir [20]. Bu metot ile açılan çukurlara aktarılan saf uçucu yağ veya uçucu yağın çözeltisinin, kağıt disklere emdirildiği disk difüzyon yöntemine göre besiyeri içerisine çok daha iyi difüze olabilmektedir [14]. Ancak difüzyon yöntemlerinde agar içerisine giren ve mikroorganizma ile etkileşen uçucu yağ miktarı tam olarak bilinmemektedir. Çünkü farklı uçucu yağların besiyerine difüze olma katsayılarının birbirinden farklı olabileceği, dolayısıyla difüze olan maddenin miktarı değişebileceği bildirilmiştir [20, 52]. Bu nedenden dolayı da uçucu yağın minimal inhibisyon konsantrasyon değerinin belirlenmesinin oldukça güç olduğu rapor edilmiştir [20]. Buna karşın kullandığımız mikrobrot dilüsyon yönteminde mikroorganizma ile etkileşen test maddesi miktarı net olarak bellidir. Test maddesinin, hazırlanan stok çözeltisinden dilüsyonları yapılarak düzenli şekilde azalan konsantrasyonlar elde etmek bu sayede de minimal inhibe edici konsantrasyonu belirlemek mümkün olmaktadır [20]. Bu yöntemin bir avantajı da çok düşük miktarlarda test maddesi ile MİK değeri belirleme imkanı sağlamasıdır. İnkübasyon sonunda mikroorganizmaların gelişimine bağlı olarak oluşan bulanıklığa göre değerlendirmenin yapıldığı bu yöntemde spektrofotometrik yöntemler kullanılarak aktivite tayini yapılabilmekte, otomatik okuyucuların kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu yöntemin kullanımını kısıtlayan bir özelliği de vardır. Bu dezavantaj, mikrotitrasyon plaklarında filamentli fungusların test edilmesinin oldukça güç olmasıdır. Değerlendirme aşamasında, filamentli fungusların bakteriler gibi homojen bir süspansiyon halinde gelişmemesi nedeniyle spektrofotometrik yöntemlerle değerlendirilmesinin mümkün olmadığı bildirilmiştir [20, 14, 55]. Broth dilüsyon yöntemlerinin uçucu yağlara uygulanmasında bazı sorunlara yol açan bir durum da, uçucu yağların veya onlara ait bileşenlerin sıvı besiyeri veya çözücüsü içerisinde bozulma ihtimalleridir. Agar difüzyon tekniklerinde ise böyle bir durumun söz konusu olmadığı bildirilmiştir [55]. Tüm bu tekniklerde uçucu yağın, saf olarak uygulanmadığı durumlarda, genellikle belli bir organik çözücüde çözülmekte ve uçucu yağın belli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmaktadır.

Çalışmamızda, organik çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun da bir takım antimikrobiyal etkilere sahip olduğu Zgoda ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacıların Mikrobroth dilüsyon yöntemini kullanılarak yaptıkları bir çalışmada, mikrotitrasyon petrisi kuyucuklarındaki 0.2 ml lik son hacim içerisinde bulunan %2.5 oranında DMSO'nun *Candida albicans*'ın, %5.0 konsantrasyondaki DMSO'nun ise *P. aeruginosa*, *S. aureus* bakterilerinin gelişimlerini engellediklerini belirlemişlerdir [55]. Çalışmamızda da uçucu yağın stok çözeltisi hazırlanırken, çözücü olarak kullandığımız DMSO %25 oranında seyreltilmiş, stok çözeltiliden distile su ile hazırlanan seri dilüsyonlarda DMSO'nun yüzde miktarı Zgoda ve ark. bildirdiği seviyenin altına düşürülmüştür. Kontrol olarak uçucu yağların test edildiği her deneyde sadece DMSO'nun olduğu çözeltiler de test edilmiş ve DMSO'nun kullandığımız mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

Umbelliferae familyasına ait bitkilerin uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri hakkında çeşitli çalışmalar mevcuttur [2, 16, 25, 48, 52-54, 56-69]. Bu çalışmalar incelendiklerinde belli türler haricinde genel olarak Umbelliferlerin zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Dikkat çekici derecede biyolojik aktiviteye sahip olmamalarının nedeninin, bu familyaya ait bitkilerin alkoloitler bakımından çok zengin olmamasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu durum Umbelliferlerin halk arasında ilaç olarak kullanımının da diğer familyalara göre çok yaygın olmamasını açıklamaktadır [11]. Yapılan bir çalışmada çeşitli tıbbi bitkilerin antibakteriyel etkileri agar difüzyon tekniği ile araştırılmış, Umbelliferae familyasına ait *Pimpinella anisum* bitki ekstresinin, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, ve *Clostridium perfringens*'e karşı zayıf aktivite gösterdiği, *E. coli*, *S. aureus*, ve *Candida albicans*'a karşı ise etkisiz olduğu bildirilmiştir [25]. Diğer bir çalışmada da Umbelliferae familyasına ait *Angelica dahurica* bitkisinin ekstresi kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılmış ve elüe edilerek 8 ayrı fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar *Bacillus subtilis* ve *E. coli*'ye karşı denenmiş ve 8 maddenin de 62.5 µg/ml den 1mg/ml ye kadar değişen MİK değerleriyle orta derecede antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ekstreya ait fraksiyonların, *E. coli*'ye karşı ise 250-1000 µg/ml arasında daha zayıf bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [60].

Uçucu yağlar kompleks karışımlardır ve yapılarında genel olarak hidrokarbon yapısındaki monoterpenler, diterpenler ve seskiterpenler ve bunların oksijenli türevleri bulunmaktadır. Bunlar arasında alkoller, aldehitler, esterler, ketonlar, fenolik ve okside bileşikler de bulunabilmektedir. Bugün dünya üzerinde 1000 den fazla monoterpen, 3000 den fazla da seskiterpen yapısında organik madde olduğu tahmin edilmektedir [41]. Her yıl yeni bileşikler izole ve tayin edilmekte ancak bu maddelerin biyolojik aktiviteleri ve etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir [43]. Üzerinde çalışılan bu bitkilere ait uçucu yağların bileşiminde predominant halde bir ya da birkaç bileşen ve bunun dışında eser miktarlarda onlarca madde bulunmaktadır. Bu eser miktardaki bileşenlerin halen çoğunun tanımlanmadığı ve uçucu yağın biyolojik aktivitesinden veya özel kokusundan bu maddelerin sorumlu olabilecekleri tahmin edilmektedir [41].

Çalışmamızda kullandığımız uçucu yağlardan *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* (A) ve *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* (B) bitkilerine ait uçucu yağların özellikle bitki patojeni bakterilere karşı güçlü aktivite gösterdiği belirlenirken, diğer mikroorganizmalara karşı 125-1000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda etkili olduğu bulunmuştur. Bu iki uçucu yağın diğer test maddelerine göre dikkat çekici seviyedeki aktivitesi ve *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının daha önce antimikrobiyal özellikleriyle ilgili yapılmış bir çalışmaya rastlamamış olmamız göz önüne alınarak *C. albicans*, *E. coli* ve *Aspergillus flavus*'a karşı olan aktivitelerinin hangi bileşenlerin sorumluluğunda olduğunun belirlenmesi yoluna gidilmiştir. Bunun için immersiyon biyootografi tekniği [28] kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle de filamentli funguslara etkisiz olduğu belirlenen bu uçucu yağların biyogramında da herhangi bir antifungal etki gözlenmemiştir. Diğer iki mikroorganizmadan ise, *C. albicans*'a ait biyogramda daha net inhibisyon zonları gözlemlendiği için bu mikroorganizma çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmıştır. Her iki uçucu yağın ait İTK plaklarında belirgin zonlar oluşmuş ve bu zonlardan sorumlu maddeler belirlenmeye çalışılmıştır. GC/MS sonuçları ve referans İTK plaklarında saf maddelerin  $R_f$  değerlerinin karşılaştırılmaları ile bu ana maddelerin Metil öjenol,  $\delta$ -3-Karen ve 1-Oktan-1-ol oldukları belirlenmiştir. *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağına ait iki ana bileşenden,

Metil öjenol ve  $\delta$ -3-Karen'in, *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağında ise 1-Oktanol'ün *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı olan antimikrobiyal aktiviteden sorumlu oldukları biyootografi tekniği ile belirlenmiştir. Uçucu yağlara ait bu üç saf maddenin, diğer mikroorganizmalara karşı da antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olup olmadıklarını belirlemek amacıyla, mikrobroth dilüsyon yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiş ve uçucu yağlarla, bunlara ait saf maddelerin antimikrobiyal etkileri karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının ana bileşeni olan Metil öjenol'ün, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* ve *S. epidermidis*'e karşı uçucu yağ ile genelde aynı MİK değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.5). Bu durum Metil öjenol'ün bu mikroorganizmalara karşı mevcut olan aktiviteden tek sorumlu olmadığını ancak antimikrobiyal etkide rol oynadığını göstermektedir. Diğer ana bileşen olan  $\delta$ -3-Karen bu mikroorganizmalara karşı Metil öjenolden daha zayıf bir etki göstermiştir. Bu saf maddelerden Metil öjenol'ün bir fenol-eter bileşiği olduğu,  $\delta$ -3-Karen'in ise oksijensiz bir monoterpen olduğu bildirilmiştir [70]. Yapılan bir çalışmada alkol, keton, aldehit ve fenollerin antimikrobiyal aktivitesinin, eter, ester ve hidrokarbon monoterpenlere göre daha güçlü olduğu bildirilmiştir [71]. Çalışmamızda fenol türevi olan Metil öjenol'ün, oksijensiz bir monoterpen olan  $\delta$ -3-Karen'den daha aktif bir bileşik olduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada Geraniaceae familyasına ait *Pelargonium exstipulatum*, *P. odoratissimum* ve *P. x fragrans* bitkilerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal etkileri araştırılmış, GC ve GC/MS sistemi ile *P. odoratissimum* ve *P. x fragrans* bitkilerinin uçucu yağlarında en yüksek relatif yüzde ile Metil öjenol'ün ana bileşen olduğu belirlenmiştir. Bu iki bitkiye ait uçucu yağın ve ticari olarak satılan ve bu familyaya ait geraniol (sardunya) uçucu yağının, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* ve *B. cereus*'a karşı olan antimikrobiyal aktivitelerinin birbirine benzediği belirlenmiştir [68]. Yapılan başka bir çalışmada *Echinophra teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağı ile Metil öjenol'ün, antimikrobiyal aktivitesi çeşitli bakteri ve funguslara karşı test edilmiş, oldukça düşük olan %0.05 konsantrasyonda, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *Salmonella typhi* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinin gözlenemediği bildirilmiştir. %0.01

konsantrasyondaki Metil öjenol'ün ise küfler üzerinde zayıf antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* bitkisinin baharat formunun ve uçucu yağının mayalara karşı antimikrobiyal etki göstermediği, ancak % 0.1'lik konsantrasyondaki Metil öjenol'ün maya ve küflerde oldukça etkili oldukları bildirilmiştir. Gıda katkı maddesi olarak sanayide oldukça sık kullanım alanı bulan Metil öjenol'ün, gıdaları düşük seviyelerde maya ve küf kontaminasyonlarına karşı koruyabileceği sonucuna varılmıştır [53].

Çalışmamızda *Xanthomonas campestris*'e karşı olan antibakteriyel etkiden diğer ana bileşen  $\delta$ -3-Karen'in sorumlu olabileceği belirlenmiştir. *S. typhimurium*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *P. syringae* pv. *phaseolicola* bakterilerine karşı ise saf maddeler beklendiği gibi, uçucu yağdan daha güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir. Deneyde uçucu yağ ile saf maddeler aynı miktarlarda uygulanmasına rağmen saf maddelerin, uçucu yağ içerisinde daha düşük bir düzeyde bulunmalarından dolayı, uçucu yağın, saf maddelere göre daha düşük bir etki göstermesi beklenen bir sonuçtur. İlginç olarak, *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana*'ya ait uçucu yağ ve bu yağa ait  $\delta$ -3-Karen ve Metil öjenol maddeleri, *E. coli* ye karşı, aynı MİK değerleriyle etki göstermişlerdir. Bu sonuç, antimikrobiyal etkilerinin uçucu yağdan daha yüksek olması beklenen saf maddelerin, kompleks karışım halindeki uçucu yağın *E. coli*'ye karşı gösterdiği aktiviteden birebir sorumlu olmayabileceklerini, hatta uçucu yağ bileşenlerinin çok belirgin olmasa da *E. coli*'ye karşı sinerjistik bir etkiye sahip olabileceklerini göstermektedir. *B. cereus*, *P. syringae* pv. *syringae* ve *X. campestris* pv. *phaseoli* bakterilerine karşı ise  $\delta$ -3-Karen ve Metil öjenol'ün MİK değerlerinin, uçucu yağın MİK değerinden yüksek olduğu yani daha zayıf bir antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durum, bu iki ana maddenin, bu bakterilere karşı olan antimikrobiyal etkiden sorumlu olmadığını, yani uçucu yağ içeriğindeki relatif yüzde olarak az miktardaki başka bir maddenin etkili olabileceğini göstermektedir. Ya da uçucu yağda karışım halde bulunan bu maddelerin birlikte sinerjistik etki gösterip, daha kuvvetli bir antimikrobiyal etki gösterdikleri düşünülebilir. Kompleks bir uçucu yağ karışımının, birkaç monoterpenden oluşan basit bir karışıma göre patojenlere karşı daha kuvvetli bir bariyer oluşturduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Yani içinde hem



monoterpenlerin hem de seskiterpenlerin olduğu kompleks bir uçucu yağın bitkinin savunmasında patojenlere karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir [41].

Çeşitli bitkilerin uçucu yağlarıyla yapılan bir çalışmada uçucu yağlar yanında, yağlara ait saf bileşiklerin agar difüzyon tekniği ile antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve bu bileşikler içinde  $\delta$ -3-Karen'in bazı mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *Y. enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* ve *P. vulgaris* bakterilerinde sırasıyla, 13.5, 11.3, 10.6, 12.0, 15.4, 11.7 ve 11.1 mm çaplarında inhibisyon zonları gösterdiği bildirilmiştir. Sonuçlara göre  $\delta$ -3-Karen, *E. coli* ve *Y. enterocolitica* bakterilerine karşı en güçlü aktiviteyi gösterirken, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus*'a karşı diğer bakterilere göre daha zayıf aktivite göstermiştir [17]. Çalışmamızdaki sonuçlarla karşılaştırıldığında  $\delta$ -3-Karen, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*'e karşı sırasıyla 4000, 2000 ve 2000  $\mu$ g/ml lik yüksek konsantrasyonlarda zayıf aktivite gösterirken, *E. coli* ve *Y. enterocolitica*'ya karşı 500 ve 1000  $\mu$ g/ml lik konsantrasyonlarla diğer bakterilere göre daha kuvvetli etki göstermişlerdir.

Çalışmamızda *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* bitkisine ait uçucu yağının biyootografi tekniği ile *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteden alifatik bir alkol olan [70] 1-Oktanol'ün sorumlu olduğu belirlenmiş ve izole edilmiştir. Saf halde uygulanan 1-Oktanol'ün, uçucu yağdan, daha güçlü bir etki göstermesi beklenirken Çizelge 3.5. de görüldüğü gibi *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* ve *S. epidermidis*'e karşı ait olduğu uçucu yağla aynı MİK değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu duruma uçucu yağ bileşenleri arasında sinergistik bir etki olabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır. 1-Oktanol'ün *P. syringae* pv. *tomato* hariç, tüm bakterilere karşı elde edilmiş olduğu uçucu yağdan daha zayıf bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle bitki patojenlerine karşı *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağına göre çok daha zayıf antibakteriyel etki göstermiştir. Bu durumda, uçucu yağın 1-Oktanol'e göre olan üstün aktivitesinin, karışımdaki diğer bir maddeden kaynaklanabileceği ya da uçucu yağda kompleks bir karışım halinde bulunan bileşiklerin sinerjistik bir etkinin olabileceğini göstermektedir.

Sonuçlardan da görüldüğü gibi biyootografi tekniği, özellikle uçucu yağlar gibi karışımlarda aktif bileşenleri ortaya çıkarmak için çok kullanışlı bir tekniktir. Ancak İTK plağında tüm maddeleri birbirinden ayırmak mümkün değildir. Üzerinde inhibisyon zonu oluşmasıyla aktif olarak belirlenen fraksiyon, tek bir maddeden oluşmayabilmekte, üst üste birkaç madde bulunabilmektedir. Bu durumda İTK plağından madde izolasyonu çok dikkatli yapılmalı, iyi bir ayırım yapılabildiği kadar değişik çözücü sistemleri denenmeli ve çalışma kütle spektrometresi (MS) sistemi ile desteklenmelidir [15, 29]. Bunun dışında, kullanılan immersiyon biyootografi tekniğinde, mikroorganizma ile inoküle edilmiş yumuşak agar, her ne kadar 1 mm den kalın olmasa da, İTK üzerinde ayrılan ve gerçekte aktif olan bazı bileşikler besiyerine iyi difüze olamadıklarından etkisiz gibi görünebilmektedirler [40].

Biyootografi tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada *Ferula communis* bitkisinin rizomlarından elde edilen petrolyum eter ekstresi, *B. subtilis* kullanılarak biyootografi yöntemiyle fraksiyonlarına ayrılmış ve aktif spotlar belirlenmiştir. Daha sonra inhibisyon zonları oluşturan fraksiyonlardan 3 ayrı aktif bileşik izole edilmiştir. Biyootografi yöntemiyle aktif oldukları belirlenen 14-*o*-Hydroxycinnamyloxy)-dauc-4,8-diene, Ferulenol ve Ferchromone bileşiklerinin agar dilüsyon yöntemiyle *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus durans*, *Enterobacter faecalis* ve çeşitli *Mycobacterium* türlerine karşı antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Ferulenol bileşiğinin, 0.63 µg/ml'lik MİK değeriyle *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus durans*, *Enterobacter faecalis*'e karşı güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu bulunmuş ve bu maddenin kullanılan *Mycobacterium* türlerine karşı da 1.25 µg/ml'lik MİK değeriyle kuvvetli antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir [61].

Yapılan diğer bir çalışmada da *Lantana camara* bitkisine ait metanol ekstresinin biyootografi tekniği kullanılarak, antimikrobiyal aktiviteden sorumlu bileşiği belirlenmiştir. Biyootografi için test mikroorganizması olarak *Bacillus cereus* seçilmiş ve ekstrenin uygulandığı biyootografi sonuçlarına bakıldığında, lantic aside ait olan fraksiyonda inhibisyon zonu gözlemlendiği, ve bu ekstrenin antibakteriyel etkiden sorumlu olduğu bildirilmiştir [69].

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, antimikrobiyal aktivitesi araştırılacak bir uçucu yağın, öncelikle broth dilüsyon veya agar difüzyon yöntemleriyle genel olarak antimikrobiyal etkisi hakkında bilgi sahibi olduğu, belli bir etkiyle karşılaşıldığında ise biyootografi gibi daha spesifik tekniklere başvurulduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda da bu sıra takip edilerek Umbelliferae familyasına ait çeşitli bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri bu üç yöntemin bir arada kullanılmasıyla araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, kullanılan Umbelliferae üyelerinin genel olarak bitki patojenlerine karşı, insan patojenlerine göre daha kuvvetli bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Biyootografi yöntemi ile aktif oldukları belirlenen saf maddelerin tüm mikroorganizmalara karşı etkileri denenmiş, bunun sonucunda antimikrobiyal aktiviteden kendi başlarına sorumlu olmadıkları ve uçucu yağdaki diğer maddelerin ya da bunlar arasında oluşan sinerjistik etkinin uçucu yağın mevcut aktivitesinden sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda, özellikle baharat olarak kullanıldığı rapor edilen [13, 53] *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibtorphiana* bitkisi ile halk arasında ilaç olarak kullanımlarının bildirildiği [1] *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi dışında, farklı biyolojik aktiviteye sahip olup olmadıkları araştırılmıştır. Bilindiği gibi uçucu yağlar ve bileşenleri kozmetik, gıda ve ilaç sanayiinde geniş olarak kullanılmakta [72] ve bu maddelerin herhangi bir ilacın yapımında kullanılmadan önce mutlaka mutajenik özelliklerinin araştırılması gerektiği, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir [36]. Çalışmamızda seçtiğimiz bu iki uçucu yağın, kanserojen maddelerin %90'ını oluşturan [36] mutajen özellikte maddeler olup olmadıkları, Ames *Salmonella*/mutajenite deneyi ile araştırılmıştır.

Ames testi daha önce de bahsedildiği gibi, bir çok kimyasalın mutajenitesi konusunda kısa sürede sonuç veren basit ve in-vitro bir metottur. Ames testi aynı zamanda mutajenite sonuçlarına bakılarak, test edilen kimyasalın karsinojenik etkilerini de ortaya koyabilmektedir. Bu test insanlar için gerekli olan yeni ilaçların, araştırılmasında ve geliştirilmesinde büyük rol oynamakta ancak tek başına yeterli olmamaktadır.

Çalışmamızda test ettiğimiz *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının, Çizelge 3.6. ve 3.7. de görüldüğü gibi S9'suz deneyde, TA98 suşu

için 900 µg/ml'lik dozda yüksek sayıda revertant kolonilere sahip olduğu gözlenirken, S9(+)'lu kısımda ise 1000, 900 ve 800 µg/ml'lik dozlara ait plakların tümünde, test edilen uçucu yağı, kuvvetli mutajen olarak nitelendirebileceğimiz seviyede ( $P<0.001$ ) revertant koloni sayısı olduğu belirlenmiştir. TA98 suşunun çerçeve kayması mutasyonlara duyarlılığı olduğu bildirilmiştir [37]. Bu durum göz önüne alındığında test ettiğimiz uçucu yağın çerçeve kayması mutasyonlara neden olan mutajen bir madde olabileceği söylenebilir. Aynı uçucu yağın S9'suz deneyde TA100 suşu için 1000 µg/ml'lik dozda, S9(+)'lu deney içinse yine tüm dozlarda mutajen özellik gösterebilecek ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ) anlamlı revertant koloni sayılarına sahip oldukları görülmüştür. TA100 suşunun da baz çifti değişimine neden olan yani gen mutasyonlarına duyarlı suşlar oldukları bildirilmiştir [37]. Buna göre, mutajenik özellikler gösteren *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının gen mutasyonlarına neden olabilecek bir madde olduğu söylenebilir. *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağı ise S9'suz deneyde TA 98 için, 200 µg/ml'lik dozda, S9(+)'lu deneyde ise 100 µg/ml'lik dozda kuvvetli mutajen denebilecek ( $P<0.001$ ) revertant koloni sayıları göstermiştir. TA 100 suşu için ise S9'suz deneyde 100 µg/ml de, S9'lu deneyde ise 200 µg/ml de (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ) anlamlı sonuçlar ortaya koymuşlardır. Uçucu yağların diğer dozlarında ise TA98 ve TA100 suşlarına karşı herhangi bir mutajenik etki gözlenmemiştir. Çalışmamızda da *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının ana bileşeni olarak belirlenen Metil Öjenol'ün mutajenik etkilerinin araştırıldığı benzer bir çalışmada, bu maddenin potansiyel hepatokarsinojen olan safrol ile aynı kimyasal yapıda olduklarını ve metabolik aktivasyondan sonra Metil öjenol'ün hidrosillenmiş veya sülfatlanmış gruplar halinde memeli vücudundan atıldığı bildirilmiştir. Metil öjenol'ün karsinojenik potansiyele sahip bir madde olduğu ve metabolik aktivasyondan sonra DNA'da zararlara yol açabilecek, potansiyel bir tümör indükleyici ajan olduğu bildirilmiştir [73].Yapılan benzer bir çalışmada, bu maddenin değişik dozlarda erkek ve dişi farelere enjekte edildiği ve 14 hafta sonunda farelerde hipoproteinemia ve hipoalbüminemia tabloları olduğu rapor edilmiştir [74]. Yine benzer bir çalışmada, Metil öjenol ve Safrol'ün dişi ve erkek fareler uygulandığı, deney sonucunda bu maddelerin fareler üzerinde sitotoksik ve

genotoksik etkilere sahip oldukları belirlenmiş ayrıca Metil öjenol'ün biyoaktivasyonu sonucu oluşan formlarının özellikle genotoksik etkileri olduğu belirlenmiştir [75]. Tüm bu araştırma sonuçları, çalışmamızda da Metil öjenol bulunan *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının Ames testi ile mutajen özellikler göstermesini desteklemektedir. Çalışmamızda kullandığımız diğer bir bitki olan *Heracleum sphondylium* subsp. *ternatum*'a ait uçucu yağın da bulgularımıza göre mutajenik bir potansiyele sahip olabileceği tahmin edilmekte, ancak daha önce bu bitkiye ait uçucu yağın mutajenik etkileriyle ilgili bir çalışma bulunmadığından, elde ettiğimiz sonuçlar bu bitkiye ait uçucu yağın mutajen olduğunu söylemek için yetersiz kalmaktadır. Sadece Ames testi ile değil, farklı genotipik özellikler taşıyan test suşları ile ya da farklı test yöntemleri kullanıldıktan sonra bu bitki hakkında genel bir sonuca varılabilir.

Çalışmamızda baharat ve ilaç olarak kullanıldıkları bilinen iki bitkiye ait uçucu yağ, Ames testi ile incelenmiştir. Benzer olarak, ilaç ve gıda olarak çok sık kullanılan çeşitli bitkiler ve bunlara ait uçucu yağlar ya da uçucu yağlara ait bileşenler, çeşitli araştırmacılar tarafından Ames testi kullanılarak incelenmiş ve bu bitkisel maddelerin halk arasında veya modern ilaçlarda kullanılmadan önce mutajenik özelliklerinin belirlenmesindeki önem vurgulanmıştır [44, 76-80]. Hindistan'da halk arasında sıkça kullanılan bazı bitki ve bunlardan elde edilen ürünlerin mutajenik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, halk arasındaki isimleriyle "kesari tozu, kalamus yağı ve hurma ağacından elde edilen bir içkinin, oldukça kuvvetli mutagenik etki gösterdiği, hurma uçucu yağının, pirinç rakısı ve sarımsak yağının ise zayıf mutajenik etkilere sahip oldukları bildirilmiştir [76]. Çeşitli familyalara ait bitkilerin uçucu yağlarıyla yapılan bir çalışmada *Anethum graviolens* ve *A. sowa* bitki ekstraktlarının TA98 ve TA100 suşlarına karşı mutajenik etkiler gösterdiği bildirilmiştir [79]. Yapılan başka bir çalışmada bitkisel kaynaklı (-) kamfor, 1,8-sineol, sitral, sitronellal, (-)-mentol ve terpineol maddeleri *Salmonella*/mikrozom deneyi ile test edilmiş, terpineol dışında hiçbir monoterpenin mutajenik etki göstermediği belirlenmiştir. Terpineol maddesinin ise yalnızca TA102 suşu kullanıldığında zayıf bir mutajenlik gösterdiği, diğer suşlarda mutajenik bir etki göstermediği bildirilmiştir [72]. Bu durum farklı suşlar kullanıldığında aynı maddenin farklı mutajen özellikler ortaya koyduğunu

göstermektedir. Stammati ve ark.[44] sinnamaldehit, karvon, timol, karvakrol ve trans-2-hekzanal'in mutajenik etkilerini çeşitli kısa süreli deneylerle araştırmışlar, Ames testinin S9'lu kısmında karvakrol ve timol'ün revertant sayısını 1.5 ila 1.7 kat arttırdığını bildirmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada fareler üzerinde karsinojen özellik gösteren estragole isimli bitkisel bir maddenin yapılan Ames testinde mutajenik olmadığı bildirilmiştir [75].

Çalışmamızda, *E. teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının güçlü, *H. sphondylium* subsp. *ternatum* uçucu yağının ise zayıf mutajenik özelliğe sahip maddeler olabilecekleri, Ames testi kullanılarak belirlenmiştir. Özellikle *Echinophora teunifolia* subsp. *sibtorphiana* uçucu yağının metabolik aktivasyondan sonra daha güçlü mutajenik etkiler gösterebileceği saptanmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda bu sonucu destekleyen kanıtlar bulunmuştur. Bir çok prokarsinojen maddenin enzimatik transformasyona uğrayana kadar, inaktif halde kalabildiği, ancak Ames testinde kullanılan S9 mikrozomal enzim fraksiyonu ile etkili bir şekilde biyoaktivasyonunun arttığı bildirilmektedir [81]. Sonuçlarımıza göre test ettiğimiz maddeler her ne kadar mutajen gibi görünseler de, tek bir deneyle, sınırlı özelliklere sahip birkaç bakteri suşuyla yapılan bu deneyin sonuçları daha önceden de belirtildiği gibi yeterli olmamaktadır. Ames testi "kısa zamanlı deneyler (short time assays)" olarak adlandırılan mutajen özelliklerin kısa zamanda ortaya çıkarıldığı basit bir deneydir [36, 37, 44]. Bu yüzden test edilen bir maddenin mutajen olup olmadığını kesin olarak söyleyebilmemiz için, bu testin dışında farklı genotipik özelliklere sahip mikroorganizmaların kullanıldığı ya da farklı organizmalar üzerinde farklı test yöntemlerinin uygulanması gereklidir.

**KAYNAKLAR**

1. BAYTOP, T., *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişten Bugüne*, 2. Baskı, Nobel Tıp Basımevi, İstanbul, Türkiye (1999).
2. HAMMER, K.A., CARSON, C.F., ve RILEY, T.V., *Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts*, J. Appl. Microbiol., **85**, 985-990 (1999).
3. DUKE, A.J., *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, Florida, USA (1985).
4. BAYTOP, A., *Farmasotik Botanik Ders Kitabı*, İ.Ü. Basımevi, İstanbul, Türkiye (1991).
5. GUENTHER, E., *The Essential Oils*, Vol.1, Robert E. Kriger Publishing Company, Florida, USA (1972).
6. EVANS, W.C., *Trease and Evans Pharmacognosy*, 14<sup>th</sup> edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK. (1996)
7. DEANS, S.G., *Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (Volatile) Oils*, Essential Oils and Waxes, (Eds. LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F.), **12**, 310-331 (1991).
8. LAWRANCE, M.B., *The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plants Products*, A Manual On The Essential Oil Industry, (Ed: K.T., SILVA), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, Türkiye (1995).
9. DAVIS, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburg University Press, **4**, 265, Edinburg, UK (1972).

10. KUBECZKA, K.H., *Chemical Investigations of Essential Oils of Umbellifers, Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*, (eds: MARGARIS, N., KOEDAM, N., VOKOU, D.), Martinus Nijhoff Publishers, Netherland, 165-167 (1982).
11. FRENCH, D.H., *Ethnobotany of the Umbelliferae, The Biology and Chemistry of the Umbelliferae*, (Ed: HEYWOOD V.H.), Academic Press., London, England, 385-402 (1971).
12. AKALIN, E., *Türkiye'nin Batısında Yetişen Ferulago Türleri Üzerinde Farmasotik Botanik Araştırmalar*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul (1999).
13. TANKER, N., TANKER M., ŞENER, B. ve SVENDSEN, B., *Echinophora teunifolia L. subsp. sibtorphiana (Guss.) Tutin Uçucu Yağının Gaz Kromatografisi İle Araştırılması*, J. Fac. Pharm Ankara, **6**, 161-179 (1976).
14. VANDEN BERGE, D.A ve VLIETINCK, A.J., *Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents from Higher Plants*, Methods in Plant Biochemistry, (Eds: HARBORNE, J.B., DEY, P.M.) Academic Press, London, England, 37-53 (1991).
15. JANSSEN, A.M., SCHEFFER, J.J. ve BAERHEIM, S.A., *Antimicrobial Activity of Essential Oils a Literature Review (1976-1986). Aspects of the Test Methods*, Planta Med., **53**, 395-398 (1987).
16. COWAN, M.M., *Plant Products As Antimicrobial Agents*, Clin. Microbiol. Rev., **12**, 564-582 (1999).
17. DORMAN, H.J.D. ve DEANS, S.G., *Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils*, J. Appl. Microbiol., **88**, 308-316 (2000).



18. BEŞE, M., *Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri*, Kardeşler Basımevi, İstanbul (1989).
19. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER VE P.C. ve WINN W.C., *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, 785-856 (1997).
20. HADACEK, F. ve GREGER, H., *Testing Of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice*, *Phytochem. Anal.*, **11**, 137-147 (2000).
21. ELOF, J.N., *A Sensitive Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria*, *Planta Med.*, **64**, 711-713 (1998).
22. LAMBERT, R.J.W., *Susceptibility Testing: Inoculum Size Dependency of Inhibition Using the Colworth MIC Technique*, *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 275-279 (2000).
23. DELESPAUL, Q., BILLERBECK, B.G.; ROQUES, C.G., MICHEL, G., VINUALES, C.M. ve BESSIERE, J.M., *The Antifungal Activity of Essential Oils as Determined by Screening Methods.*, *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 256-266 (2000).
24. DIĞRAK, M., ALMA, H.A., İLÇİM, A. ve ŞEN, S., *Antibacterial and Antifungal Effects of Various Plant Extracts*, *Pharm. Biol.*, **37**, 216-220 (1999).
25. SÖKMEN, A., JONES, B.M. ve ERTÜRK, M., *The in Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants*, *J. Ethnopharm.*, **67**, 79-86 (1999).

26. MEHRABIAN, S., MAJD, A. ve MAJD, I., *Antimicrobial Effects of Three plants on Some Airborne Microorganisms*, *Aerobiologia*, **16**, 455-458 (2000).
27. RAHALISON, L., HAMBURGER, M., MONOD, M., HOSTETTMANN, K. ve FRENK, E., *Antifungal Tests in Phytochemical Investigations: Comparison of Bioautographic Methods Using Phytopatogenic and Human Pathogenic Fungi*, *Planta Med.*, **60**, 41-44 (1994).
28. RAHALISON, L., HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K., MONOD, M. ve FRENK, E.A., *Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants*, *Phytochem Anal.*, **2**, 199-203 (1991).
29. HOSTETTMANN, K., *Strategy for the Biological Evaluation of Plant Extracts*, *Pure App. Chem.*, **70**, 1109-1113 (1998).
30. MARTINI, N. ve ELOFF, J.N., *The Preliminary Isolation of Several Antibacterial Compounds from Combretum erythrophyllum (Combretaceae)*, *J. Ethnopharm.*, **62**, 255-263 (1998).
31. NOSTRO, A., GERMANO, M.P, D'ANGELO, V., MARINO, A. ve CANNATELLI, M.A., *Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**, 379-384 (2000).
32. CANNEL, J.P.R., *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey, USA, 240-241 (1998).
33. İŞCAN, G., DEMİRCİ, F., KİRİMER, N., KÜRKÇÜOĞLU, M. ve BAŞER, K.H.C., *Antimicrobial Screening: Mentha piperita Essential Oil*, Interactions in the Microbial World, 9<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, The Netherlands, 323 (2001).

34. BASIM, H., YEGEN, O. ve ZELLER., W., *Antibacterial Effect of Essential oil of Thymbra spicata L. var. spicata on Soma Plant Pathogenic Bacteria*, J. Plant Dis. Prot., **3**, 279-284 (2000).
35. ANON, European Commission Health & Consumer Protection Directorate, Opinion of the Scientific Committee on Food on Estragole, C2-Management of Scientific committees II; Brüksel, Belçika (2001).
36. ERGENE, E., *Bazı 2-Substitue 1H-Fenetro [9,10-d] İmidazol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (1998).
37. MARON, D.M. ve AMES, B.N., *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*, Mut. Res., **113**, 173-215 (1983).
38. RUSSEL, J.P., *Genetics*, Cummings Publishing Company, California, USA (1998).
39. BOZCUK, A.N., *Genetik*, Palme Yayıncılık, Ankara (2000).
40. ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, I.M. ve THOMSEN, W.J., *Bioassay Techniques for Drug Development*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands (2001).
41. SVOBODA, K.P. ve HAMPSON, J.B., *Bioactivity of Essential Oils of Selected Temperate Aromatic Plants: Antibacterial, Antioxidant, Antiinflammatory and Other Related Pharmacological Activities* (1999), <http://www.csl.gov.uk/ienica/Semainars/SPEC%20CHEMS/svoboda.pdf> (Download Tarihi: Mayıs'2001).

42. GRAYER, R.J. ve KOKUBUN, T., *Plant-Fungal Interactions: the Search for Phytoalexins and Other Antifungal Compounds from Higher Plants*, *Phytochemistry*, **56**, 253-263 (2001).
43. TSAO, R. ve ZHOU, T., *Antifungal Activity of Monoterpenoids against Postharvest Pathogens Botrytis cineres and Monilia fructicola*, *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 113-121 (2000).
44. STAMMATI, A., BONSI, P., ZUCCO, F., MOEZELAAR, R., ALAKOMI, H.L. ve WRIGHT, A., *Toxicity of Selected Plant Volatiles in Microbial and Mammalian Short-term Assays*, *Food Chem Toxicol.*, **37**, 813-823 (1999).
45. AGRIOS, G.N., *Plant Pathology*, Academic Press, East Kilbride, Scotland, (1985).
46. MUTLU, M.B., *Immunofloresan Yöntemiyle Fasulye Tohumlarında Pseudomonas syringae pv. phaseolicola aranması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (2001).
47. KAYSER, F.H., KURT, A.B., ECKERT, J. ve LINDENMANN, J., *Tıbbi Mikrobiyoloji*, (Eds: Küçüker, M.A., Tümbay, E., Anđ, Ö.) Nobel Tıp Kitap Basımevi, İstanbul (1997).
48. ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, M.I., FAROOQ, A., AHMED, A., IQBAL, M.Z., DEMİRCİ, B., DEMİRCİ, F. ve BAŞER, K.H.C., *Antifungal Activities and Essential Oil Constituents of Some Spices from Pakistan*, 7<sup>th</sup> International Symposium on Natural Products, Karachi, Pakistan (1998). ([www.reprints.net/escos-3.htm](http://www.reprints.net/escos-3.htm)-download tarihi 2001).

49. ALVAREZ, P.P.A., BISHOP, C.D. ve VILLALOBOS, M.J.P., *Antifungal Activity of the Essential Oil of Flowerhand of Garland Chrysanthemum (Chrysanthemum coronarium) Against Agricultural Pathogens*, *Phytochemistry*, **57**, 99-102 (2001).
50. TÜRKÜSAY, H. ve ONOĞUR, E., *Bazı Bitki Ekstraktlarının In Vitro Antifungal Etkileri Üzerine Araştırmalar*, *Tr. J. Agric. Fores.*, **22**, 267-271 (1998).
51. HAMMER, K.A., CARSON, R.F. ve RILEY, T.V., *In-vitro Activity of Essential Oils, in Particular Melaleuca alternifolia (tea tree) Oil and Tea Tree Oil Products, Against Candida spp.*, *J. Antimic. Chemother.*, **42**, 591-595 (1998).
52. JANSSEN, A.M., CHIN, N.L.J., SCHEFFER, J.J.C. ve BAERHEIM, S.A., *Screening for Antimicrobial Activity of some Essential Oils by the Agar Overlay Technique*, *Pharm Weekbl.*, **8**, 289-292 (1986).
53. KIVANÇ, M., *Antimicrobial activity of "Çörtük" (Echinophora sibtorphiana Guss.) spice, its essential oil and Methyl-eugenol*, *Die Nahrung*, **32**, 635-637 (1988).
54. AKGÜL, A., *A New Spice From Turkey: Laser trilobum (L.) Borkh.*, *Acta Alimentaria*, **18**, 65-69 (1989).
55. ZGODA, J.R. ve PORTER, J.R., *A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi*, *Pharm. Microbiol.*, **39**, 221-225 (2001).

56. OJALA, T., REMES, S., HAANSUU, P., VUORELA, H., HILTUNEN, R., HAAHTELA, K. ve VUORELA P., *Antimicrobial activity of Some CoumarinContaining Herbal Plants Growing in Finland*, J. Ethnopharm., **73**, 299-305 (2000).
57. KIVANÇ, M. ve AKGÜL, A., *Sensivity of our Foodborne Mould to Essential Oils from Turkish Species, Herbs and Citrus Pell*, J Sci Food Agric, **47**, 129-132 (1989).
58. KIVANÇ, M. ve AKGÜL., *Mould Growth on Black Table Olives and Prevention by Sorbic Acid, Methyl Eugenol and Spice Essential Oil*, Die Nahrung, **34**, 369-373 (1990).
59. DEMİRCİ, F., İŞCAN, G., GÜVEN, K., KIRIMER, N., DEMİRCİ B. ve BAŞER, K.H.C., *Antimicrobial Activities of Ferulago Essential Oils*, Z. Naturforsch. C, **55**, 886-889 (2000).
60. KWON Y.S., KOBAYASHI, A., KAJIYAMA, S.I., KAWAZU, K., KANZAKI, H. ve KIM, C.M., *Antimicrobial Constituents of Angelica dahurica Roots*, Phytocemistry, **44**, 887-889 (1997).
61. AL-YAHYA, M.A., MUHAMMED, I., MIRZA, H.H. ve EL-FERALY, F.S., *Antibacterial Constituents from Rhizomes of Ferula communis*, Phytoter. Res., **12**, 335-339 (1998).
62. ULUBELEN, A., TOPÇU, G., TAN, N., ÖLÇAL, S., JOHANSSON, C., ÜÇER, M., BİRMAN ve H., TAMER, Ş., *Biological Activities of a Turkish Plant, Prangos platyclaena*, J. Ethnopharm., **45**, 193-197 (1995).
63. RUBERTA, G., BARATTA, M.T., DEANS, S.G. ve DORMAN, H.J.D., *Antioxidant and Antimicrobial Activity of Foeniculum vulgare and Crithmum maritimum Essential Oils*, Planta Med., **66**, 687-693 (2000).

64. MOMIN, R.A., RAMSEWAK R.S. ve NAIR M.G., *Bioactive Compounds and 1,3-di[(cis)-9-octadecenoyl]-2-[(cis,sic)-9,12-octadecadienoyl]glycerol from Apium graveolens L. Seeds*, J. Agric. Food Chem., **48**, 3785-3788 (2000).
65. SARDARI, S., AMIN, G., MICETICH, R.G. ve DANESHTALAB, M., *Phytopharmaceuticals Part1. Antifungal Activity of Selected Iranian and Canadian Plants*, Pharm. Biol., **36**, 180-188 (1998).
66. MCCUTCHEON, A.R., ELLIS, S.M., HANCOCK, R.E.W. ve TOWERS, G.H.N., *Antifungal Screening of Medicinal Plants of British-Columbian Native Peoples*, J. Ethnopharm., **44**, 157-169 (1994).
67. LARHSINI, M., LAZREK H.B., AMAROUCH, H. ve JANA, M., *Investigation of Antifungal and Analgesic Activities of Extracts from Sium nodiflorum*, J. Ethnopharm., **53**, 105-110 (1996).
68. BALCHIN, M. ve ROTH, G., *Composition of the Essential Oils of P. odoratissimum, Pelargonium exstipulatum, and P. x fragrans (Geraniaceae) and Their Bioactivity*, Flav. Frag. J., **15**, 391-394 (2000).
69. SALEH, M., KAMEL, A., LI, X., ve SWARAY, J., *Antibacterial Triterpenoids Isolated From Lantana camara*, Pharm. Biol., **37**, 63-66 (1999).
70. ARCTANDER, S., *Perfume and Flavor Chemicals*, Det Hoffensbergshe Estalissement, Copnhagen, Denmark (1969).
71. JANSSEN, A.M., SCHEFFER, J.J.C., BAERHEIM, S.A. ve AYNEHCHI, Y., *The Essential Oil of Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss. Chemical Composition and Antimicrobial Activity*, Pharm Weekbl, **6**, 157-160 (1984).

72. GOMES, M.R., FELZENSZWALB, I. ve PAUMGARTTEN, F., *Mutagenicity Testing of ( $\pm$ )-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome Assay*, Mut. Res., **416**, 129-136 (1998).
73. LEWIS, J.B., *Methyleugenol: Studies in Metabolism and Effects on Hepatic DNA*, Doktora Tezi, Arizona Üniversitesi, USA (1999).
74. ABDO, K.M., CUNNINGHAM, M.L., SNELL, M.L., HERBERT, R.A., TRAVLOS, G.S., ELDRIDGE, S.R. ve BUCHER, J.R., *14-Week Toxicity and Cell Proliferation of Methyleugenol Administered by Gavage to F344 Rats and B6C3F1 Mice*, Food Chem. Toxicol., **39**, 303-316 (2001).
75. VINCENZI, M.D., SILANO, M., MAIALETTI, F. ve SCAZZOCCHIO, B., *Constituents of Aromatic Plants: II. Estragol*, Fitoterapia, **71**, 725-729 (2000).
76. SIVASWAMY, S.N., BALACHANDRAN, B. ve SIVARAKRISHNAN, V.M., *Mutagenic Activity of South Indian Food Items*, Indian J. Exp. Biol., **29**, 730-737 (1991).
77. UNGSURUNGSIE, M., SUTHIENKUL, M. ve PAOVALO, C., *Mutagenicity Screening of Popular Thai Spices*, Food Chem. Toxicol., **20**, 527-530 (1982).
78. AZIZAN, A. ve BLEVINS, R.D., *Mutagenicity and Antimutagenicity Testing of Six Chemicals Associated with the Pungent Properties of Specific Spices as Revealed by the Ames Salmonella/microsomal Assay*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **28**, 248-258 (1995).
79. FAKUOKA, M., YOSHIHARA, K., SAKAMOTO, K., NATORI, S., IWAHARA, S., HOSAKA, S. ve HIRONO, I., *Characterization of Mutagenic Principles and Carcinogenicity of dill weed and seeds*, Journal of Pharmacobio-Dynamics, **3**, 236-244 (1980).



80. HIGASHIMOTO, M., PURINTRAPIBAN, J., KATAOKA, K., KINOUCI, K., VINITKETKUMNUEN, U., AKIMOTO, S., MATSUMO, H. ve OHNISHI, Y., *Mutagenicity and Antimutagenicity of Extracts of Three Spices and A Medicinal Plant in Thailand*, *Mut. Res.*, **303**, 135-142 (1993).
81. HAKURA, A., SUZUKI, S. ve SATOH, T., *Advantage of the Use of Human Liver S9 in the Ames Test*, *Mut. Res.*, **438**, 29-36 (1999).