



**T.C.**

**SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIVAS BÖLGESİNDE YETİŞEN SARI KANTARON  
BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**MELAHAT SUSAMIŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIVAS-2019**

**T.C.  
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİVAS BÖLGESİNDE YETİŞEN SARI KANTARON  
BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**MELAHAT SUSAMIŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. AHMET ALİM**

**SİVAS-2019**

**“Sivas Bölgesinde Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması”** adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Mikrobiyoloji** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Müge OĞUZKAYA ARTAN



Üye (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet ALİM



Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ATAŞ



ONAY

Bu tez çalışması, 04/04/2019 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### SİVAS BÖLGESİNDE YETİŞEN SARI KANTARON BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Melahat SUSAMIŞ

Yüksek Lisans Tezi

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ALİM

2019, 55 Sayfa

Bitkilerin hastalıkları iyileştirme gücüne olan inanç insanlık tarihi kadar eskidir. Bitkisel kökenli üç binin üzerinde uçucu yağ bilinmekte ve bunların yüzlercesi dünya ticaretine ve bilimsel çalışmalara konu olmaktadır. Bu konulardan biri de sentetik ilaçlara direnç geliştiren mikroorganizmalara karşı tıbbi bitkilerden elde edilen uçucu yağların kullanımınıdır. Bitkilerin kimyasal içeriği ve aktif bileşen yapılarının araştırılması ile bulunan uçucu yağlar, son yıllarda büyük bir önem kazanmıştır. Uçucu yağların antibakteriyel özellik göstermesi ve farklı türlere ait olan uçucu yağların da çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalarda yoğunluk kazanmıştır.

Bu çalışmada *Hypericaceae* familyasına ait olan *Hypericum perforatum* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kurutulan bitkilerin gövde, çiçek ve yaprak kısımları kullanılarak uçucu yağları elde edilmiştir. Bitkilerin madde içeriğini oluşturan bileşenler ‘Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GS-MS)’ analiz yöntemiyle belirlendi. En yüksek kimyasal bileşeni *H. perforatum*’da Germacrene D, *H. scabrum*’da  $\alpha$ -Pinene olarak belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmasında Disk Diffüzyon (Kirby-Bauer) ve Mikrodilüsyon Yöntemleri kullanıldı. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için altı bakteri *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) ve iki maya *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Candida tropicalis* (DSM 11953) kullanılmıştır.

*H. perforatum* uçucu yağının incelenen konsantrasyonlarda *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerine etkisiz olduğu saptanırken, 100 mg/ml’lik konsantrasyonda en büyük zon çapı sırasıyla *S. aureus* (22 mm), *E.coli*’de (18 mm) ve *P. aeruginosa*’da (16 mm) gözlemlendi. *H. scabrum* uçucu yağı emdirilmiş diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmadığı, bu nedenle

de *H. scabrum* uçucu yağının deneyde kullanılan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin olmadığı saptandı.

*H. perforatum* bitkisinin uçucu yağından elde edilen GC/MS sonuçlarına göre 70 adet bileşen bulunmuştur. Majör bileşen olarak Germacrene D (%8.71), Caryophyllene oxide (%8.44),  $\alpha$ -Pinene (%6.35) ve en az bileşen olarak ta  $\beta$ -Copaene (%0.22) bulunmuştur. *H. scabrum* bitkisinin uçucu yağından elde edilen GC/MS sonuçlarına göre ise 33 adet bileşen bulunmuştur. Majör bileşen olarak  $\alpha$ -Pinene (%45.34), Thymol (%4.57), Spathulenol (%3.75) ve en az bileşen olarak ta epi-Muurolol (%0.48) bulunmuştur.

*Hypericum* türlerinden elde edilen uçucu yağlarının farmasötik endüstrisinde kullanılabilen yeni bileşiklerin üretimini geliştirmek için yeni stratejiler sunabileceği kaçınılmazdır.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal aktivite, *Hypericeae*, Sarı Kantaron, Uçucu yağ, Disk Diffüzyon yöntemi, Mikrodilüsyon yöntemi.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ST. JOHN'S WORT IN SIVAS REGION

Melihat SUSAMIŞ

Master Thesis

Department of Pharmaceutical Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ALİM

2019, 55 Sayfa

The belief in the healing power of plants is as old as the history of mankind. There are over three thousand essential oils of plant origin that known and hundreds of them are subjected to world trade and scientific studies. One of these issues is the using of essential oils derived from medicinal plants against microorganisms that develop resistance to synthetic drugs.

Essential oils, which is found by researching chemical composition and active ingredient structure of plants, have gained a great importance in recent years. Antibacterial properties of essential oils and volatile oils which are belonging to different species have also been intensified in studies related to the effect on various microorganisms.

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of *Hypericum scabrum* and *Hypericum perforatum* plants which are belonging to the family of Hypericaceae. For this purpose, the body, flower and leaf parts of the dried plants were used for obtaining the essential oils. The highest chemical component was observed  $\alpha$ -Pinene in *H. scabrum* and Germacrene D in *H. perforatum* Gas Chromatography Mass Spectrometry (GS-MS) was used to determine the components of the substance content of the plants. Disc diffusion (Kirby-Bauer) and microdilution methods were used for antibiotic susceptibility testing.

To determine the antimicrobial activity of essential oils, six bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), two yeasts *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Candida tropicalis* (DSM 11953) were used.

At the studied concentrations *H. perforatum*'s essential oil was found to be ineffective on *E. faecalis* and *C. albicans*. The largest zone diameter at the concentration of

100 mg/ml was observed on *S. aureus* (22 mm), *E. coli* (18 mm) and *P. aeruginosa* (16 mm), respectively.

*H. scabrum* essential oil did not form an inhibition zone around the discs that were impregnated with essential oil, so *H. scabrum* essential oil had no antimicrobial effect on the microorganisms used in the experiment.

According to the results of GC/MS which is obtained from the essential oil of *H. perforatum* plant, 70 components were found. Major components were Germacrene D (8.71%), Caryophyllene oxide (8.44%),  $\alpha$ -Pinene (6.35%), and as the least component  $\beta$ -Copaene (0.22%) is found.

According to the results of GC/MS which is obtained from the essential oil of *H. scabrum* plant, 33 components were found. Major components were  $\alpha$ -Pinene (45.34%), Thymol (4.57%), Spathulenol (3.75%) found, and epi-Muurolol (0.48%) as the least component.

It is inevitable that the essential oils derived from the *Hypericum* species can offer new strategies to improve the production of new compounds that can be used in the pharmaceutical industry.

**Key Words:** Antimicrobial Activity, St. John's Wort, Essential Oil, Disk Diffusion Method, Microdilution Method.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, çalışmamın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren, bana yol gösteren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bilgisiyle benden yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımı neticelendirmemde büyük payı olan Dr. Öğretim Üyesi Mehmet ATAŞ'a, çalışma süresince her konuda beni destekleyen değerli arkadaşım Öğretim Görevlisi Eda SÖNMEZ GÜRER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan maddi ve manevi desteklerini benden hiç esirgemeyen babam İhsan SUSAMIŞ ve annem Mevlüde SUSAMIŞ başta olmak üzere tüm aile bireylerime sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 <i>Hypericaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri .....	4
2.1.1 <i>Hypericum perforatum</i> L. sistematigi .....	4
2.1.2 <i>Hypericum perforatum</i> L. ( Sarı Kantaron) .....	5
2.1.3 <i>Hypericum scabrum</i> L. sistematigi .....	9
2.1.4 <i>Hypericum scabrum</i> L. (Mayasıl otu, Kepir otu) .....	10
2.2 Uçucu Yağların Genel Özellikleri .....	10
2.3 Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri .....	12
2.3.1 Destilasyon Yöntemi .....	12
2.3.2 Ekstraksiyon Yöntemi .....	12
2.3.3 Soğukta Sıkma (Mekanik Yöntem) .....	13
2.4 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özellikleri .....	13
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1 Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar .....	15
3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	15
3.3 Bitki Örneklerinin Toplanması ve Tiplendirilmesi .....	16
3.3.1 Bitki Örneklerinden Uçucu Yağ Elde Edilmesi .....	16
3.3.2 Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS ) Analizi .....	16
3.4 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması .....	17
3.4.1 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar .....	17
3.4.2 Besiyerlerinin Hazırlanması .....	17
3.4.3 Bakteri ve Mantar Suşlarının Canlandırılması .....	19

3.5	Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması .....	19
3.5.1	Disk Difüzyon (Kirby-Bauer ) Yöntemi .....	19
3.5.2	Mikrodilüsyon Broth Yöntemi.....	20
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>22</b>
4.1	GC/MS Analiz Sonuçları .....	22
4.2	Disk Difüzyon (Kirby-Bauer ) Yöntemi Bulguları .....	23
4.3	Mikrodilüsyon Broth Yöntemi Bulguları.....	25
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>27</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>30</b>
6.1	Sonuç.....	30
6.2	Öneriler .....	30
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>31</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>39</b>	
<b>ETİK KURUL RAPORU .....</b>	<b>41</b>	

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1:</b> <i>H. perforatum</i> L. bitkisinin görüntüleri .....	5
<b>Resim 2:</b> <i>H. scabrum</i> bitkisinin görüntüsü .....	10
<b>Resim 3:</b> Besiyerlerinin hazırlanması .....	19
<b>Resim 4:</b> <i>H. perforatum</i> 'un <i>B. cereus</i> ve <i>S.aureus</i> bakterilerine karşı etkisi .....	24



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1:</b> <i>H. perforatum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşenleri.....	22
<b>Çizelge 2:</b> <i>H. scabrum</i> Uçucu Yağının Kimyasal Bileşenleri .....	23
<b>Çizelge 3:</b> <i>H. perforatum</i> yağının disk difüzyon sonuçları .....	24
<b>Çizelge 4:</b> <i>H. scabrum</i> uçucu yağının disk difüzyon sonuçları .....	25
<b>Çizelge 5:</b> <i>H. perforatum</i> ve <i>H. scabrum</i> uçucu yağlarının MIC sonuçları .....	26



## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GC-MS</b>	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
<b>TTC</b>	2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>SG</b>	Streptomycin- Gentamycin



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanoğlu, hayatını sürdürebilmek için ihtiyaç duyduğu besinlerin önemli bir kısmını bitkilerden karşılamaktadır. Bitkiler karbonhidrat, protein, yağ, mineral madde ve vitaminler gibi besin bileşenleri için oldukça önemli kaynaktır. Bitkiler besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşımakla beraber, başta ilaç sanayi olmak üzere; kimya, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı uçucu yağ kimyasal bileşenlerini içermektedir. Bu kimyasallara genel olarak ‘sekonder metabolit’ adı verilmekte ve bitkisel ürünler çoğu kez bu başlık altında değerlendirilmektedir. Sekonder metabolitlerin sayı ve yapı itibarı ile çok büyük çeşitlilikte üretilmeleri yüksek bitkilere has özelliklerden birisidir. Bu metabolitler daha çok savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesilleri sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş, oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu bilinmektedir (David, 1993).

İnsanlar tarih boyunca bitkilerden farklı şekillerde yararlanmışlardır. Dünyadaki tüm kıtalarda çeşitli nedenlerden dolayı bitkilerin kullanıldığına dair sayısız tarihi belgeler bulunmaktadır. Bundan altmış bin yıl önce yaşamış olan Neandertal’lerin, bugün Irak bölgesinde bulunan ‘hollyhock’ bitkisini çeşitli hastalıklarda kullandıkları keşfedilmiştir. Bitkilerin kaynatılarak suyundan faydalanılmış, farklı formları açık yaralara lapa haline getirilip sürülmüş veya direk gıda olarak tüketilmiştir. Elbette bu kullanım biçimi etken madde olan sekonder üründen çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktadır. Bugün de bitkilerle tedavi yöntemleri pek çok araştırmaya konu olmakta ve özellikle gelişmiş ülkelerde alternatif tıp adıyla tıbbi bitkiler her geçen gün önem kazanmaktadır (Cowan, 1999).

Tıbbi ve aromatik bitkiler, hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkiler şeklinde tanımlanmaktadır (Bayram ve ark., 2010). Tıbbi ve aromatik bitki uçucu yağları bakteri, virüs, fungus, parazit ve insektisitlere karşı etkilidir. Uçucu yağlar ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Bakkali ve ark., 2008). Uçucu yağların çok geniş bir kullanım alanına sahip olması birçok bilim adamının dikkatini çekmiştir. Yapılan birçok araştırma sonucunda kimyasal yapıları ve biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiş ve bu özellikleri

uygulamaya konulmuştur (Mouhssen, 2004). Uçucu yağlar bitkilerden elde edilen aromatik bileşiklerdir. Uçucu yağlar bitkinin yaprak, gövde gibi özel hücre veya hücre gruplarında bulunmaktadır (Oussalah ve ark., 2007). Günümüzde bilinen yaklaşık 3000 adet uçucu yağın 300 tanesi ilaç, gıda, kozmetik ve parfüm gibi farklı endüstrilerde kullanılmaktadır. Özellikle bazı bitkilerin uçucu yağları tıbbi özellikler göstermekte ve çeşitli sistemik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Bakkali ve ark., 2008). Ayrıca tedavi alanında son yıllarda bitkilere olan ilginin artmasıyla, alternatif tedavi arayışları, enfeksiyon etkenlerine karşı antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktlarının destek tedavi olarak kullanımının yaygınlaşması, bitkilerin daha fazla araştırılmasına sebep olmuştur (Nakipoğlu ve ark., 1992).

Dünya genelinde hastalıkları tedavi etmede kullanılan pek çok bitki türü mevcuttur. Ekvator kuşağından kuzeyde İskandinav ülkelerine kadar dünyanın farklı coğrafyalarında yayılış gösteren *Hypericum* türleri de bunlardan birisidir (Crockett ve Robson, 2011). Bu türler halk ilacı olarak yüzyıllardan bu yana sinir hastalıkları, adet krampları, siyatik, eklem iltihabı ve midevi rahatsızlıklardan kaynaklanan ağrıların giderilmesinde ve bazı cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. *Hypericum* türleri içerisinde en yaygın ve popüler olanı halk arasında 'Sarı Kantaron' olarak bilinen *Hypericum perforatum* L.'dur. Bu tür son 30 yıldan bu yana yoğun olarak çalışılmakta olup günümüzde bilhassa depresyon tedavisinde kullanılmaktadır (Solomon ve ark., 2013).

Antik Çağlardan beri *H. perforatum*'un yara iyileştirici, ağrı kesici, diüretik etkilerinden yararlanılmış ve zehirli ısırılmalara karşı halk arasında kullanılmıştır (Boon ve Smith, 1999). Eski Yunan ve Roma zamanlarından bu yana *H. perforatum*, akciğer, barsak, böbrek ve idrar yollarının kronik hastalıklarında, gece idrarını kaçırarak çocukların tedavisinde, yara ve yanık iyileşmesinde ve antimikrobiyal olarak halk arasında kullanılmış olan bir bitkidir (Duke, 1985).

Yurt dışında St. John's wort olarak bilinen *H. perforatum* üzerinde yapılan çalışmalar antidepresan, antimikrobiyal, antiviral aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Sarı kantaron Amerika'da ve Avrupa'da popüler bitkisel ürünler arasında yer alıp, özellikle orta ve ileri derecede depresyon tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Özkan ve ark., 2013).



*H. perforatum* başta olmak üzere tüm *Hypericum* türleri son 30 yıldır farmakolojik ve kimyasal anlamda yoğun olarak çalışılmakta ve bu bitkinin tıbbi amaçlı kullanımı ve önemi ile ilgili bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Çırak ve Kurt, 2014). Günümüzde ortaya çıkan antibiyotiklere karşı direnç sorunu ve tedavi amacıyla da kullanılan bitkilerin daha yoğun çalışılmasını da beraberinde getirmektedir. Literatürde sarı kantaronun antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcut olup, Sivas bölgesinden toplanan sarı kantaronun antimikrobiyal etkinliğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada *Hypericaceae* familyasına ait olan *H. perforatum* ve *H. scabrum* bitkilerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Hypericaceae* Familyasının Genel Özellikleri

*Hypericum* çok yaygın olan bir genustur. Saydam salgı sıvısında uçucu yağ ve kırmızı veya siyah sıvısında hiperisin içeren çalı, otsu şekle sahip olan bitkilerdir. Yaprakları basit, karşılıklı ya da çevresel diziliş gösterir. Sepal ve petalleri 5 adet olup genellikle sarı, kırmızı damarlı, serbest, tomurcuktayken buruşuktur. Stamenleri çok sayıda ve birleşik haldedir. Tohumlar endosperm içermez (Baytop, 1993; Robson, 1967).

Clusiaceae (Guttiferae) veya *Hypericaceae* familyası uçucu yağ ve reçine içeren 35 kadar cins ve 400'den fazla türe sahip bir familyadır. Bu familya 5 tane alt familyaya ayrılır. Bu alt familyalar Bonnetioideae, Calophylloideae, Moronobeoideae, Clusioideae ve Hypercoideae'dir. Ülkemizde bu familya 1 cins ve 100 civarında taksonla temsil edilmektedir (Baytop, 1999). Cins üyelerinin coğrafi bölgelerdeki yayılışı farklılık göstermektedir (Güner ve ark., 2000). Avrupa, Asya, Avustralya ve Amerika'nın bir kısmında bulunan *Hypericum* cinsinin Avrupa'da 10, Türkiye'de ise 89 türü yetişmektedir. Bunların 43'ü ise endemiktir (Baytop, 1999).

*Hypericum* L.'nin türkiyede en yaygın temsil edilen türleri, *H. perforatum* L. (sarı kantaron), *H. triggetrifolium*, *H. calycinum* (Büyük çiçekli binbirdelik otu), *H. empetrifolium* Willd. (püren, sarı püren), *H. scabrum* L. (mayasıl otu, kepirotu), *H. tedrapetum* Fries'dir (Baytop, 1974; Davis, 1988).

#### 2.1.1 *Hypericum perforatum* L. sistematığı

**Divisio:** Spermatophyta

**Subdivisio:** Angiospermae

**Clasis:** Dicotyledoneae

**Subclasis:** Magnolipsida

**Ordo:** Theales

**Familya:** Clusiaceae (*Hypericaceae*, *Guttiferae*)

**Genus:** *Hypericum perforatum* (Kantaron otu, Binbirdelik otu) (Davis,1988).

Türkçe'de: Binbirdelik otu, Sarı kantaron, kan otu, yara otu, koyun kıran, kılıç otu, püren

İngilizce'de: St. John's Wort

Almanca'da: Johanniskraut

Fransızca'da: Millepertuis (Baytop ve ark., 2003; Üstün, 1998).

### 2.1.2 *Hypericum perforatum* L. ( Sarı Kantaron)

*Hypericum* cinsi Clusiaceae familyası ve *Hypericaceae* alt familyasına ait olan sarı kantaron olarak da bilinen *H. perforatum* çok yıllık, sarı renkte çiçekli bir bitkidir. Tüysüz, dik, genellikle tabanda odunsu bir yapıya sahiptir. Yaprakları sapsız, oval ve doğrusal olup, yaprak yüzeyinde şeffaf gözenek içeren ve bazen hiperisin bulunduran ya kırmızı ya da siyah salgılı, çalılar veya otsu bitkiler içerir. Haziran'dan Eylül'e kadar çiçek açabilir (Meral ve ark., 2002).



**Resim 1:** *H. perforatum* L. bitkisinin görüntüleri (Peşin, 2007).

*Hypericum* türlerinin bitkisel tedavi edici olarak kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. Günümüzden 2400 yıl öncesine kadar yaraları iyileştirici olarak kullanılmıştır. Yunanlı hekimler olan Galen ve Dioscorides, *H. perforatum*'u daha çok ve menstrual rahatsızlıkları gidermede ve idrar söktürücü, yaraları tedavi edici olarak tanımlamışlardır. Avrupa'da daha çok St. John's Wort (Aziz John bitkisi) olarak bilinmektedir. Bitki ışığa doğru tutulduğunda yapraklarının file şeklindeki delikli görünümü nedeniyle binbir delik otu, sıkıldığında çiçeğinden kırmızı boya akması nedeniyle de kan otu olarak halk arasında yaygın bir biçimde kullanılmıştır (Yesilada ve ark., 1995). Hristiyanlığın yayılışı ile birlikte bitki Müslümanların Hz. Yahya olarak bildiği

Saint John Baptist ile ilişkilendirilmiştir. Hz. Yahya Kuran-ı Kerimde isimi yer alan peygamberlerdendir. Tıpkı Hz. isa gibi mucizevi bir şekilde doğmuştur ve onu kendinden sonra gelecek peygamber olarak müjdelemiştir. Bu sebeple Hristiyanlarca kutsal bir kişi olarak kabul görmektedir. İnanışa göre; kantaron ilk defa onun doğum gününde çiçek açmıştır. St. John günü adıyla her sene kutlanan bu gün çiçeklenmenin en yoğun olduğu 24 Hazirana rastlamaktadır. Sarı kantaronun çiçeklerinde yoğun olarak bulunan kırmızı renkli sıvının Hz. Yahya'nın kanı olduğuna inanılmaktadır. Birçok mistik ve kutsal özellikler bu bitkiye isnat edilmiştir. Bu sebeple insanlar, ruhlarını şeytanlardan korumak için sarı kantaron otunu kullanmışlardır. Kantaron hala Hristiyan aleminde kutsal bir bitki olarak tanınmaktadır (Gerard, 1597). Bir diğer rivayette ise haçlı seferleri sırasında yaralanan St. John şövalyelerinin yaralarının tedavisi bu bitki ile yapıldığından bu ismi aldığı şeklindedir (Üstün, 1998).

Bitki coğrafyası bakımından Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan gibi üç ana bitki coğrafyası bölgesinin Türkiye üzerinde bir arada olması ve dünyanın en önemli iki gen merkezinin çakıştığı bir yörede bulunması Türkiye'de çok zengin bir bitkisel çeşitliliğe neden olmuştur. Türkiye'de bulunan bitki tür ve alttürlerinin 3200 kadarını yani yaklaşık olarak % 30' unu endemik bitkilerin oluşturduğu bilinmektedir (Ayanoglu ve ark., 1999). *Hypericum* cinsi, genellikle İran-Turan ve Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yayılış göstermektedir. *Hypericum* cinsinin ait olduğu *Hypericaceae* familyası üyelerine ait bitkiler uçucu yağ içermekte olup, hiperisin adlı flavonoidi içeren bazen de kırmızı veya siyah bezlere sahip çalı ya da otlardır (Davis, 1965).

*H. perforatum*, Türkiye'de ve Avrupa'da yaygın yetişen bir bitkidir. Dünya'da daha çok Avrupa'da, Batı Asya'da ve Kuzey Afrika'da yaygın olarak bulunurken, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Afrika ve dünyanın diğer sıcak bölgelerinde yabancı ot olarak karşımıza çıkmaktadır (Walker ve ark., 2001; Campbell ve Delfosse, 1984). Türkiye'de bu bitki Marmara, Ege, Akdeniz, Karadeniz, Orta ve Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yetişmekte olup daha çok Toroslar ve civarında rastlanmaktadır (Davis, 1967; Güner ve ark., 2000; Yesilada, 1995).

*H. perforatum*, deniz seviyesinden 2500 m yükseklikte orta derecede nemli bölgelerde doğal yayılış gösterir (Davis, 1967). Tropikal ve ılıman iklim bölgeleri boyunca bu bitki daha çok; kayalık yerlerde, kalker taşlı toprakta, yol ve orman kenarında, çimenli

nehir alanlarında, bataklık ve sahillerde, çayırdaki, ekim yapılmayan tarlalarda, boş alanlarda, yazı kurak, kışı nemli olan bölgelerde rastlanır (Kaçar ve Azkan, 2005; Abrahamson ve ark., 1970; Adams, 1977).

*H. perforatum* daha çok yetiştiği bölgeye göre: “Kantaron, kantaron çayı, sarı kantaron, kantaryon, sarıcaayüz, kantül, kesik otu, mide otu, kalp otu, kan otu, kılıç otu, koyunkıran, kuzukıran, mayasıl otu, yara otu” olarak adlandırılmıştır. Tedavi amacıyla kullanılmakta olan diğer bir tür *H. calycinum* L. “büyük çiçekli binbirdelik otu”; *H. empetrifolium* Willd. “sarı püren” ve *H. scabrum* L. ise “mayasıl otu, kepir otu” adlarına bilinmektedir (Sanchez-Mateo ve ark., 2006).

Dünyada en fazla antidepresan özelliği ile dikkat çeken bitkiler arasında *H. perforatum* yer almaktadır. Özellikle Birleşik Devletlerde *Hypericum* preparatları, depresyon tedavisinde en sık kullanılan antidepresanları oluşturmaktadır. Bu bitkinin ticari ekstraktlarının antidepresan ilaç olarak kullanımı ise oldukça yaygındır. Örneğin; Almanya’da kullanılan yıllık drog miktarının 600 ton olduğu belirtilmiştir (Plescher ve Fröbus, 1995). Bitkiden hazırlanan farklı formlardaki antidepresif farmakolojik ürünlerin yıllık satış değerinin Avrupa pazarlarında 100 milyon doları ABD’de ise 500 milyon doları aştığı; dünya genelinde ise 1 milyar dolara yaklaştığı belirtilmektedir. *Hypericum* türlerinin standart antidepresan ilaçların yerine ikame olarak depresyon tedavisinin maliyetini önemli ölçüde düşürdüğü belirtilmektedir (Solomon ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda sarı kantaron bitkisinin drogunda %0.1-0.3 oranında dianthron (hiperisin pseudohypericin ve hiperisine benzer maddeler), flavonoit, %3 hiperforin, %0.2-1 uçucu yağ ve tanenli maddeler içerdiği bulunmuştur. Sarı kantaron bitkisinin hem üretiminde hemde florasından alınan bu hammaddelerin belirli kalitedeki değerlere sahip olması istenmektedir (Wichtl, 1986; Berger ve ark., 1996; Bomme, 1997).

Amerika ve Almanya’da tıbbi bitkiler içerisinde büyük bir öneme sahip olan bu bitkinin ithalat ve ihracat konusunda katkı payı büyüktür (Grünwald, 1999). Ülkemizde de doğal florada yaygın olarak yetişen sarı kantaron hem kendi iç piyasamızda kullanılmakta hem de ihraç edilmektedir. Örneğin; Karadeniz Bölgesi’nde *H. perforatum* türü ve benzer diğer türleri doğadan toplanıp yurtiçi ve yurtdışı pazarlara satılmaktadır (Çırak ve ark., 2004). Aynı zamanda ülkemizde ithal edilmesine izin verilen ve içeriğinde sarı kantaron taşıyan hazır preparatlarda bulunmaktadır (Özçelikay ve ark., 1997).

Sarı kantaron bitkisinin içerdiği etken maddelerden en önemlisi hyperisindir. Hyperisinin drogdaki miktarı genotipine, hasatın zamanına ve biçim yüksekliğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Bomme, 1997; Braunewell, 1991; Dehe, 1993). Diğer yardımcı olan kimyasal bileşenler; hyperforin, hyperisin ve flavonoid grubundan hyperozid, isoquersitrin, rutin ve epikateşin yer almaktadır (Maisenbacher ve ark., 1992). Ayrıca kırmızı renkteki sıvı hiperisin ve içeriğindeki diğer etken maddeler sebebiyle bitki fazla tüketildiğinde tüysüz ve açık renkli cilt yüzeylerinde ışığa karşı duyarlılık meydana getirir. Hiperisinin neden olduğu bu duyarlılık özellikle küçükbaş hayvanlarda her yıl ciddi zehirlenmelere sebep olur bu yüzden *Hypericum* türleri halk arasında kuzu kıran olarakta adlandırılmıştır. Hiperisin maddesi sadece bu siyah bezeleri taşıyan türlerde bulunmaktadır (Uzun, 2009).

Dünya'daki sarı kantaron bitkisinin tarımsal özelliklerini belirleme çalışmaları yanında, ıslah araştırmaları da yapılmış olup özellikle Almanya, Polonya, Slovakya gibi ülkelerde birçok kantaron çeşidi geliştirilerek tescil ettirilmiştir (Pank ve Heine, 1998; Dachler ve Pelzmann, 1999).

Tarihi dönemlerden bu yana *H. perforatum*'un yara ve yanıkların iyileştirilmesi üzerindeki asıl etkisi birçok araştırmacının merak konusu olmuştur. Örneğin; Amerikalı eczacı Griffith 1847 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda *H. perforatum*'un yağının ülser ve kanser tedavisinde dahili ve harici olarak kullanılabileceğini aynı zamanda bitkinin diüretik etkili olduğunu saptamıştır (Griffith, 1847). Roma imparatoru Neron'un ordularında doktor olarak görev yapan ünlü hekim Dioskorides ise *H. perforatum* yağını siyatik ağrılar ve yanıkların tedavisinde, deoksiyonunu ise kadınlarda âdetin teşvik edilmesi ve adet sancıların azaltılması için önermiştir (Gunther, 1968). Ayrıca *H. perforatum*'un çiçekli kısımlarından elde edilen su karışımı ürogenital enflamasyon, diabetes mellitus, nöralji, kalp rahatsızlıkları, gastrit, hemoroid ve peptik ülser gibi pek çok rahatsızlıkları tedavi etmede kullanılmaktadır. Türkiye'deki geleneksel kullanımı daha çok yağ karışımı üzerinedir. Yağ karışımı ile ilgili kullanımının daha yaygın olduğunu belirten çalışmalar da yapılmıştır (Yeşilada, 1995). Türkiye'deki geleneksel kullanımı zeytinyağı içerisine bu bitkinin çiçeklerinin katılarak güneşte bekletilmesiyle elde edilen karışım yara iyileştirici olarak haricen uygulandığı belirtilmiştir (Mukherjee ve ark., 2000).

*H. perforatum*'un ayrıca; antitümör, antiviral, antibakteriyal, antiinflamatuvar analjezik ve hepatoprotektif gibi etkileri de bulunmaktadır (Colasanti ve ark., 2000; Çubuklu ve ark., 2002; Herakman, 1996; Reichling ve ark., 2001; Tang ve ark., 1990; Önder, 1995).

*H. perforatum* çiçekleri bitkinin uç kısımlarında demet halinde açmakta ve genellikle çiçeklerin açtığı dönemde veya hemen öncesinde toplanmaktadır. Toplanan bitkinin aktif bileşen yapılarının degradasyonunu önlemek için hızlı bir şekilde kurutma işlemi gerçekleştirilir. Bitkinin geleneksel olarak tedavide kullanılan kısmı kurutulan çiçekleri, yaprakları ve uç kısımlarından oluşmaktadır (Medina ve ark., 2006).

*H. perforatum*'un dışında *Hypericaceae* ailesinden olan farklı türlerde tedavi edici özelliği ile Avrupa'da da yara iyileştirici olarak kullanılmıştır. Örneğin; Hindistan'da *H. patulum* ve *H. hookerianum* yine bu amaçla kullanılan türler arasındadır. Mukherjee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda insizyonel ve eksizyonel metanol ekstresini hazırlayarak *H. hookerianum*'un yara iyileşmesi üzerine etkisi araştırmışlardır. Buna göre yara kontraksiyonunda, doku rejenerasyonunda ve epitelizasyon kapasitesinde artış gözlenip ve aynı etkiyi *H. patulum* üzerinde de çalışılarak aynı sonuca ulaşılmıştır (Mukherjee, 2000). Süntar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada geleneksel kullanımda yer almayan *H. scabrum*'un yara iyileşmesi üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir. *Hypericaceae* ailesinin yara iyileştirici etkisinin yalnızca belirli türlerine özgü olduğu bulunmuştur (Süntar ve ark., 2010).

### **2.1.3 *Hypericum scabrum* L. sistematigi**

**Divisio:** Spermatophyta

**Subdivisio:** Angiospermae

**Clasis:** Dicotyledoneae

**Subclasis:** Magnolipsida

**Ordo:** Theales

**Familya:** Cluciaceae (Hypericaceae, Guttiferae)

**Genus:** *Hypericum scabrum* (Mayasıl otu, Kepir otu) (Davis, 1988).

#### 2.1.4 *Hypericum scabrum* L. (Mayasıl otu, Kepir otu)

Çok yıllık, otsu bir bitkidir. Çiçekleri oldukça gösterişli ve sarı renktedir. Ayrıca kırmızı renkte bezler içerir. Boyu 40-50 cm kadar olup daha çok kayalık tepelerde, orman açıklıklarında, steplerde yetişmekte olup Mayıs-Ağustos aylarında çiçek açmaktadır.



**Resim 2:** *H. scabrum* bitkisinin görüntüsü (Peşin, 2007).

*H. scabrum* ile yapılan çalışmalarda çiçekli kısmından hazırlanan % 1' lik infüzyon Kayseri ve Yozgat bölgesinde basura karşı ve kabızlığı giderici olarak kullanılmıştır (Baytop, 1999; Sezik, 2001). Özbekistan'da da geleneksel olarak kullanılan bu tıbbi bitki mesane, bağırsak ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde, romatizma ve sistite karşı kullanılmıştır (Tanaka, 2004).

#### 2.2 Uçucu Yağların Genel Özellikleri

Aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan çoğunlukla su veya buhar distilasyonu yöntemleri ile elde edilen, kendilerine has koku, tat, renk ve görünüme sahip çok sayıda bileşenden oluşan karışımlara uçucu yağ denilmektedir. Oda ısısında sıvı halde bulunurken hava ile temas halinde kolaylıkla buharlaşabilmektedirler. Uçucu yağların çoğu sudan hafif olduklarından dolayı su ile karışmaz ve suyun üzerinde toplanmaktadır. Buna karşın bileşimindeki oksijenli bileşimlerin bir kısmı suda çözünme özelliğine sahiptir. Bu özelliklerine sayesinde aromatik su karışımları hazırlanabilmektedir (Sevinç ve ark., 1995).

Uçucu yağlar bitkilerin öncelikli olarak çiçek ve yaprakları olmak üzere kabuk, kök, odun, meyve ve tohum gibi birçok organında da bulunabilmektedirler. Bazen bitkinin



tüm dokularında, bazen ise sadece özel organ ve dokularında oluşmaktadırlar. Uçucu yağlar bitkinin bağlı olduğu familyaya göre belirli oranlarda salgı tüylerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve salgı ceplerinde bulunmaktadırlar (İşcan, 2002).

Yaklaşık olarak 1500 civarında esansiyel yağ günümüzde bilinmekte ve bunların da yaklaşık 300 tanesinin farklı endüstriler için ticari önemi olduğu belirtilmektedir (Jayasena, 2013). Uçucu yağların bakteri ve küf gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermesi yanında aromatik koku özellikleri sebebiyle gıdaların korunmasında ve sakınleştirici, ağrı kesici, antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı tıpta da kullanılmaktadırlar (Bakkali ve ark., 2008). FDA (Food and Drug Administration) tarafından kolay ayrıştırılabilir, çevre dostu olmaları ve sitotoksik olmamaları sebebiyle çoğunluğu GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsünde yer alan esansiyel yağlara karşı son yıllarda artan bir talep vardır (Cabral ve ark., 2013; Holley ve ark., 2005).

Uçucu yağlar bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmadıkları için bu maddelerin bitkide hangi sebeple oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları ve aynı zamanda yaralanmalara karşı meydana gelen reçineyi çözebilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Yapılan bir dizi araştırmanın sonucu olarak yaydıkları yoğun kokuları sayesinde böceklerin ilgisini çekerek tozlaşmaya yardımcı olduğu ya da bu olayın tam tersi bir etki ile zararlı böcekleri bitkiden uzaklaştırarak bitkiyi korumada yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca uçucu yağ içeren bitkilerin çoğunlukla sıcak iklimlerde yetişmesinden dolayı uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlayarak su kaybını en aza indirdiği düşünülmektedir (Ewans, 1996).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi içeriğindeki etken maddelerdedir. Tıbbi bitki içerisindeki etken madde miktarı ve bileşenleri hasat zamanına, hasat şekline, hasat sonrasında uygulanan kurutma işlemine, temizleme ve muhafaza işlemlerine bağlıdır (Özhatay ve ark., 1997; Özgüven ve ark., 2005).

Türkiye’de net istatistiki rakamlar olmamakla birlikte, binin üzerinde tür tıbbi ve aromatik bitki olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde tıbbi olarak kullanılan bitkilerin 500 civarında bir sayıda olduğu bunun 350 kadar bir kısmının iç pazarda değerlendirildiği ve ihracat amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (İpek, 2007).

## **2.3 Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri**

Uçucu yağ eldesinde kullanılan 3 temel yöntem vardır. Bunlar; destilasyon, ekstraksiyon ve soğukta sıkma yöntemleridir (Kılıç, 2008).

### **2.3.1 Destilasyon Yöntemi**

Destilasyon, sıvıların kaynama noktalarındaki farklılıklardan yararlanılarak gerçekleştirilen bir ayırma işlemidir. Bu yöntem ile elde edilen uçucu yağlar yüksek oranda kaynama noktası düşük bileşikler, az miktarda da kaynama noktası yüksek ve suda çözünen bileşikler içermektedir. Destilasyon yöntemleri, su destilasyonu, buhar destilasyonu ve vakum destilasyonu olmak üzere 3'e ayrılmaktadır (Kılıç, 2008).

#### **2.3.1.1 Su Destilasyonu (Hydrodistillation - HD)**

Uçucu bileşiklerin eldesinde geleneksel bir yöntem olan ve küçük ölçekli üretimlerde Clevenger tipi bir aparat yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda ise büyük destilasyon kazanlarında gerçekleştirilmektedir. Yöntemin esası; soğutucu ile temas ettirilen bir cam balon içerisinde su ve bitki materyali karışımının 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılması işlemi yapılmaktadır. Elde edilen uçucu yağ miktarı volumetrik olarak ifade edilmektedir (Linskens ve ark., 1997b).

#### **2.3.1.2 Buhar Destilasyonu (Steam Distillation)**

Buhar destilasyonu yönteminde cam balon içerisine yerleştirilen taze bitki materyaline uygulanan basınçlı buhar, yağ damlacıklarını beraberinde sürükleyerek toplama kabına getirildikten sonra, yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmaktadır (Linskens ve Jackson, 1997b).

#### **2.3.1.3 Vakum Destilasyonu (Vacuum Distillation-VD)**

Kaynama noktaları yüksek olan bileşikleri elde etmek için sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürmek daha etkili bir yöntemdir. Basınç bileşiğin buhar basıncının altına indirilirse, kaynama ve destilasyon işlemi başlamaktadır (Kılıç, 2008).

### **2.3.2 Ekstraksiyon Yöntemi**

Bir başka ayırıştırma yöntemi de ekstraksiyondur. Ekstraksiyon işlemi geleneksel ve yeni metotlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sokselet ekstraksiyonu ve maserasyon işlem süresi oldukça uzun olan geleneksel bir yöntemdir. Çevreyi büyük oranda kirleten çözücü kimyasallar kullanılmaktadır. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve mikrodalga ekstraksiyonu

ise son zamanlarda uygulanmaya başlanan işlem süresi kısa, etkili ve güncel yöntemler arasındadır (Moyle, 1993).

### **2.3.2.1 Çözücü Ekstraksiyonu (Solvent Extraction)**

Geleneksel ekstraksiyon yöntemi olup bitki materyali, direkt olarak oda sıcaklığında çözücünün içerisine daldırılabilmesi gibi bir sokselet cihazı içerisinde organik bir çözücü ile de kaynatılabilmektedir. Ekstraksiyon sonunda, organik çözücü destilasyon ile ortamdan uzaklaştırılarak geri kazanılmaktadır. Kalan yağsı kısım içerisinde ise uçucu bileşikler bulunmaktadır (Linskens ve Jackson, 1997b).

### **2.3.2.2 Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction-SFE)**

Doğal ürünlerin organik çözücülerle elde edilmesi hem çevresel hem de sağlık açısından son yıllarda pek kabul görmeyen bir olgu haline gelmiştir. Bu olumsuzluklar sonucunda daha az çözücü harcayan, ekstraksiyon süresi daha kısa olan ve normal koşullarda yüksek sıcaklıkta çözünen bileşikleri ayrıştırma özelliği ile süperkritik sıvı ekstraksiyonu daha çok ilgi çekmektedir (Yamani ve ark., 2007).

### **2.3.2.3 Mikrodalgayla Ekstraksiyonu (Microwave-assisted Extraction)**

Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyonda iki farklı sistem uygulanabilmektedir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol halinde tutulan kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir (Beejmohun ve ark., 2007).

### **2.3.3 Soğukta Sıkma (Mekanik Yöntem)**

Bazı turunçgillerin kabuğundaki petallerde bulunan uçucu bileşikler destilasyon yöntemi uygulandığında ısının etkisiyle içeriğindeki bileşiklerin yapısı bozulmaktadır. Bu gibi meyvelerin kabukları bez bir torbaya konularak soğuk hidrolik preslerde sıkılarak uçucu yağları elde edilebilmektedir (Ceylan, 1983).

## **2.4 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özellikleri**

Uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili birçok bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından, etki dereceleri içerdikleri aktif maddelerin çeşit ve miktarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda etki mekanizmalarının yağların lipofilik özellikleri ve kimyasal yapılarıyla ilgili olduğu gözlenmektedir. (Farag ve ark.,1989).

Araştırmacılara göre, doğal bileşikler hücrelerde doğrudan ya da dolaylı olarak hücrelerin biyokimyasal süreçlerini etkilemekte, fizikokimyasal bütünlüğünü bozmaktadır. Özellikle hidrofobik yapıda olan terpenler, hücre duvarı ile etkileşime girerek hücre duvar bütünlüğünü bozar. Terpenlerin hidrofobik özelliği; hücre duvarındaki lipitler ile bir araya gelerek zarın geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır (Sikkema ve ark., 1995).

Esansiyel yağlar Gram (-) ve Gram (+) bakteriler dahil birçok mikroorganizma üzerine antibakteriyel aktivite göstermektedir. Örneğin esansiyel yağ bileşenlerinden Karvakrol ve timol, bakteri membranını parçalayarak membranla ilgili materyallerin hücre dışına çıkmasını sağlarken, terpenoidler ve fenilpropanoidlerin ise lipofilik özellikleri sayesinde bakteri duvarını geçerek hücrenin daha iç kısımlarına ulaştıkları bildirilmiştir (Halendar, 1998).

Uçucu yağların antimikrobiyal özellikleri, yağın konsantrasyonuna, bileşenlerine, bileşenlerinin yapısal özelliklerine, konfigürasyonlarına, yan gruplarına ve bu bileşenlerin birbirleriyle olan etkileşimine bağlı olarak değişmektedir. Fenolik bileşikler olarak bilinen karvakrol, eugenol ve timol bileşenlerinin antimikrobiyal aktivite açısından daha etkilidir. Bu sınıfın üyelerinin hem bakteriyosidal hem de bakteriyostatik ajanlar olduğu belirtilmektedir. (Dorman ve Deans, 2000).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1 Çalışmada Kullanılan Aletler ve Cihazlar**

Çalışmamızda aşağıda belirtilen alet ve cihazlar kullanılmıştır.

1. Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (ESCO Class II BSC)
2. Hassas terazi (RADWAG Wagi Electroniczne AS 220.R2)
3. Otoklav
4. Etüv (Nüve EN500)
5. Santifürüj
6. Vorteks (Benchmark)
7. Isıtmalı manyetik karıştırıcı
8. Clevenger tipi distilasyon düzeneği ( İldam)
9. McFarland Cihazı
10. Otomatik mikropipetler (10-100µl, 100-1000µl)
11. Derin dondurucu (-20°C)
12. Mikroskop (Olympus)

#### **3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler**

1. Kanlı agar (Oxoid)
2. MHB (Mueller-Hinton Broth) (Merck)
3. MHA (Mueller-Hinton Agar) ( Merck)
4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Neogen)
5. Saboraud Dextrose Broth (BHI) (Oxoid)
6. Dimetil sulfoksit (DMSO) (Merck)
7. TWEEN-80 (Merck)
8. Streptomycin (Oxoid)
9. Gentamycin (Oxoid)
10. Nystatin (Oxoid)
11. Alkol (% 96'lık)
12. Gram boyama seti
13. TTC (Merck)

### 3.3 Bitki Örneklerinin Toplanması ve Tiplendirilmesi

Araştırmada kullanılan *H. perforatum* ve *H. scabrum* örnekleri 2017 yılının Haziran ayında bitkilerin çiçeklenme dönemlerinde toplandı. Tür teşhisi Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyelerinden Dr. Öğretim Üyesi Erol DÖNMEZ tarafından yapıldı. Tür teşhisi yapılan bitki örnekleri Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Herbaryumunda (CUFH-Voucher No: ED 9912) saklanmaktadır. Toplanan bitki örnekleri gölge bir alanda oda koşullarında, güneş ışığına maruz bırakılmaksızın kurutuldu. Bitkilerin alındığı lokaliteler ve dönemler aşağıda belirtilmiştir.

1. *Hypericum perforatum* L. B6 Sivas: Merkez Bölge Trafik Civarı, 1400 m, E. DÖNMEZ(18031) & (M.SUSAMIŞ), 28.06.2017
2. *Hypericum scabrum* L. B6 Sivas: Merkez Kardeşler Tepesi, 1500 m, E. DÖNMEZ(18032) & (M. SUSAMIŞ), 28.06.2017

#### 3.3.1 Bitki Örneklerinden Uçucu Yağ Elde Edilmesi

Sivas ilinde iki farklı lokaliteden bitkilerin çiçeklenme döneminde toplanan *H. perforatum* ve *H. scabrum*'un toprak üstü organlarından uçucu yağları elde edildi Bitki örneklerinden uçucu yağın elde edilmesi işleminde Clevenger cihazı kullanıldı. Bu amaçla uçucu yağların eldesi için 50 gr bitki örneği hassas terazide tartılarak balon joje içerisine aktarıldı. Bitki materyali su ile birlikte distilasyon kabı içerisine konuldu. Suyun kaynatılmasıyla oluşan buhar, soğutucu yüzeyde yoğunlaştırılması sağlandı. Su üzerinde toplanan uçucu yağ mikropipet yardımı ile alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarıldı. Uçucu yağı elde edilen bitkiler, deneyde kullanılmak üzere buzdolabında (+4°C'de) muhafaza edildi.

#### 3.3.2 Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizi

*H. perforatum* ve *H. scabrum* bitkilerinin uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi (GC/MS) analizi ve HPLC analizi ile Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsünde Uzm Dr. Nilüfer VURAL tarafından rapor edildi (BITAUM, 06100 Ankara, Turkey, 10-15 Kasım 2017).

GC / MS analizleri, CP-3800 gaz kromatografi cihazında yapılmıştır. DB-5 kapiller sütun (30 m x 0.25 mm; kaplama kalınlığı 0.25 um) ile donatılmış varian ve varian saturn 2000 iyon kütle detektörü ile yapılmıştır. Analiz şu şekilde sıralanarak uygulanmıştır; sırasıyla enjektör ve transfer hattı sıcaklıkları 220 - 240 °C arasında ve fırın sıcaklığı da 60 °C - 240 °C arasında programlanmıştır ve her 3 °C'de, 1 ml taşıyıcı helyum gazı, 0.2 µl

enjeksiyon (%10 hexane çözeltisi), ayrılma oranı (1:30) ile uygulanmıştır. Bilinen yağların ve MS literatür verilerinin saf maddelerinden ve bileşenlerinden elde edilen bileşenlerin tanımlanması, tutma sürelerinin gerçek örneklerle karşılaştırılmasına, n-hidrokarbon serisine göre doğrusal tutma endekslerinin karşılaştırılmasına ve ticari ve ev yapımı kütle spektrumları ile karşılaştırılması işlemleri bilgisayar eşleşmesi ile yapılmıştır. Ayrıca, tanımlanmış tüm maddelerin moleküler ağırlıkları, CI-iyonlaştırıcı olarak MeOH kullanılarak GC / CIMS ile doğrulanmıştır (Adams, 1995; Davies, 1990; Jennings ve ark., 1980; Massada, 1976; Stenhagen ve ark., 1974; Swigar and Silverstein, 1981).

### **3.4 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması**

#### **3.4.1 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar**

*H. perforatum* ve *H. scabrum* bitkilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasında aşağıda isimleri ve numaraları belirtilen mikroorganizmalar kullanıldı.

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883)
- *Bacillus cereus* (ATCC 11778)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Candida tropicalis* (DSM 11953).

#### **3.4.2 Besiyerlerinin Hazırlanması**

##### **3.4.2.1 Mueller- Hinton Agarın Hazırlanması**

Toz haldeki Mueller Hinton Agar'dan hassas terazide 19 gram tartıldı ve 1000 ml hacimli otoklav şişesine aktarıldı. Üzerine 500 ml distile su eklendi. Agarın daha hızlı çözünmesi için manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri 50-55°C'ye kadar soğuması beklendi ve 90 cm çaplı Petri plaklarına bek alevi yanında 20'şer ml aktarıldı. Besiyerleri oda ısısında bir gece bekletildikten sonra çalışmada kullanıldı.

##### **3.4.2.2 Mueller-Hinton Broth Besiyerinin Hazırlanması**

Toz haldeki Müller Hinton Broth'tan hassas terazide 10 gram tartıldı ve 1000 ml hacimli otoklav şişesine aktarıldı. Üzerine 500 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile

iyice çözdürüldü. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildi. Besiyerinin soğuması beklendi ve çalışma yapılincaya kadar buzdolabında saklandı.

#### **3.4.2.3 Saboraut-Dextroz Agarın Hazırlanması**

Toz haldeki Saboraut-Dextroz Agar'dan hassas terazide 32 gram tartıldı ve 1000 ml hacimli otoklav şişesine aktarıldı. Üzerine 500 ml distile su eklendi. Agarın daha hızlı çözünmesi için manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri 50-55°C'ye kadar soğuması beklendi. 90 cm çaplı Petri plaklarına bek alevi yanında 20'şer ml aktarıldı. Besiyerleri oda ısısında bir gece bekletildikten sonra çalışmada kullanıldı.

#### **3.4.2.4 Kanlı Agar Besiyerinin Hazırlanması**

Toz haldeki Blood Agar'dan hassas terazide 20 gram tartıldı ve 1000 ml hacimli otoklav şişesine aktarıldı. Üzerine 500 ml distile su eklendi. Agarın daha hızlı çözünmesi için manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edilen besiyerinin 50-55°C'ye kadar soğuması beklendi. 90 cm çaplı Petri plaklarına bek alevi yanında 20'şer ml aktarıldı. Besiyerleri oda ısısında bir gece bekletildikten sonra çalışmada kullanıldı.

#### **3.4.2.5 Saboraut-Dextroz Broth Besiyerinin Hazırlanması**

Toz haldeki Saboraut-Dextroz Broth'dan hassas terazide 32 gram tartıldı ve 1000 ml hacimli otoklav şişesine aktarıldı. Üzerine 500 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dakika sterilize edildi. Besiyerinin soğuması beklendi ve çalışma yapılincaya kadar buzdolabında saklandı.





**Resim 3:** Besiyerlerinin hazırlanması

### **3.4.3 Bakteri ve Mantar Suşlarının Canlandırılması**

Giserollü Buyyon (% 16) içerisinde -20 °C derin dondurucuda saklanan bakteri ve mantar suşları derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısında çözünmeleri sağlandı. Bakteri ve mantar suşları bek alevi yanında öze yardımıyla alınarak kanlı agar besiyerine aktarıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri ve mantar suşlarının kanlı besiyerinde üredikleri gözlemlendi.

### **3.5 Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması**

*H. perforatum* ve *H. scabrum* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesinin tayininde Disk Difüzyon (Kirby- Bauer) ve Mikrodilüsyon Broth yöntemleri kullanıldı.

#### **3.5.1 Disk Difüzyon (Kirby-Bauer ) Yöntemi**

*H. perforatum* ve *H. scabrum* uçucu yağlarından 100 mg/ml’lik (%50’lik DMSO + %0,5 Tween80) stok çözelti hazırlandı. Stok çözültiden steril distile su yardımıyla 50 mg/ml, 25 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml’lik çalışma çözülteleri hazırlandı. Stok çözelti ve çalışma çözültelerinden otomatik pipet ile 10 µl alınarak steril 6 mm’lik boş disklere (Oxoid, Basingstoke, UK) emdirildi.

Kanlı agar besiyerinde üremiş olan bakteri ve mantar suşları içerisinde 2 ml serum fizyolojik bulunan steril cam tüplere öze ile alınarak McFarland 0.5 bulanıklığında mikroorganizma süspansiyonu hazırlandı. Mueller- Hinton Agar (Merck) ve Sabouraud

Dextrose Agar (Neogen) yüzeyine, 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri ve maya solusyonlarından steril eküvyon çubuk yardımıyla ekimi yapıldı. Besiyeri yüzeylerinin kuruması için 15 dakika beklendikten sonra uçucu yağ emdirilen diskler, agar yüzeyine aralarında 1-1,5 mm kalacak şekilde yerleştirildi. Yağların besiyerine daha iyi difüze olabilmesi için 30 dakika beklenildi.

Çalışmada pozitif kontrol amacıyla Streptomycin, Gentamycin, Nystatin standart antibiyotik diskleri (10µl), negatif kontrol amacıyla steril fizyolojik su ve DMSO emdirilmiş diskler kullanıldı. Petri plakları  $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları ölçüldü (CLSI, 2012).

### **3.5.2 Mikrodilüsyon Broth Yöntemi**

Deney için U tabanlı 96' lık mikrotitre plakları kullanılmıştır. *H. perforatum* ve *H. scabrum* uçucu yağları 2 ml hacimli steril ependorf tüp içerisinde 100 mg/ml olacak şekilde DMSO ve % 0.5 Tween 80 yardımı ile çözdürüldü. Kuyucukların ilk sırasına 90 µl, diğer kuyucuklara ise 50 µl besiyeri eklendi. Bakteriler için MHB, mayalar için SDB kullanıldı. Mikrotitre plaklarının ilk sırasına 10 µl esansiyel yağ (100 mg/ml) eklendi. Mikropipet yardımı ile pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. İlk sıradan alınan 50 µl karışım ikinci sıra üzerine aktararak iki katlı seri sulandırım yapıldı. Diğer kuyucuklarda da aynı işlem tekrar edildi. Plağın 10. sırasından alınan 50 µl karışım dışarı atıldı.

McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmış bakteri ve maya süspansiyonu bakteriler için  $5 \times 10^5$  CFU/mL, mayalar için  $0.5-2.5 \times 10^3$  CFU/mL olacak şekilde sulandırıldı ve kuyucuklar üzerine 50 µl olacak şekilde eklendi (CLSI, 2012). Kuyucuklar içerisindeki yağ konsantrasyonu 5 ile 0.009 mg/mL arasında değişmekteydi. On birinci sıradaki kuyucuklar üzerine 50 µl besiyeri eklenerek sterilite kontrolü olarak, 12. sıradaki kuyucuklar üzerine ise 50 µl bakteri veya maya karışımı eklenerek üreme kontrol olarak kullanıldı. Mikrotitre plaklarının kapakları kapatılarak  $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görünür hale gelmesi için her kuyucuğa 50 µl (2 mg/ml) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC-108380) (Merck, Germany) eklendi ve plaklar  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklar içerisindeki canlı mikroorganizmaların varlığına bağlı olarak oluşan Formazan'ın rengindeki azalmanın gözlemlendiği ilk kuyucuk MIC olarak kabul edildi. Test iki kez tekrarlandı ve aynı sonuçlara ulaşıldı.

MIC sonuçları referans kaynaklara göre; Etkili ( $MIC < 100 \mu\text{g/ mL}$ ), Orta ( $100 < MIC \leq 625 \mu\text{g/mL}$ ), Zayıf ( $MIC > 625 \mu\text{g/ mL}$ ) şeklinde değerlendirilmiştir (Kuefe, 2013; Awouafack, 2013).





**Çizelge 2:** *H. scabrum* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşenleri

RI	Compound	%
940	$\alpha$ -Pinene	45.34
960	Thuja-2,4(10)-diene	1.15
980	$\beta$ -Pinene	2.76
1126	$\alpha$ -Campholenal	1.87
1136	trans-Pinocarveol	2.27
1145	trans-Verbenol	2.41
1160	Pinocarpone	0.96
1180	p-Cymen-8-ol	0.92
1190	$\alpha$ -Terpineol	0.95
1194	Myrtenol	1.75
1205	Verbenone	3.37
1215	trans-Carveol	1.83
1220	Unidentified	1.30
1275	cis-Tetrahydrojasmone	1.20
1285	cis-Verbenyl acetate	0.55
1290	Thymol	4.57
1292	$\alpha$ -Campholenic acid	1.18

RI	Compound	%
1310	Carvacrol	1.63
1380	trans-Soberol	1.62
1440	$\alpha$ -Guaiene	1.14
1476	$\gamma$ -Muuroolene	2.53
1485	$\beta$ -Selinene	0.75
1490	Germacrene D	2.45
1502	$\alpha$ -Muuroolene	0.55
1510	$\gamma$ -Cadinene	1.15
1522	trans-Calamenene	0.93
1550	Unidentified	0.82
1570	(3Z)-Hexenyl benzoate	0.97
1577	Spathulenol	3.75
1581	Caryophyllene oxide	2.10
1610	Unidentified	1.33
1645	epi- $\alpha$ -Muurolol	0.48
1654	$\alpha$ -Cadinol	0.65
	<b>Total Identified %</b>	<b>97.23</b>

*H. perforatum* bitkisinin uçucu yağından elde edilen GC/MS sonuçlarına göre 70 adet bileşen bulunmuştur. Majör bileşen olarak Germacrene D ( % 8.71), Caryophyllene oxide (%8.44),  $\alpha$ -Pinene(%6.35) ve az bileşen olarakta  $\beta$ -Copaene (%0.22) bulunmuştur.

*H. scabrum* bitkisinin uçucu yağından elde edilen GC/MS sonuçlarına göre ise 33 adet bileşen bulunmuştur. Majör bileşen olarak  $\alpha$ -Pinene (%45.34), Thymol (%4.57), Spathulenol (%3.75) ,ve az bileşen olarakta epi-Muurolol (%0.48) bulunmuştur.

#### 4.2 Disk Difüzyon (Kirby-Bauer ) Yöntemi Bulguları

Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Yöntemi ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışması sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan Streptomisin, Gentamisin ve Nystatin diskleri etrafında farklı büyüklüklerde inhibisyon zonları gözlemlendi. *H. perforatum* uçucu yağı emdirilmiş diskler etrafında inhibisyon zonu oluştuğu, bu nedenle de *H. perforatum* uçucu yağının deneyde kullanılan mikroorganizmalar üzerine farklı oranlarda antimikrobiyal etkisinin olduğu saptanmıştır (Çizelge 3)

*H. perforatum* uçucu yağının incelenen konsantrasyonlarda *E.faecalis* ve *C.albicans* üzerine etkisiz olduğu saptanırken, 100 mg/ml'lik konsantrasyonda en büyük zon çapı sırasıyla *S. aureus* (22 mm), *E.coli*'de (18 mm) ve *P. aeruginosa*'da (16 mm) olduğu gözlemlenmiştir.

*E.coli* ve *K. pnemonie*'de 100mg/ml'lik konsantrasyonda antimikrobiyal aktivite gözlenirken, diğer konsantrasyonlarda zon çapı oluşmadığı buna bağlı olarak antimikrobiyal aktivitenin olmadığı gözlenmiştir.

**Çizelge 3:** *H. perforatum* yağının disk difüzyon sonuçları (mm)

Mikroorganizma	Konsantrasyonlar (mg/ml)					Streptomisin 10 µg	Gentamysin 10 µg	DMSO
	100	50	25	10	5			
<i>E. coli</i>	18	-	-	-	-	15	17	-
<i>P.aeruginosa</i>	16	15	14	-	-	14	23	-
<i>K. pneumoniae</i>	10	-	-	-	-	24	16	-
<i>S. aureus</i>	22	14	8	-	-	20	28	-
<i>B. cereus</i>	12	10	8	-	-	8	24	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	13	-
Mikroorganizma	100	50	25	10	5	Nystatin (10 µg)		DMSO
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	15		-
<i>C. tropicalis</i>	24	12	-	-	-	14		-



**Resim 4:** *H. perforatum*'un *B. cereus* ve *S.aureus* bakterilerine karşı etkisi

Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Yöntemi ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışması sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan Streptomisin, Gentamisin ve Nystatin diskleri etrafında farklı büyüklüklerde inhibisyon zonları gözlenmiştir. *H. scabrum* uçucu yağı emdirilmiş diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmadığı, bu nedenle de *H. scabrum* uçucu yağının deneyde kullanılan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin olmadığı saptanmıştır. İnhibisyon zon çapları ölçülmüş ve sonuçlar (Çizelge 4) da mm cinsinden aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4:** *H. scabrum* uçucu yağının disk difüzyon sonuçları (mm)

Mikroorganizma	Konsantrasyonlar (mg/ml)					Streptomisin 10 µg	Gentamysin 10 µg	DMSO
	100	50	25	10	5			
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	16	18	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	14	21	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	23	14	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	19	26	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	8	24	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	9	-
Mikroorganizma	100	50	25	10	5	Nystatin (10 µg)		DMSO
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	16		-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	14		-

### 4.3 Mikrodilüsyon Broth Yöntemi Bulguları

*H. perforatum* ve *H. scabrum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağlarının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIC) saptanmasında mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılmıştır.

*H. perforatum* uçucu yağının en düşük MIC değeri bakterilerde *S. aureus* 0.156 mg/ml, mantarlarda ise benzer şekilde *C. tropicalis* 'te 0.156 mg/ml olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre *H. perforatum* uçucu yağının, *H. scabrum* uçucu yağına göre daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

*H. scabrum* uçucu yağının en düşük MIC değeri bakteriler için *E. faecalis*'te 2,5 mg/ml , mantarlar için ise *C.tropicalis*'te 0.312 mg/ml olarak bulunmuştur. Mikrodilüsyon

Broth çalışmasında kuyucuklardaki uçucu yağ konsantrasyonu 5-0.009 mg/ml arasında değişmekteydi. *H. scabrum* uçucu yağının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'ye karşı MIC değerinin saptanmasında tüm kuyucuklardan üreme gözlendiğinden MIC değeri >5mg/ml olarak değerlendirilmiştir. *H. scabrum* uçucu yağının MIC değeri; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*'de ( >5 mg/ml), *S.aureus*, *B. cereus*'ta (5 mg/ml), *E. facealis* (2,5mg/ml), *C. albicans* (0,625mg/ml) ve *C. tropicalis* (0,312mg/ml) olacak şekilde bulunmuştur.

Mikrodilüsyon Broth yönteminde mikroorganizmalar üzerinde farklı oranlarda MIC değeri saptanmıştır. *H. perforatum* ve *H. scabrum* uçucu yağının MIC değerlerine ilişkin bulgular izelge 5'te görülmektedir.

**Çizelge 5:** *H. perforatum* ve *H. scabrum* uçucu yağlarının MIC sonuçları (mg/ml)

Sıra No	Mikroorganizma	<i>H. perforatum</i>	<i>H. scabrum</i>
1	<i>E. coli</i>	5	>5
2	<i>P. aeruginosa</i>	2,5	>5
3	<i>K. pneumoniae</i>	2,5	>5
4	<i>S.aureus</i>	0,156	5
5	<i>B. cereus</i>	0,625	5
6	<i>E. facealis</i>	0,625	2,5
7	<i>C. albicans</i>	0,312	0,625
8	<i>C. tropicalis</i>	0,156	0,312



## 5. TARTIŞMA

Antibiyotiklerin klinik olarak gelişi güzel ve çok sık kullanımlarına bağlı olarak bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç oluşturması önemli ve güncel bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde tedavide kullanılmakta olan birçok antibiyotik etkisiz kalmış ve bakteriler etki spektrumları içinde buldukları antibiyotiklerden etkilenmez hale gelmişlerdir. Bu nedenlerden dolayıdır ki insanlar çeşitli bakteriyel ve fungal hastalıkların tedavisinde farklı arayışlar içerisine girmişlerdir (Cifci ve ark., 2015).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, çok uzun yıllardan beri geleneksel halk tedavisinde çeşitli nedenlerden dolayı geniş bir kullanım imkanı bulunan (Gadzovska-Simic ve ark., 2012). *Hypericaceae* familyasına ait olan *H. perforatum* ve *H. scabrum* bitkilerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Benzer çalışmalar farklı rakım ve bölgelerden toplanan aynı bitki üzerinde yapılmış ancak diğer araştırmacılar tarafından toplanan bitkilerin içerisinde bulunan uçucu yağların farklı miktar özelliklerinden dolayı, değişik sonuçlar bulunmuştur. Birçok araştırmacının yapmış olduğu çalışmalarda *H. perforatum*'dan elde edilen uçucu yağların majör bileşenlerinin Germacrene D, Caryophyllene oxide ve  $\alpha$ -Pinene'den oluştuğu görülmektedir (Chauhan ve ark., 2011; Sharopov ve ark., 2010; Sevim ve ark., 2010; Maggi ve ark., 2010; Chatzopoulou ve ark.,, 2009).

Bizim çalışmalarımızda, *H. perforatum*'dan Germacrene D %8.71 oranında elde edilirken, Tacikistan'dan toplanan aynı bitkiden Sharopov ve arkadaşları Germacrene D'yi %13.70 oranında elde etmişlerdir (Sharopov ve ark., 2010). *H. perforatum*'la yapılan çalışmaların pek çoğunda da majör dominant uçucu yağ olarak germacrene D bulunmuştur (Sitarek ve ark., 2017; Joshi, 2016; Đorđević ve ark., 2015). Germacrene-D, sesquiterpenoid germacran sınıfına ait organik bir bileşiktir ve aynı zamanda pek çok çalışmada Germacrene D'nin iyi bir antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. (Sahin ve ark., 2004; Olajuyigbe ve ark., 2014).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, *H. perforatum* uçucu yağının Gram (+) bir bakteri olan *S. aureus* üzerinde iyi bir antimikrobiyal etkiye sahip olurken, Gram (-) bakteriler üzerinde etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Aynı şekilde mantarlar üzerinde

de etkileri farklı şekilde elde edilmiştir. Örneğin *C. albicans* üzerinde bir etkisi bulunmazken, *C. tropicalis* üzerinde antifungal aktivitesinin iyi olduğu görülmektedir. Değişik ülkelerde yapılmış pek çok araştırma sonuçları da bizim verilerimizi doğrulamaktadır. Birçok araştırmacının farklı ülkelerin farklı coğrafik bölgelerinden toplamış oldukları *H. perforatum*'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi üzerinde yapılan değerlendirmelerde, uçucu yağın Gram (+) bakteriler üzerindeki etkisinin Gram(-) bakterilerden daha iyi olduğu tesbit edilmiştir ve aynı zamanda bir çok araştırmacının ortak tesbiti de genelde uçucu yağların Gram (-) bakterilere göre Gram (+) bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisinin daha olumlu belirtilmektedir (Canillac ve ark., 2001; Cimanga ve ark., 2002; Demetzos ve ark., 2001; Harpaz ve ark., 2003; Juliano ve ark., 2000; Lambert ve ark., 2001; Marino ve ark., 2001; Males ve ark., 2006; Pintore ve ark., 2002; Ruberto ve ark., 2000; Senatore ve ark., 2000; Okoh ve ark., 2009).

Antifungal aktivitesi üzerinde yapılan çalışmalarda *C. albicans* üzerine etkisi incelenmiş ve hiçbir antifungal etkisine rastlanılmamıştır. Aynı şekilde benzer bir araştırma yapan Reichling ve arkadaşları *H. perforatum*'un esansiyel yağının, *C. albicans* üzerine antifungal özelliğinin çok zayıf olduğunu belirtmişlerdir (Reichling ve ark., 2001). Çalışmamızda *H. perforatum* esansiyel yağının *C. tropicalis*'e karşı güçlü bir antifungal etki gösterdiği tesbit edilmiştir. Bertoli ve arkadaşları tarafından aynı şekilde yapılan başka bir çalışmada *Hypericum* türlerinin *C. tropicalis*'e karşı güçlü bir antifungal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Bertoli ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2010; Singh Pal, 2006; Kalaba ve ark., 2015).

Uçucu yağ bileşenleri açısından bizim verilerimiz, önceki çalışmaların bulgularını doğrulamıştır; *H. perforatum*'un ana bileşenleri olan Germacrene-D'nin ve Caryophyllene'nin diğer bazı bitkisel çalışmalarda da, önemli antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Kalodera ve ark., 1997; Kazarinova ve ark., 2002; Simic ve ark., 2002).

*H. scabrum*'dan elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi üzerinde farklı yörelerde pek çok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların hemen hemen tamamında uçucu yağ bileşenleri rakım, nem, yağış, ısı gibi farklı iklim özelliklerinden elde edildiği için çok küçük farklarla birbirlerine benzemektedirler. Bizim elde etmiş olduğumuz bitki örnekleri 1500 rakımlı bir bölgeden toplanmıştır. Majör dominant uçucu yağ olarak  $\alpha$ -Pinene

(%45.34) bulunmuştur. Bunu sırası ile Thymol (%4.57) ve Spathulenol (%3.75) izlemektedir.

Bir çok ülkede yapılmış olan çalışmalarda *H. scabrum*'un uçucu yağ ana bileşeninin  $\alpha$ -Pinene (12.52–49.96%) olduğu görülmüştür. Javidnia ve arkadaşlarının İran'da yapılmış oldukları bir çalışmada, *H. scabrum*'un uçucu yağındaki ana bileşen olan  $\alpha$ -Pinene'nin miktarını  $50.0 \pm 7.6$  olarak bulmuşlar (Javidnia ve ark., 2008). Aynı şekilde Sharopov ve arkadaşları da  $\alpha$ -Pinene'nin miktarını %44.8 olarak bulmuşlardır (Sharopov ve ark., 2010). Ghasemi ve arkadaşları da yine İran da yapmış oldukları başka bir çalışmada  $\alpha$ -Pinene'nin miktarını %49.96 olarak bulmuşlardır (Pirbalouti ve ark., 2014).

*H. scabrum*'un antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, bakteri ve mantarlar üzerinde herhangi bir olumlu etkisinin olmadığı görülmüştür. Bunun nedenleri arasında *H. scabrum*'daki majör bileşenlerden  $\alpha$ -Pinene'nin miktarının %45.34 gibi önemli bir yüzdeye sahip olmasından dolayı olduğundan dolayı görülmektedir. *H. scabrum*'un antimikrobiyal aktivitesinin daha çok Thymol ve Carvacrol ile ilgili olduğu bazı araştırmacılar tarafından da ileri sürülmektedir (Ghasemi ve ark., 2011). Bizim elde ettiğimiz *H. scabrum* bitkisinin uçucu yağında bu oranlar çok düşük çıkmıştır (Thymol %4.57 ve Carvacro %1.63). Guedes ve arkadaşları *Hypericum* türlerinden elde ettikleri uçucu yağların biyolojik aktiviteleri üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, *H. perforatum*'un daha güçlü bir antimikrobiyal etkisinin olduğunu belirtmişler ve aynı etkiyi uçucu yağın konsantrasyonunu 40-60 kat artırdıklarında *H. scabrum*'da da görmüşlerdir (Guedes ve ark., 2012).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1 Sonuç

*Hypericum* içermiş olduğu zengin alkollü ekstraler ve çok çeşitli uçucu yağlara sahiptir. Bunların yanında çok sayıda ikincil metabolit dizisini içeren önemli bir cinstir. Her ne kadar *Hypericum* türünün uçucu yağlarının bileşenleri bildirilmiş olsa da, farmakolojik çalışmaları azdır. *Hypericum* türlerinin uçucu yağlarının tam potansiyelini anlamak için endüstriyel, tarımsal ve farmasötik uygulamalarda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Elde edilen uçucu yağların bileşenleri üzerinde çalışmalar yoğunlaştığında, ileride ilaç sanayinde ve daha başka birçok sağlık alanında kullanılabilir. Uçucu yağların bileşenleri farklı coğrafi alanlardan, iklim koşullarından, fizyolojik durumdan büyük ölçüde etkilendiğinden, kontrollü koşullar altında sabit kompozisyonda uçucu yağ elde edilmesi, yapılacak olan in vitro çalışmalarda esas alınmalıdır.

Sonuç olarak; *Hypericum* türlerinden elde edilen uçucu yağlarının farmasötik endüstrisinde kullanılacak yeni bileşiklerin üretimini geliştirmek için yeni stratejiler sunabileceği kaçınılmazdır.

### 6.2 Öneriler

Bu kapsamda *H. perforatum* hem zengin içeriğinden dolayı ve hemde antimikrobiyal özelliğinin iyi olması nedeniyle ve aynı zamanda sakinleştirici olarak hala günümüzde tıbbi alanda kullanılıyor olması nedeniyle, mutlaka değerlendirilmesi gereken tıbbi bir bitkidir.

## KAYNAKÇA

- Abrahamson, W.G., and Solbrig, O.T., (1970). Soil Preference and Variation in Flavonoid Pigments in Species of Aster. *Rhodora* 72: 251-263.
- Adams, R.P., (1977). Chemosystematics-Analysis of Populational Differentiation and Variability of Acestral and Recent Populations of *Juniperus ashei*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 184-209.
- Adams, R.P., (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured, Carol Stream.
- Ayanoğlu, F., Mert, A., Kaya, D.A., (1999). Hatay yöresinde halk arasında kullanılan bazı önemli tıbbi ve kokulu bitkilerin tespiti ve toplanması. *MKU Ziraat Fakültesi Dergisi*; 4: 101-106.
- Awouafack M.D., Tane P., Kuete V., Eloff J.N. (2013). Sesquiterpenes from the medicinal plants of Africa. In: Kuete V., editor. *Medicinal Plant Research in Africa*. Elsevier; Oxford: pp. 33–103
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol.* Feb; 46(2): 446-75.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., (2010). Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretimine Arttırılması Olanakları, *Türkiye Ziraat Müh.* 7. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010 Ankara, Bildiri Kitabı I: 437-456.
- Baytop, A., (1993). *Farmasötik Botanik Uygulamaları*. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul; 194.
- Baytop, A., Günergün, F., (2003). *Türkiye'de botanik tarihi araştırmaları*. Çetin Matbaacılık.
- Baytop T. (1974). *Farmakognazi ders kitabı* İst.Ünv.Yay.No:2003. Ecz.Fak.No:19 İstanbul.
- Baytop, T., (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri, II. Baskı ISBN: 975-420-021- 1.İstanbul, 480s.
- Beejmohun,V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. and Mesnard, F. (2007). *Microwave-Assisted Extraction Of The Main Phenolic Compounds In Flaxseed*. *Phytochemical Analysis*, 18, 275-282.
- Berger, K., Buckard, W., Büter, B., Schaffner, W., (1996). Züchterische Bearbeitung von Arzneipflanzen mit dem ziel einer optimierung der Inhaltstoffproduktion. *Z.f.Arznei-und Gewürzpflanzen*, 1: 33–36.
- Bertoli, A., Çırak, C., Silva, JAT., (2011). *Hypericum* species as Sources of Valuable Essential Oils. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(1): 29-47.
- Bomme, U., (1997). Produktionstechnologie von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) *Z.F Arznei-und Gewürzpflanzen* 2: 127–134.
- Braunewell, H., (1991). Ökologische, ontogenetische und morphogenetische Einflüsse auf Ertrag und Inhaltstoffgehalt von *Hypericum* ssp. (Dr.agr) *Giessen* 252.
- Boon, H., Smith, M., (1999) *The Botanical Pharmacy: The Pharmacology of 47 Common Herbs*, Quarry Pres, Inc., Kingston ,Ontario, 284.
- Cabral, C.D., L., Fernández Pinto, V., Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1): 1-14.

- Campbell, M.H., Delfosse, E.S., (1984). The Biology of Australian Weeds 13. *Hypericum perforatum* L. *Journal of The Australian Institute of Agricultural Science*, 50, 63-73.
- Canillac, N., Mourey, A., (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, vol. 18, 261– 268.
- Ceylan, A. (1983). Tıbbi Bitkiler-II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No:481, Bornova-İzmir.
- Chatzopoulou, P., Marković, T., Radanović, D., Koutsos, T.V., Katsiotis, S.T., (2009). Essential oil composition of Serbian *Hypericum perforatum* local population cultivated in different ecological conditions, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6): 666-673.
- Chauhan, R.S., Vashistha, R.K., Nautiyal, M.C., Tava, A., Cecotti, R., (2011). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. from cultivated source, *Journal of Essential Oil Research*, 23(3): 20-25.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 79, 213– 220.
- Cıfci, A., Aksoy, A., (2015). Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics 1(2):1-10
- Curtis JD & Levsten NR (1990). Internal secretary structure in hypericu, *Hypericum perforatum* L. And *Hypericum balearicum* L. *New Phytology* 114: 571-580
- CLSI, (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, *Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.*
- Colasanti, A., Kisslinger, A., Liuzzi, R., Quarto, M., Riccio, P., Roberti, G., Tramontano, D., Villani, F., (2000). Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol B*. 54(2-3):103-7.
- Cowan, M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agent. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4):564.
- Crockett, S.L., and N.K.B, Robson., (2011). Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5 (Special Issue 1): 1-13.
- Çırak, C., Kevseroğlu K., (2004). Kantaron bitkisinin eski çağlardan günümüze kullanım şekilleri ile modern tıptaki yeri ve önemi. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19:74-84.
- Çırak, C., Kurt, D., (2014). Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri Ve Kullanım Alanları. *Anadolu, j. Of arı* 24(1): 38 – 52 MFAL.
- Çubuklu, B., Meriçli, A.H., Mar, A., Sarıyar, G., Sütlüpinar, N., Meriçli, F.,(2002). İstanbul Üniversitesi Yayınları. Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. No: 4311 Ezc. Fak. Yay No:79 İstanbul.
- Dachler, M., Pelzmann, H., (1999). Arznei-und Gewürzpflanzen, Anbau, Ernte und Aufbereitung. *Öster. Agrarverlag*, 188-191.
- Davies, N.W., (1990). Gas chromatographic retention indexes of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20 M phases. *J. Chromatog*, 503: 1-4.

- Davis PH. (1967). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Edinburgh University Press.
- Davis, P.H., (1965). Flora of Turkey and the East Aegean Island Vol: I-IX Edinburg University Press, United Kingdom.
- Davis P.H., (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands II. p:355 and P:400 Edinburg University Press, Edinburg)
- Dehe, M., (1993). Johanniskraut in mehrjaerigen Anbau (*Hypericum perforatum* L). Versuchtbericht Heil-und Gewarzpflanzen. Staatl. Lehr-und Versuchsanstalt für Landw. Weinbau und Gartenbau Ahrweiler, 11-16.
- Demetzos, C., Perdetzoglou, D.K.. (2001). Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. et Heldr. from Greece. *Journal of Essential Oil Research*, vol. 13, 460–462.
- Dorđević, A. S., (2015). Chemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Essential Oil, *Advanced technologies*, 4(1): 64-68.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Dorossiev, I., (1985). Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum*. *Pharmazie*. (40), 585–586.
- Duke, J.A., (1985). Handbook of Medicinal Herbs. CRC, Boca Raton, Florida. s.242.
- Ewans, W.C., (1996). Trease and Evans Pharmacognosy, 14<sup>th</sup> edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK.
- Evans WC (1996). Trease and Evans' Pharmacognosy, 14. Ed, WB Saunders Co. Ltd, London.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Abo-Raya, S.H., (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54(1): 74-76. foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4): 273-292.
- Gadzovska-Simic, S., Tusevski, O., Antevski, S., Atanasova-Pancevska, N., Petreska, J., Stefova, M., Kungulovski, D., Spasenoski, M., (2012). Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 64(1): 113–121.
- Gerard, J., (1597). The Herballe or General History of Plantes, Imprinted by John Norton, London.
- Ghasemi, P.A., Rahnama, G.H., Malekpoor, F., Roohi, B.H., (2011). Variation in antibacterial activity and phenolic content of *Hypericum scabrum* L. populations. *J. Med. Plants Res*, 5(17): 4119-4125.
- Grünwald, J., (1999). The World Market for *Hypericum* Products. *Nutraceuticals World* May/June p. 22-25.
- Griffith, R.E., (1847). Medical Botany. Lea & Blanchard, Philadelphia.
- Gunther, R.T., 1968. The Greek Herbal of Dioscorides, Hafner Publishing Company.
- Guedes, A.P., Franklin, G., Fernandes-Ferreira, M., (2012). *Hypericum* sp.: Essential oil composition and biological activities. *Phytochem Rev*, 11:127–52.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, KHC., (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, Edinburgh University Press.
- Halendar, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandhom, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G. M., von Wright, A., (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9): 3590–3595.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fi sh (Latescalcarifer). *J. Food Prot*, 66(3), 410–417.
- Herakman, T., (1996). *Hypericum perforatum* fraksiyonlarının hepatoprotektif etkilerinin araştırılması. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir.
- Holley, R.A., Patel, D., (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable
- İpek, A., (2007). Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) hatlarında azotlu gübrelemenin herba verimi ve bazı özellikleri üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- İşcan, G., (2002). Umbelliferae familyasına ait bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi.
- Javidnia, K., Miri, R., Soltani, M., et all. (2008). Essential oil composition of four *Hypericum* species from Iran. *Chem Nat Compd*. 44: 374–7.
- Jayasena, DD., Jo, C., (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci Technol*, 34(2): 96-108.
- Jennings, W., Shibamoto, T., (1980). Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary chromatography. Academic Press, New York.
- Joshi, R.K., (2016). Chemical constituents of leaf essential oils of *Heracleum candicans* Wall. ex DC from western Himalaya of Uttarakhand, *India American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(2): 01.
- Juliano, C., Mattana, A., Usai, M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *J. Essent. Oil Res*, 12, 516–522.
- Kaçar, O., Azkan N., (2005). Bursa’da doğal florada bulunan sarı kantaron (*Hypericum perforatum* L.) populasyonlarında farklı yüksekliklerin hiperisin oranı üzerine etkisinin belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19:77-89.
- Kalaba, V., Glusac, J., Stjepic M., Kalaba D., Milosevic, D.D., (2015). Antimicrobial Activityof *Hypericum perforatum* Essential Oil. *Qualityof Life*, 6(3-4): 45-52.
- Kalodera, Z., Pepeljnjak, S., Blazevic, C.N., Petrac T., (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium* essential oil. *Pharmazie*, 52(11): pp. 885-886.
- Kazarinova, N.V., Tkachenco, K.G., Uzychenko, L.M., Safonova, N.G., Tkachev, A.V., Koruljuk, E.A., (2002). Component composition and analysis of antibiotic activity of essential oil of *Origanum vulgare* L. grown in regions of West Siberia. *Rastitel’nye-Resursy*, 38(2): pp. 99-103.
- Kılıç, A., (2008). Bartın Orman Fakültesi, Bartın, Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, Cilt:10 Sayı:13.
- Kırbağ, S., (1999). *Hypericum perforatum* L.’ un değişik ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri. *Journal of Qafqaz University*, 2(1): p. 102-108.



- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.J., Coote, G., Nychas, J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol*, 91(3): 453-462.
- Linskens, H.F., Jackson, J.F. (1997b). Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 12: Essential Oils and waxes, Springer, Germany.
- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, Tirillini, M.M.,B., Sagratini, G., Papa, F., Vittori, S., (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum taxa* (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano), *Chemistry & Biodiversity*, 7: 447-466.
- Maisenbacher, P., Kovar KA., (1992). Analysis and stability of *Hypericum oleum*. *Planta Medica*, 58: 351-354.
- Males, Z., Brantner, A.H., Sović, K., Pilepić, K.H., Plazibat, M. (2006). Comparative phytochemical and antimicrobial investigations of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (DC.) *Gaudin Acta Pharm. Sep*;56(3):359-67.
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. I. *J. Food Microbiol*, 76, 187-195.
- Massada, Y., (1976). Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, New York.
- Medina, M.A., Martínez-Poved B., Amores-Sánchez M.I., Quesada A.R., (2006). Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?, *Life Sciences*, 79, 105–111.
- Meral, G.E., Karabay, N.Ü., (2002). In vitro antibacterial activities of three *Hypericum* species from west anatolia, *Turkish Electronic Journal of Biotechnology Special Issue*, 6-10.
- Moyler, D.A., (1993). Extraction of Essential Oils With Carbon Dioxide. *Flavour and Fragrance J.*, Vol.8, 235-247.
- Mukherjee, PK., Verpoorte, R., Suresh, B., (2000). Evaluation of in vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. *J Ethnopharmacol*, 70: 315-321.
- Mouhssen Lahlou, (2004), PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phyther. Res.* 18, 435–448  
Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils
- Naeem, S., Maimoona, A.I., (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Ethnopharmacol*, Oct 5;131(3):511-21. doi: 10.1016/j.jep.2010.07.034. Epub Jul 24.
- Nakipoğlu, M., Otan, H., (1992). Tibbi Bitkilerin Flavonitleri, Anadolu, *J. of AARI*, 4(1): 70 – 93.
- Okoh, O.O., Sedimenko, A.P., Afolayan ,A.J. (2009). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem*, 120:308–312.
- Olajuyigbe, O., Ashafa, A., (2014). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. *Iran. J. Pharm. Res.*13, 1417–1423.

- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, 18, 414–420.
- Önder, S., (1995). *Hypericum perforatum* L. Bitkisinin Annaljezik Etkisinin Mekanizması. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir.
- Özçelikay, G., Şar, S., Asil, E., (1997). A Study on Import and Production Licences Given by the Ministry of Health For The Plant Originated Remedies in 1989-1995 Period, *J.Fac.Pharm.*, Ankara No:75, 482-490.
- Özgüven, M., Sekin, S., Gürbüz, B., N. Şekeroğlu, Ayanoglu, F., ve Erken, S., (2005). Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti. VI. Türkiye Ziraat Mühendisleri Teknik Kongresi Bildiri Kitabı, Cilt.1: 481-501, Ankara.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S., ve Byfield, A., (1997). Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. Doğal Hayatı Koruma Derneği Yayınları, İstanbul.
- Özkan, E.E., Demirci, B., Güner, Ç.Ü., Kültür, Ş., Mat, A., Başer, K.H.C., (2013). Essential Oil Composition of Five Endemic *Hypericum* species from Turkey. Özkan et al., *Met Aromat Plants*, 2:2/ 10.4172/2167-0412.100012.
- Pank, F., Heine, H., (1998). Ziele und Methoden der Arznei-und Gewürzpflanzenzüchtung und verfügbare Sorten in Deutschland. *Z.f. Arznei-und Gewürzpflanzen*, 3: 125–138.
- David Phillipson, J. (1993). International Society for Horticultural Science. Quality Assurance Of Medicinal Plants, *Acta Hortic.* 333, 117-122.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinusofficinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 17, 15–19.
- Pirbalouti, A.G., Fatahi-Vanani, M., Craker, L., Shirmardi, H., (2014). Chemical composition and bioactivity of essential oils of *Hypericum helianthemoides*, *Hypericum perforatum* and *Hypericum scabrum*. *Pharm. Biol.* 52, 175-181.
- Plescher, A., I. Fröbus. (1995). Leitlinie für den effizienten und umweltvertraeglichen Anbau von Johanniskraut in Thüringen. *Jahresbericht.* 1–15.
- Reichling, J., Weseler, A., Saller, R., (2001). A Current Review of the Antimicrobial Activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*; 34(Suppl1): 116-118).
- Robson, NKB., (1967). *Hypericum* In: Davis P.H.(Ed.). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press Edinburgh.* 355-340.
- Ruberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G., Dorman, H.J.D. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculumvulgare* and *Crithmummaritimum* essential oils. *Planta Medica*, vol. 66, 687– 693.
- Sahin, F., Gulluc, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Ozer, H., (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Orignum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control.* (15): 549–557.
- Sanchez-Mateo, CC., Bonkanka, CX., Hernandez-Perez, M., Rabanal, RM., (2006). Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *J Ethnopharmacol*;107: 1–6.

- Senatore, F., Napolitano, F., Ozcan, M. (2000). Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 15, 186–189.
- Sevim, A., Demirci, B., Iscan, G., Köse, Y.B., Baser, K.H.C., (2010). Composition and anticandidal activity of the essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Asian Journal of Chemistry*, 22(2): 1315-1320.
- Sevinç, A., Merdun, B., 1995. Türkiye’de yetişen uçucu yağ içeren bitkiler ve kullanım alanları. Bitirme Ödevi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., (2001). Traditional Medicine in Turkey X. Folk Medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol*, 75: 95-115.
- Sharopov, F.S., Gulmurodov, I.S., Setzer, W.N., (2010). Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum scabrum* L. growing wild in Tajikistan, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(6): 284-290.
- Sikkema, J. De Bont, J.A. and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59: 201-222.
- Simic, N., Palic, R., Vajs, V., Milosavljevic, S., Djkovic, D., (2002). Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil *Journal of Essential Oil Research*, 14 (1): pp. 76-78.
- Singh Pal, A., (2006). Hypericin-A naphthodianthrone from *Hypericum perforatum*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 62,225–233.
- Sitarek, P., Rijo, P., Garcia, C., Skala, E., Kalemba, D., Białas, A.J., Szemraj, J., Pytel, D., Toma, M., Wysokińska, H., and Śliwiński T., (2017). Antibacterial, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antiproliferative Properties of Essential Oils from Hairy and Normal Roots of *Leonurus sibiricus* L. and Their Chemical Composition *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 7384061, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/7384061>
- Solomon, D., Adams, J., and Graves. N., (2013). Economic evaluation of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *Journal of Affective Disorders* 148: 228-234.
- Stenhagen, E., Abrahamsson, S., McLafferty, F.W. (1974). Registry of Mass Spectral Data. John Wiley & Sons, New York.
- Süntar, İ.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., et al., (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol*, Feb 3;127(2):468-77.
- Swigar, A.A., Silverstein, R.M. (1981). Monoterpenes. Aldrich Chem. Comp, Milwaukee.
- Tanaka N, Takaishi Y, Shikishima Y, Nakanishi Y, Bastow K, Lee KH, et al., (2004). Prenylated Benzophenones and Xanthenes from *Hypericum scabrum*. *J Nat Prod*, 67: 1870-75.
- Tang, J., Colacino, J.M., Larsen, L.H., Spitzer, W., (1990). Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses, *Antiviral Res.* 13 313–325.
- Uzun F., (2009). Ontogenic changes in hypericin content of some *Hypericum* species in natural pastureland of Turkey, *Bangladesh J. Bot.*, 38, 13-18.
- Üstün, Ç., (1998). Santral sinir sistemi üzerine etkili tıbbi bitkilerin tarihsel süreç içinde ve günümüzde tedavideki yeri. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi. İzmir

- Walker, L., Sirvent, T., Gibson, G., Vance, N., (2001). Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among *Hypericum perforatum* plants in the Northwestern United States. *Can J Bot*, 79:1248-51.
- Wichtl, M., (1986). *Hypericum perforatum* L. Das Johanniskraut. *Z. f. Phytotherapie* 3: 87–90.
- Yamani, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M., Javidnia, K., (2007). Comparison Of Essential Oil Compositions Of *Salvia mirzayanii* Obtained By Supercritical Carbondioxide Extraction And Hydrodistillation Methods. *Food Chemistry*, 108, 341-346.
- Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., and Takaishi, Y., (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology* 46:133–152.
- Yetkin, G., (2008). Türkiye’de satılan ticari kantaron yağı üzerinde fitoterapötik yönden araştırmalar, Gazi Üniv., Sağlık Bil. Enst., Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Yüksek Lisans Tezi, Ecz. İpek PEŞİN. ANKARA, Aralık (2007). *Hypericum perforatum* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinin yara iyileştirici ve antienflamatuvar aktiviteleri üzerinde çalışmalar, T.C. Gazi üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Melahat SUSAMIŞ
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas-1988
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD, 58140-Sivas
E-posta Adresi	melahatsusamis@gmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Kongre Lisesi, 2005
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2013
Yüksek Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2019
Ünvan	Biyolog

### İş Tecrübesi

2015-2016 Özel Ters Açı Eğitim Ve Danışmanlık – Biyoloji Öğretmeni

2016-2017 Özel Şifaiye Sağlık Meslek Lisesi ve Teknik Anadolu Lisesi- Biyoloji Öğretmeni

2017-2018 Özel Genç Bilgi Anadolu Lisesi- Prof. Dr. Necmettin Erbakan Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi- Biyoloji Öğretmeni



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK  
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sivas Bölgesinde Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması
-----------------------	--

<b>ETİK KURULU BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092
	FAKS	-
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ahmet Alim			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yüksek lisans tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza:



## CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sivas Bölgesinde Yetişen Sarı Kantaron Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2017-10/21	Tarih: 04.10.2017		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anotomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyoistatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gulay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ataş	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Recai Zan	Endodonti	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İznilidir
Yrd. Doç. Dr. Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Engin Altınkaya	İç Hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının  
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez  
İmza: