

278906

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

SAPONOZİTLERİN ANTİFUNGAL ETKİLERİ
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

FARMAKOĞNOZİ PROGRAMI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Eczacı
Yavuz Bora ÖZER

ANKARA — 1981

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

Saponozitlerin Antifungal
Etkileri Üzerinde Araştırmalar

FARMAKOGNOZİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Eczacı
Yavuz Bora ÖZER

Rehber Öğretim Üyesi
Doç.Dr.Ekrem SEZİK

ANKARA-1981

Tez konumu seçen ve araştırmamın her safhasında, her türlü bilgi ve yardımlarından yararlandığım, değerli hocam Doç.Dr.Ekrem Sezik'e ; laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan ve bilgilerinden yararlandığım sayın Prof.Dr.Nuran Yuluğ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışma arkadaşlarıma çalışmalarım sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No.</u>
GİRİŞ VE AMAÇ	1
TEORİK BİLGİLER.....	3
Antifungal Aktivite Tayininde	
Kullanılan Yöntemler	3
Difüzyon Yöntemleri	4
Bitki Dokularının Tatbiki Yöntemi	4
Süzgeç Kağıdı Şeridi Yöntemi	4
Meyilli Tabaka Yöntemi	4
Silindirik Tabaka Yöntemi	5
Oyuk Yöntemi	5
Kağıt Disk Yöntemi	5
Dilüsyon Yöntemleri	6
Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi	6
Petri Kutusunda Sıvı Dilüsyon	
Yöntemi	6
Aşarlı Dilüsyon Yöntemi	7
Hiyentografi Yöntemleri	7
Kağıt Kromatografisine	
Dayanan Yöntem	7
İnce Tabaka Kromatografisine	
Dayanan Yöntem	7
Elektroforeze Dayanan Yöntem	8
Araştırmada Kullanılan Saponozitler	
Üzerinde Yapılan Çalışmalar	8
Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla Aynı	
Cinsten Fungusların Kullanıldığı Araştırmalar.	10
Araştırmamızda Kullanılmayan	
Funguslarla Yapılan Çalışmalar	12

	<u>Sayfa No.</u>
PRATİK ÇALIŞMALAR	
MATERYAL	15
YÖNTEM	17
Dilüsyon Yöntemleri	20
Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi	20
Ham Saponozit Taşıyan Sabouraud	
Besiyerli Seri Hazırlanması	20
Besiyerlerinin İnokülasyonu	21
Mc Farland Standart Nefelometre	
Tüplerinin Hazırlanması	21
Petri Kutusunda Sıvı Dilüsyon Yöntemi	22
Agarlı Dilüsyon Yöntemi	24
Gravimetrik Ölçüm Yöntemi	25
Çap Ölçümü Yöntemi	26
Alan Hesabı Yöntemi	26
Difüzyon Yöntemleri	27
Oyuk Yöntemi	27
Oyukların Hazırlanması	27
Ham Saponozit Taşıyan Sabouraud	
Besiyerli Dilüsyonların Tatbiki	28
Kağıt Disk Yöntemi	28
Disklerin Hazırlanması	28
Disklerin Tatbiki	28
Biyootografi Yöntemi	29
İnce Tabaka Kromatografisine	
Dayanan Yöntem	29
BULGULAR	31
SONUÇ VE TARTIŞMA	39
ÖZET	51
SUMMARY	53
LİTERATÜR	55
EKLER	59
İNDEKSLER	60

G İ R İ Ş V E A M A Ç

Bilim Dalımızda, saponozit taşıyan bitkilerin kimyasal yapısı üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar sonucu Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark. , Gypsophila bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh., Gypsophila ericalyx Boiss., Gypsophila perfoliata L., Polygala pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J.Cullen ve Saponaria kotschy Boiss.'e ait ham saponozitler elde edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.^a

Saponozitlerin antifungal etkileri ve bu etkilerin araştırılması son yıllarda önem kazanmıştır (3,8,10,15,19,24,37).

Yukarıda belirtilen türlerin ham saponozitlerinin antifungal aktiviteleri üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamızın gayelerinden biri, bu ham saponozitlerin antifungal aktivitelerinin tayini olmuştur.

^a. Gypsophila Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar: Doç.Dr.Ekrem Sezik , S.kotschy Boiss. Üzerinde Yapılan Çalışmalar: İ.Çalış, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Farmakognozi Programı Ankara (1978) (Yönetici Doç.Dr.E.Sezik), P.pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J.Cullen Üzerinde Yapılan Çalışmalar: E.Yeşilada, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Farmakognozi Programı Ankara (1979) (Yönetici Doç.Dr.E.Sezik).

Diğer taraftan, saponozitlerin antifungal aktivitelerinin tayini için ülkemizde ve Bilim Dalımızda herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Antifungal aktivitenin tayininde kullanılacak yöntemlerin laboratuvarlarımız şartlarında uygulanabilirliği de araştırılmamıştır.

Araştırmamızın bir başka gayesini de, antifungal aktivite tayini için kullanılan yöntemlerin uygulanması ve daha sonraki araştırmalarımızda kullanılacak, laboratuvar şartlarımıza uygun, yöntemlerin tespiti teşkil etmektedir.

Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, araştırmamız laboratuvarlarımız şartlarına uygun antifungal aktivite tayin yöntemlerinin tespiti ve Bilim Dalımızda elde edilen ham saponozitlerin antifungal aktivitelerini tayin etme amacına yönelik olarak planlanmıştır.

TEORİK BİLGİLER

TEORİK BİLGİLER

Teorik bilgiler kısmında antifungal aktivite tayininde kullanılan yöntemler genel olarak incelenmiştir. Bunun yanısıra, triterpenik saponozitler veya bunları taşıyan ekstrelerin antifungal aktivitelerini tayin için kullanılan değişik yöntemler de araştırılmış ve bu konuda toplanan bilgiler üç değişik grup altında bir araya getirilmiştir: Araştırmamızda kullanılan saponozitler üzerinde yapılan çalışmalar, araştırmamızda kullanılan funguslar ile aynı cinsten olan fungusların kullanıldığı araştırmalar ve diğer fungusların kullanıldığı araştırmalar.

Yukarıda belirtilen araştırmalarda, çalışmamız bakımından, kullanılan yöntem ve funguslar önemli olduğu için, hazırlanan tablolara sadece bu bilgiler dahil edilmiştir.

Antifungal Aktivite Tayininde

Kullanılan Yöntemler.

Antifungal aktivite tayininde kullanılan yöntemler üç ana grup altında toplanabilir: Difüzyon, dilüsyon ve biyotografi yöntemleri.

Bu ana yöntemler de uygulamadaki bazı farklılıklardan dolayı alt gruplara ayrılırlar.

Bu kısımda, antifungal aktivite tayininde kullanılan yöntemlerin esasına ait bilgiler (1,2,16,17,18,23,28,29) kısa bir şekilde verilmiştir.

Difüzyon Yöntemleri

Belirli miktarda fungus ile inoküle edilmiş besiyeri üzerine değişik konsantrasyonlardaki, antifungal aktivitesi tayin edilecek madde konur. Belirli şartlarda inkübasyona bırakılır. Maddenin besiyerine difüzyonu sonucunda, fungusun büyümesinin inhibisyonunun ölçülmesi, maddenin etkisini ve bu etkinin değerini gösterir.

Difüzyon yöntemleri altı alt gruba ayrılabilir: Bitki dokularının tatbiki, süzgeç kağıdı şeridi yöntemi, meyilli tabaka yöntemi, silindirik tabaka yöntemi, oyuk yöntemi ve kağıt disk yöntemi.

Bitki Dokularının Tatbiki Yöntemi: Bitkinin taşıdığı antifungal maddenin bulunduğu kısımdan alınan kesitler, fungus ile inoküle edilmiş agarlı besiyeri üzerine konur, sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda dokulardan besiyerine difüze olan antifungal maddelerin meydana getirdikleri inhibisyon zonları ölçülür.

Süzgeç Kağıdı Şeridi Yöntemi: Denenecek madde çözeltisi süzgeç kağıdından şeritlere emdirilir, süzgeç kağıtları petri kutularındaki agarlı besiyerinin ortasına yakın bir şekilde yerleştirilir. Fungus öze ile süzgeç kağıdına dik bir açı yapacak şekilde zigzag yaparak besiyeri üzerine ekilir, sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon alanları ölçülür.

Meyilli Tabaka Yöntemi: Petri kutuları meyilli bir şekilde konur. İçlerine agarlı besiyeri dökülür, besiyerinin petri kutusunun tabanını meyilli bir tabaka halinde tam olarak kaplaması sağlanır, katılaşmaya bırakılır. Bu tabakanın üzerine, denenecek maddenin belli bir dilüsyonuna taşıyan agarlı besiyeri ilave edilir, katılaştırılır.

tıktan sonra üzerine fungus ekilir, inkübasyona bırakılır. Üreme sonucu, antifungal maddenin meyilli besiyeri içinde bulunmasından doğan konsantrasyon farklılıklarına göre meydana gelen değişik inhibisyon zonları ölçülür.

Silindirik Tabaka Yöntemi: Fungus ile inoküle edilmiş agarlı besiyerine iki ucu açık cam veya porselenden yapılmış, belirli hacme sahip, küçük silindirlere yerleştirilir. Silindirlerin içleri denenecek maddenin belirli konsantrasyonlarındaki çözeltileri ile doldurulur, inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon zonları ölçülerek sonuçlar hesaplanır.

Oyuk Yöntemi: Önceden belli bir miktar fungus ile inoküle edilmiş agarlı besiyeri petri kutularına dökülür.

Besiyerine oyuklar iki şekilde yapılabilir: Dökümden önce petri kutusu içine yerleştirilen standart çaplı silindirlere, agar donduktan sonra çıkarılır veya besiyeri katılaştıktan sonra silindirlere besiyeri üzerine bastırılır, eşit çaptaki parçacıklar alınarak oyuklar meydana getirilir.

Bu oyuklara denenecek maddenin değişik konsantrasyonlarındaki çözeltilerinden belli miktarlarda ilave edilir, sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek sonuç hesaplanır.

Kağıt Disk Yöntemi: Fungus ile inoküle edilmiş besiyeri petri kutusuna dökülür, üzerine uygun aralıklar ile denenecek maddenin belli konsantrasyonlarındaki çözeltileri ile ıslatılmış ve kurutulmuş standart çaplı kağıt diskler yerleştirilir. Sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları ölçülür.

Dilüsyon Yöntemleri

Belirli miktarlarda antifungal madde taşıyan sıvı veya katı besiyeri ile hazırlanmış seriler, belirli miktarda fungus ile inoküle edilir. Fungusun özelliklerine göre inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon süresi sonunda fungusun üremesinin inhibisyonunun ölçülmesi, antifungal maddenin etkisi ve bu etkinin değerini gösterir. Sıvı besiyeri ile tüpte yapılan deneylerde sonuçlar minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) tespiti ile değerlendirilir.

Bu yöntemler birkaç şekilde uygulanabilir: Sıvı dilüsyon (tüpte veya petri kutusunda), agarlı dilüsyon yöntemleri.

Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi: Antifungal maddeyi değişik dilüsyonlarda taşıyan sıvı besiyeri ile uygun bir seri hazırlanır. Bu serideki tüplere aynı miktarda fungus ilave edilir, inkübasyona bırakılır. Üreme sonucu meydana gelen bulanıklık nefelometre tüpleri ile mukayese edilerek, türbidimetrik veya spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Buradan da maddenin en etkili olduğu dilüsyon tespit edilir.

Hiç bulanıklık (dolayısıyla üreme) göstermeyen tüpteki dilüsyon MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak kabul edilir.

Bu yöntem antifungal aktivitenin ölçülmesinde kullanılan ucuz ve basit bir yöntemdir.

Petri Kutusunda Sıvı Dilüsyon Yöntemi: Antifungal maddeyi değişik dilüsyonlarda taşıyan sıvı besiyeri ile uygun bir seri petri kutularına hazırlanır. Fungus kültüründen alınan belli büyüklükteki miselyum parçaları besiyeri üzerine konur, sistem inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen miselyumlar süzülerek besiyerinden kurtarılır, kurutulup tartılır. Sonuçlar, kontrol (antifungal madde taşımayan besiyeri) deki üreme ile karşılaştırılarak % miselyal üreme üzerinden hesaplanır.

Agarlı Dilüsyon Yöntemi: Değişik konsantrasyonlardaki antifungal maddeyi taşıyan agarlı besiyeri petri kutularına dökülerek bir seri hazırlanır. Aynı büyüklükteki miselyum parçaları petri kutusundaki besiyerinin merkezine konur, sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda, sonuç ya meydana gelen miselyumların kapladıkları alanın ölçülmesi veya petri kutusunda sıvı dilüsyon yönteminde olduğu gibi gravimetrik yolla hesaplanır.

Biyotografi Yöntemleri

Bu yöntemlerde antifungal aktivitesi tayin edilecek maddeler kromatografi veya elektroforez yöntemleri ile birbirinden ayrılır. Elde edilen kromatogramlar üzerinde aktivite tayini deneyleri yapılır. Bu yöntemin de değişik uygulamaları bulunmaktadır.

Bunlardan kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve elektroforez üç ana grubu teşkil eder.

Kağıt Kromatografisine Dayanan Yöntem: Belli miktarda fungus ile inoküle edilmiş agarlı besiyerleri petri kutularına dökülür, katılaşmaya bırakılır. Antifungal maddenin uygun bir solvandaki belirli dilüsyonları kağıt kromatografisine tabi tutulur, kurutulan kromatogramlar, tatbik noktası ortada kalmak üzere boyuna şeritler halinde kesilir. Değişik dilüsyonları taşıyan şeritler birbirlerine paralel olarak petri kutularının içindeki agarlı besiyerinin üzerine dikkatle yerleştirilir. Maddelerin kromatogramdan besiyerine difüze olmaları için bir süre beklenir, süre sonunda kromatogramlar alınır, besiyerleri inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon alanları ölçülür.

İnce Tabaka Kromatografisine Dayanan Yöntem: Cam plaklar uygun bir adsorbant ile kaplanır, aktive edilir. Antifungal madde iyi çözüldüğü bir solvanda hazırlanmış değişik dilüsyonlardaki çözeltileri halinde plaka eşit miktarlarda tatbik edilir. Plaklar uygun bir solvan sistemi ile sürüklenir, kendi hallerinde bırakılarak kurutulur.

Diğer taraftan, kromatografide kullanılan cam plakların boyutlarındaki, çerçevesiz cam plaklar belli miktarda fungus ile inoküle edilmiş agarlı besiyeri ile belli kalınlıkta kaplanır, katılaşması beklenir. Sürüklenmiş ve kurutulmuş plaklar, adsorban iç yüzüne gelmek üzere, besiyerli plaklar üzerine kapatılır. Kromatogramdaki adsorbanın besiyerine yapışmasını önlemek için plaklar arasına, aynı boyutlarda, ince bir süzgeç kağıdı konur. Antifungal madde nin besiyerine difüze olması için bir süre beklenir, bu süre sonunda adsorbanlı plaklar alınır, besiyerli plaklar uygun ısıda inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon alanları işaretlenir.

Elektroforeze Dayanan Yöntem: Destek faz olarak kağıt, selüloz asetat, nişasta, alüminyum oksit, jelatin, silikajel ve değişik tipte agarlar kullanılarak yapılan bir elektroforez yöntemidir.

En iyi sonuç agar ile alınmaktadır.

Yöntemde, agarlı vasatın yüzeyine numunenin belli dilüsyonları tatbik edilerek uygun şiddetteki bir akım belirli bir süre tatbik edilir. Elde edilen kromatograma, denenecek fungus ile inoküle edilmiş ikinci bir kat agarlı besiyeri dökülerek sistem inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda antifungal madde lekeleri, inhibisyon zonu şeklinde belirir.

Araştırmada Kullanılan Saponozitler

Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Araştırmamızda Gypsophila, Polygala ve Saponaria türlerine ait ham saponozitler kullanılmıştır. Aynı cinslerden elde edilen saponozitler üzerindeki araştırmaların büyük kısmı B. Wolters'e aittir. Bu araştırmalarda triterpenik saponozitlerin yanında

steroidal saponozit ve alkaloitler de antifungal aktivitelerinin tespiti gayesi ile kullanılmıştır.

Araştırmalarda "Gypsophila saponin" adı altında E.Merck (Darmstadt) firmasının "Saponinum Purum Album" adlı saponini kullanılmıştır. Bu saponinin hangi türden elde edildiği belli değildir.

Gypsophila saponin ile yapılan çalışmalarda sırası ile Candida albicans, Aspergillus niger (31); Pricularia oryzae, Trichotechium roseum, Claviceps purpurea, Polyporus versicolor(33); Pricularia oryzae(34,36); Aspergillus clavatus, Schizophyllum commune, Fomes officinalis, Polystictus versicolor, Coniophora cerebella, Rhizoctonia solani, Fusarium oxysporum, F. bulbigenum, F. conglutinans, Alternaria solani, Pricularia oryzae, Trichotechium roseum, Botrytis allii, Claviceps purpurea, Sclerotinia fructicola (35) fungusları kullanılmıştır.

Bu araştırmalarda Gypsophila saponinin antifungal aktivitesi, silindirik tabaka yöntemi (32,33,34,35), oyuk yöntemi (31) ve ince tabaka kromatografisine dayanan biyotografi yöntemi (36) ile tespit edilmiştir.

B. Wolters tarafından Polygala amara, Polygala senega, Saponaria officinalis ve bir Gypsophila türü (araştırmada hangi tür olduğu belirtilmemiş) saponozitlerinin antifungal aktivitesi üzerinde yapılan çalışmanın (32) yöntemi ve sonuçları tablo-1 de gösterilmiştir.

Bitki	Organ	Pricularia Trichotechium Claviceps Polyporus			
		oryzae	roseum	purpurea	versicolor
P.amara	Herba	+++	++	+++	++
P.senega	Kök	+++	++	++	++
S.officinalis	Kök	+++	+	++	++
Gypsophila sap.	Kök	++	+	+++	+

Yöntem: Silindirik tabaka

Tablo-1

S.officinalis, Polygala ve Gypsophila Türleri Saponozitlerinin Antifungal Aktiviteleri(),
(+++)Fungusit, (++)Fungustatik, (+)Kısmi Tesir.

Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla Aynı
Cinsten Fungusların Kullanıldığı Araştırmalar

Araştırmamızda (1) Alternaria, (5) Aspergillus, (1) Candida, (1) Fusarium ve (1) Penicillium türü antifungal aktivite tayininde kullanılmıştır.

Bunlardan Penicillium türleri başka araştırmacılar tarafından kullanılmamıştır. Araştırmalarda kullanılan diğer cinslere ait funguslar, yöntemler ve denenen saponozitler tablo-3 te gösterilmiştir.

Madde	<u>Alternaria</u>	<u>Aspergillus</u>	<u>Candida</u>	<u>Fusarium</u>	Yöntem	Lit.
Eskin	-	niger	albicans	-	IIa	31
	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35
Killaya- saponin	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35
Siklamin	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35
	-	niger	albicans	-	IIa	31
Glisirizin	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35
Hedera- saponin	-	niger	albicans	-	IIa	31
	tenuis	niger	-	oxysporum	Ic	27
	ivy	ochraceus	-	nivale	Ic	
α -hederin	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35

Kullanılan Yöntemler: Ic Agarlı Dilüsyon, IIa Oyuk Yöntemi (Difüzyon), IIc Silindirik Tabaka Y. (Difüzyon), (-) Araştırmada Kullanılmamış.

Tablo-2

Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla Yapılan Çalışmalar

Madde	Alternaria	Aspergillus	Candida	Fusarium	Yöntem	Lit.
H.helix, H.colchica sulu ekstreleri	-	flavus	albicans	-	Ic+IIa	18
-	-	fumigatus	albicans	-		
-	-	niger	albicans	-		
Alfalfa- saponin	solani	spec.	-	-	Ic	3
-	-	-	-	oxysporum	Ic	37
Primulik asit	solani	clavatus	-	oxysporum bulbigenum conglutinans	IIc	35
Primula- saponin	-	niger	albicans	-	IIa	31
-	-	-	albicans	-	IIa	19
Sanikula- saponin	-	fumigatus	albicans tropicalis parapsilosis guilliermondii	-	IIa	12

Antifungal Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler:Ic Agarlı Dilüsyon,IIa Oyuk Yöntemi(Difüzyon),IIc Silindirik Tabaka Y.(Difüzyon),(-)Araştırmada Kullanılmamış

Tablo-3

Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla Yapılan Çalışmalar

Araştırmamızda Kullanılmayan
Funguslarla Yapılan Çalışmalar

Triterpenik saponozitlerin antifungal aktivitelerini tayin için yirmiyedi kadar değişik cinste fungus kullanılmıştır.

Bunlardan dördü daha önce tablo-1 de verilmişti. Diğer funguslar ve kullanılan yöntemler tablo-3 te gösterilmiştir.

Denenen Saponozit	Kullanılan Fungus	Yöntem	Lit.
Eskin	Pricularia oryzae	IIIa	36
		Ic	33
		IIc	32, 34, 35
	Claviceps purpurea	Ic	33
		IIc	32, 34, 35
	Trichotechium roseum	Ic	33
		IIc	32, 34, 35
	Polyporus versicolor	Ic	33
		IIc	32
	Fomes officinalis	IIc	35
	Polystictus versicolor	IIc	
	Coniophora cerebella	IIc	
	Rhizoctonia solani	IIc	
	Botrytis allii	IIc	
Sclerotinia fructicola	IIc		
Trichophyton menthagrophytes	IIa	31	
Glisirizin	Fomes officinalis	IIc	35
	Polystictus versicolor	IIc	
	Coniophora cerebella	IIc	
	Rhizoctonia solani	IIc	
	Pricularia oryzae	IIc	32, 35
		Ic	33
	Trichotechium roseum	Ic	33
		IIc	32, 35
	Botrytis allii	IIc	35
	Claviceps purpurea	IIc	32, 35
		Ic	33
	Sclerotinia fructicola	IIc	35
	Polyporus versicolor	Ic	33
		IIc	32

Ic Agarlı Dilüsyon Y., IIa Oyuk Y., IIc Silindirik Tabaka Y., IIIa İnce Tabaka Kromatografisine Dayanan Y. (Biyotografi).

Tablo-4

Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslar İle Yapılan Çalışmalar

Denenen Saponozit	Kullanılan Fungus	Yöntem	Lit.
Amonyum glisirizinat	Claviceps purpurea	IIc	34
Killaya-saponin	Fomes officinalis	IIc	35
	Polystictus versicolor	IIc	
	Coniophora cerebella	IIc	
	Rhizoctonia solani	IIc	
	Polyporus versicolor	IIc	32
	Pricularia oryzae	IIc	32, 34, 35
	Trichotechium roseum	IIc	32, 35
	Botrytis allii	IIc	35
	Claviceps purpurea	IIc	32, 35
	Sclerotinia fructicola	IIc	35
	Trichophyton menthagrophytes	IIa	31
α-hederin	Fomes officinalis	IIc	35
	Polystictus versicolor	IIc	
	Coniophora cerebella	IIc	
	Rhizoctonia solani	IIc	
	Pricularia oryzae	IIc	
	Trichotechium roseum	IIc	
	Sclerotinia fructicola	IIc	
	Botrytis allii	IIc	
	Claviceps purpurea	IIc	
Hederasaponin	Trichophyton rubrum	IIa+Ic	18
	Trichophyton menthagrophytes	IIa+Ic	18
	Microsporum cannis	IIa+Ic	18
	Trichotechium roseum	Ic	27
		IIc	32
	Trichoderma viride	Ic	27
	Botrytis cinerea	Ic	
	Phoma betae	Ic	
	Cercospora beticola	Ic	
	Colletotrichum hedericola	Ic	
	Phytium debaryanum	Ic	
	P.irregulare	Ic	
	P.ultimum	Ic	
	Pricularia oryzae	IIc	32
	Claviceps purpurea	IIc	
	Polyporus versicolor	IIc	
	Didymella lycopersici	Ic	27
	Ophiobolus graminis	Ic	
	Cylindrocarpon radicola	Ic	
	Phytophthora cactorum	Ic	
	P.citrophthora	Ic	
P.cinnamomi	Ic		

Ic Agarlı Dilüsyon Y., IIa Oyuk Y., IIc Silindirik Tabaka Y.

Tablo-5

Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslarla Yapılan Çalışmalar

Denenen Saponozit	Kullanılan Fungus	Yöntem	Lit.
Siklamin	<i>Fomes officinalis</i>	IIc	35
	<i>Polystictus versicolor</i>	IIc	
	<i>Polyporus versicolor</i>	IIc	32
	<i>Coniophora cerebella</i>	IIc	35
	<i>Rhizoctonia solani</i>	IIc	
	<i>Pricularia oryzae</i>	IIc	32,35
	<i>Trichotechium roseum</i>	IIc	32,35
	<i>Botrytis allii</i>	IIc	35
	<i>Claviceps purpurea</i>	IIc	32,35
	<i>Sclerotinia fructicola</i>	IIc	32
	<i>Trichophyton menthagrophytes</i>	IIa	31
Primulik asit	<i>Claviceps purpurea</i>	Ic, IIc	33,35
	<i>Pricularia oryzae</i>	Ic, IIc	
	<i>Trichotechium roseum</i>	Ic, IIc	33
		IIc	34,35
	<i>Polyporus versicolor</i>	Ic	33
	<i>Polystictus versicolor</i>	IIc	35
	<i>Fomes officinalis</i>	IIc	35
	<i>Coniophora cerebella</i>	IIc	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	IIc	
	<i>Botrytis allii</i>	IIc	
	<i>Sclerotinia fructicola</i>	IIc	
<i>Trichophyton menthagrophytes</i>	IIa	31	
Primula-saponin	<i>Pricularia oryzae</i>	IIIa	36
		IIc	32
		Ic	33
	<i>Claviceps purpurea</i>	IIc	32
		Ic	33
	<i>Trichotechium roseum</i>	Ic	32
		IIc	33
	<i>Polyporus versicolor</i>	Ic	32
		IIc	33
	<i>Trichophyton menthagrophytes</i>	IIa	31
	Alfalfa-saponin	<i>Trichoderma spec.</i>	Ic
<i>Trichoderma viride</i>		Ic	15,37
<i>Rhizoctonia solani</i>		Ic	37
<i>Phytophthora drechsleri</i>		Ic	
<i>Phoma spec.</i>		Ic	
<i>Verticillium albo-atrum</i>		Ic	
<i>Pythium spec.</i>		Ic	3
<i>Sclerotium rolfsii</i>		Ic	3,10
Sanikula-saponin	<i>Trichophyton rubrum</i>	IIa	12
	<i>Trichophyton menthagrophytes</i>	IIa	
	<i>Microsporum gypseum</i>	IIa	

Ic Agarlı Dilüsyon Y., IIa Oyuk Y., IIc Silindirik Tabaka Y., IIIa İnce Tabaka Kromatografisine Dayanan Yöntem (Biyootografi)

Tablo-6

Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslarla Yapılan Çalışmalar

P R A T İ K Ç A L I Ş M A L A R

P R A T İ K Ç A L I Ş M A L A R

M A T E R Y A L

Araştırmamızda kullanılan maddeler, Farmakognozi Bilim Dalının daha önceki araştırmaları sonucu elde edilen ham saponozitlerdir.

Bunlar aşağıdaki bitkilerin köklerinden elde edilmiştir:

Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark.,
Gypsophila bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh., Gypsophila eriocalyx Boiss.
Gypsophila perfoliata L., Polygala pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J.Cullen ve Saponaria kotschyi Boiss.

Bu bitkilerin toplandığı yerler ve Hacettepe Eczacılık Fakültesi Herbaryumundaki (HÜEF) örneklerinin numaraları aşağıda gösterilmiştir.

- G.arrostii var. nebulosa, Isparta, Atabey civarı, 21.6.1969 (HÜEF 116)
G.bicolor, Van, Ataköy civarı, 6.8.1969 (HÜEF 110)
G.perfoliata, Niğde, Bor, Kayıköy civarı, 28.6.1969 (HÜEF 129)
G.eriocalyx, Ankara, Keskin, Büyükcevizli köyü, 29.6.1969 (HÜEF 127)
P.pruinosa ssp. pruinosa, Konya, Beyşehir, Fele köyü, 13.6.1975 (HÜEF 710)
S.kotschyi, Isparta, Gölcük, Krater gölü yamaçları, 26.6.1975 (HÜEF 866)

Araştırmamızda kullanılan funguslar, Hacettepe Üniversitesi Mikrobiyoloji Enstitüsü ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Mikrobiyoloji Enstitüsünden sağlanmıştır.

Alındıkları yere göre, funguslar aşağıda gösterilmiştir.

H.Ü. Mikrobiyoloji Enstitüsünden:

Alternaria solani

Aspergillus flavus

Aspergillus fumigatus

Aspergillus niger

Candida albicans

A.Ü. Ziraat Fakültesi Mikrobiyoloji Enstitüsünden:

Aspergillus ochraceus

Aspergillus versicolor IMI 49124

Fusarium oxysporum

Penicillium expansum IMI 37767

Fungusların üretilmesinde kullanılan besiyerlerinin formülleri ek-1 de verilmiştir. Bu besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve markaları aynı ekte belirtilmiştir.

a. Koleksiyonlarındaki fungusları vererek araştırmamıza değerli yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Turgut Denizel'e teşekkür ederiz.

Y Ö N T E M

Araştırmamızda kullanılan funguslar iki büyük grup altında toplanabilirler: Miselyum meydana getirerek üreyenler(Alternaria, Aspergillus, Fusarium, Penicillium), maya benzeri olanlar(Candida).

Miselyum meydana getirerek üreyen funguslar kullanıldığında, antifungal aktivite deneylerinde , miselyumun üreme alanı ölçülerek deney sonuçları bulunur. Antifungal maddeler miselyal üremeyi engelleyerek bu alanı negatif yönde etkilerler.

Miselyumların kapladıkları alanın ölçülmesi, dilüsyon yöntemlerinin kullanılması ile kabildir. Bu yüzden bu gruptan funguslar kullanılarak yapılan aktivite tayini deneylerinde daha çok agarlı dilüsyon yöntemi uygulanmaktadır (13,14,18). Diğer taraftan, miselyum meydana getirerek üreyen fungus sporlarının da antifungal aktivite tayini deneylerinde kullanıldığı bazı araştırmalar vardır. Bu araştırmalarda difüzyon yöntemleri kullanılmıştır (5,9,18).

Miselyum meydana getirerek üreyen funguslarla yapılan antifungal aktivite tayin deneylerinde daha çok agarlı dilüsyon yönteminin kullanılması tavsiye edilmektedir(18,28). Bu yöntem daha kısa zamanda sonuç vermesi ve diğerlerine nazaran daha kolay uygulanabilir olması dolayısıyla pek çok araştırmada kullanılmıştır. Bu nedenle araştırmamızda da bu yöntemin kullanılması tercih edilmiştir.

Candida albicans "maya benzeri" funguslardandır. Ürediginde niselyum meydana getirmez, bulunduğu vasatta üreme miktarına bağlı olarak bulanıklık meydana getirir. Bu yüzden, antifungal aktivite tayin deneylerinde bu bulanıklığın şiddetinin veya inhibisyonunun ölçülmesine dayanan yöntemler kullanılmaktadır (1,16,17,25,28). Bunlar dilüsyon, difüzyon ve biyootografi yöntemleridir. Bu yüzden, araştırmamızda C.albicans için her üç yöntem de değişik saponozitler kullanılarak tatbik edilmiştir. C.albicans'ın inokulum konsantrasyonu Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) standardı (2) esas alınarak hazırlanmıştır. Deneylerimizde C.albicans'ın üremesi sonucu meydana gelen bulanıklık, Mc Farland standart nefelometre tüplerinin bulanıklığı ile mukayese edilerek tespit edilmiştir (30).

Araştırmamızda aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır: Dilüsyon yöntemi (tüpte veya petri kutusunda sıvı dilüsyon, agarlı dilüsyon), difüzyon yöntemi (oyuk plak, kağıt disk) ve biyootografi yöntemi (ince tabaka kromatografisine dayanan yöntem). Araştırmamızda kullanılan yöntemlerin seçiminde laboratuvarlarımızın şartlarında uygulanabilirlik ön planda tutulmuştur.

Bu yöntemlerin uygulanmasında F.Kawanagh'ın(16,17), J.R.Norris' in (23), G.C.Ainsworth'un (1) kitaplarından, K.Paeck, M.W.Tracey(28), K.Lee Su, E.J.Staba'nın (29) yayınlarından ana kaynak olarak yararlanılmıştır. Kullanılan yöntemlerde, literatür bulgularına (6) veya çalışmalarımız esnasında ortaya çıkan pratik bilgilere dayanarak bazı değişiklikler yapılmıştır.

Agarlı dilüsyon yönteminin sonuçları gravimetrik (1,23,24), çap ölçümü (11,15,18,26,37) ve alan hesabı (3,9,16,17) yöntemleri ile hesaplanmaktadır. Üç yöntem de araştırmamızda kullanılmış ve bu yöntemleri uygulayan araştırmalardan da pratik çalışmalar sırasında yararlanılmıştır.

Oyuk plak yönteminin uygulanmasında M.Leven ve arkadaşlarının (14) kullandığı yöntem küçük değişikliklerle uygulanmıştır.

Kağıt disk yönteminin uygulanmasında, Dünya Sağlık Teşkilatı'nın (WHO) standardı (2) esas alınmış, ana kaynaklardan da (1,16,17,23,28) ayrıca yararlanılmıştır.

Biyootografi yöntemlerinden sadece ince tabaka kromatografisine dayanan yöntem kullanılmıştır. Deneylerde K. Lee Su, E. J. Staba ve arkadaşlarının (29) kullandıkları yöntem esas alınmış, bazı araştırmacıların yayınlarından da (4, 16, 17, 20, 22, 36) faydalanılmıştır.

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin antifungal aktivitelerinin tayininde kullandığımız yöntemler, funguslar ve sonuçların değerlendirilmesi tablo-7 de gösterilmiştir.

Madde	Funguslar								
	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
G. bicolor Ham Saponoziti	IIa-D	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A
G. arrostii var. nebulosa Ham Saponoziti	IIIa-B	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A
G. perfoliata H. Saponoziti	Ia-D	Ic-A	Ic-B	Ic-B	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A
G. eriocalyx H. Saponoziti	IIb-B	Ib-C	Ib-C	Ib-C	Ib-C	Ib-C	Ib-C	Ib-C	Ib-C
P. pruinosa ssp. pruinosa Ham Saponoziti	Ia-D	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A
S. kotschyi H. Saponoziti	Ia-D	Ic-A	Ic-B	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-A	Ic-B	Ic-A

Kullanılan Antifungal Aktivite Tayin Yöntemleri: ^a Tüpte Sıvı Dilüsyon Y., ^b Petri Kutusunda Sıvı Dilüsyon, ^c Agarlı Dilüsyon, ^{IIa} Oyuk Plak Y., ^{IIb} Kağıt Disk Y., ^{IIIa} İnce Tabaka Kromatografisine Dayanan Yöntem (Biyootografi Y.)
Sonuçların Hesaplanması: ^a Alan Hesabı, ^b Çap Ölçümü
^c Gravimetrik Yöntem, ^d Bulanıklık Ölçülmesi.

Tablo-7

Araştırmamızda Kullanılan Ham Saponozit, Fungus ve Yöntemler

Yöntemlerin uygulanışı ile ilgili ayrıntı, "dilüsyon, difüzyon ve biyotografli yöntemleri" başlıkları altında, dar sütunlar halinde, verilmiştir.

Dilüsyon Yöntemleri

Tüpte Sıvı Dilüsyon Yöntemi

15 ml lik 13 adet steril deney tüpüne değişik konsantrasyonlardaki (0 "Kontrol", 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 $\mu\text{g/ml}$) ham saponozit taşıyan Sabouraud besiyerinden 9.9 ml konur, aynı şekilde üç seri daha hazırlanır.

Serileri meydana getiren her tüp 0.1 ml $3.10^5/$ Candida albicans taşıyan süspansiyon ile inoküle edilir. Tüpler 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda C. albicans'ın üremesi sonucu meydana gelen bulanıklık , Mc Farland standart nefelometre tüplerinin bulanıklığı ile mukayese edilerek değerlendirilir.

Üç serinin aynı konsantrasyonlarından elde edilen sonuçların ortalaması alınır.

Ham Saponozit Taşıyan Sabouraud

Besiyerli Seri Hazırlanması

Sabouraud besiyeri ile hazırlanmış 2000 $\mu\text{g/ml}$ ham saponozit ihtiva eden stok süspansiyondan (A), aşağıda belirtilen miktarlarda alınarak aynı besiyeri ile (B) 100 ml ye bir balon jöjede tamamlanır. Böylece ham saponozit taşıyan Sabouraud besiyeri ana çözeltileri hazırlanmış olur.

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	Kontrol
(A)	40	30	25	20	15	10	5	4	3	2	1	0.5	0
(B)	60	70	75	80	85	90	95	96	97	98	99	99.5	100

Besiyerinin Inokülasyonu : Stok C.albicans süspansiyonunun konsantrasyonu, Mc.Farland standart nefelometre tüpleri ile mukayese edilerek tespit edilir. Stok suştan belli miktarlarda alınıp , serum fizyolojik ile istenilen konsantrasyona seyreltilerek ham saponozitli Sabouraud besiyeri inoküle edilir.

Örnek

Stok C.albicans süspansiyonu mukayese sonucu 30.10^8 Mc.Farland bulanıklığına eşit bulanıklıkta ise bunun 3.10^5 konsantrasyonuna ayarlanması aşağıdaki hesaplama ile yapılır.

30.10^8 stok süspansiyonundan 1 ml alınır, 100 ml ye serum fizyolojik ile tamamlanır. Bu dilüsyonun 0.1 ml sinde 3.10^6 konsantrasyonunda C.albicans bulunur. Bu miktar 9.9 ml ham saponozit taşıyan Sabouraud besiyerine ilave edilince konsantrasyon 3.10^5 olur.

Mc Farland Standart Nefelometre

Tüplerinin Hazırlanması :

10 ml lik 11 adet kapaklı deney tüpü, aşağıda belirtiltiği gibi numaralanır. Baryum klorür ve sülfürik asitin sudaki % 1 lik çözeltileri hazırlanır, aşağıda belirtilen miktarlarda birbiri ile karıştırılır.

<u>Tüp No.</u>	<u>ml % 1 lik BaCl₂</u>	<u>ml % 1 lik H₂SO₄</u>	<u>ml deki Mikroorganizma</u>
0	0.05	9.95	1.5 10 ⁸
1	0.10	9.90	3.0 10 ⁸
2	0.20	9.80	6.0 10 ⁸
3	0.30	9.70	9.0 10 ⁸
4	0.40	9.60	12.0 10 ⁸
5	0.50	9.50	15.0 10 ⁸
6	0.60	9.40	18.0 10 ⁸
7	0.70	9.30	21.0 10 ⁸
8	0.80	9.20	24.0 10 ⁸
9	0.90	9.10	27.0 10 ⁸
10	1.00	9.00	30.0 10 ⁸

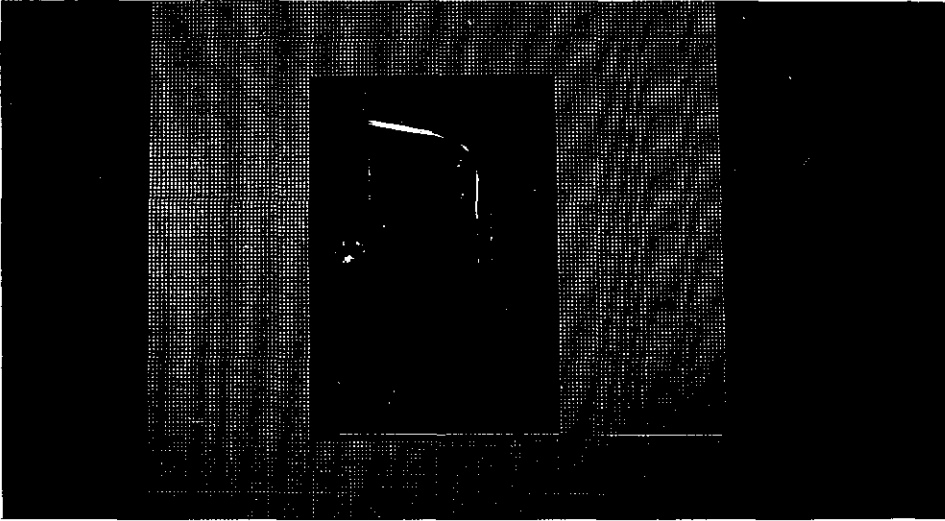
Tüpler çalkalanır, çöken baryum sülfatın süspan-
de olması sağlanır. Her tüp sırası ile tabloda belirtti-
len miktarlarda mikroorganizma/ml ye tekabül eden bula-
nıklık gösterir.

Petri Kutusunda Sıvı Dilüsyon Yöntemi

Deney için önce Sabouraud agar besiyerinde , fun-
gus kültürleri 25°C de iki hafta inkübasyona bırakılır.
Üreme sonucu meydana gelen kültürler inokulum olarak
kullanılır.

8 cm çapındaki 13 adet petri kutusuna 10 ar ml
ham saponozit taşıyan Sabouraud besiyeri konur^a. Aynı
şekilde iki seri daha hazırlanır.

Fungus kültürlerinin kenar kısımlarından 4.4 mm
çapında parçalar ayrılır (Şekil-2,3). Fungus kültürlerin-
den alınan parçaların homojen olması için özel şekilli
cam borular kullanılır (Şekil-1)



Şekil-1

Miselyum Parçası Almada Kullanılan Cam Boru

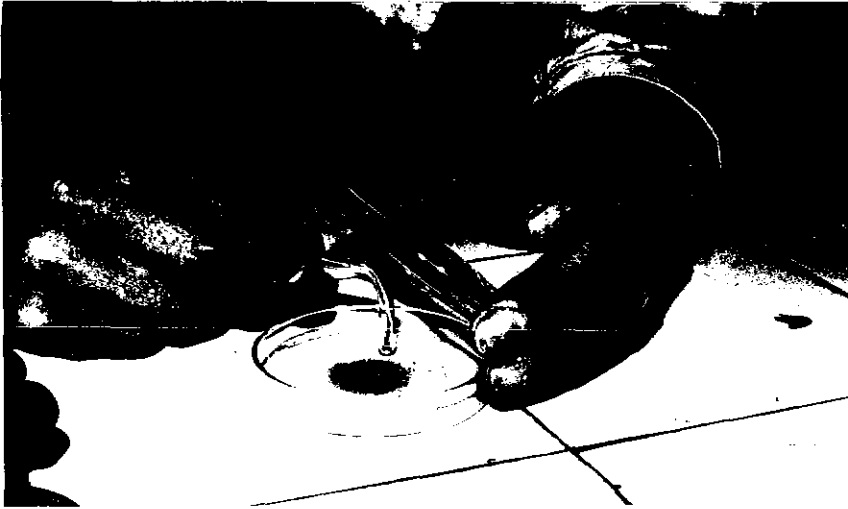
^a. Tüpte sıvı dilüsyon yönteminde hazırlanışı verilmiştir

4.4 mm çapındaki fungus kültürleri daha önce hazırlanmış olan petri kutularındaki besiyerlerinin orta kısımlarına konur(Şekil-4), 25°C de 7 gün inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda, fungusun üremesi sonucu meydana gelen miselyumlar besiyeri ile beraber 8 cm çapındaki Whatman (No 1) süzgeç kağıtları üzerine aktarılır, ikişer defa sıcak distile su ile yıkanır. Kullanılan süzgeç kağıtları daha önceden sabit vezne getirilmiş olmalıdır.

Miselyumları taşıyan süzgeç kağıtları vakum etüvünde, 50°C de, 600 mm Hg negatif basınç altında 48 saat kurutulur, desikatöre alınır.

Miselyumları taşıyan süzgeç kağıtları hassas terazide tartılır. Süzgeç kağıdının darası düşülür ve üreme sonucu meydana gelen kuru miselyum miktarı hesaplanır.

Kontrol için hazırlanan petri kutusundaki üreme % 100 kabul edilerek diğer dilüsyonlardaki üreme % leri a/a üzerinden hesaplanır.



Şekil-2

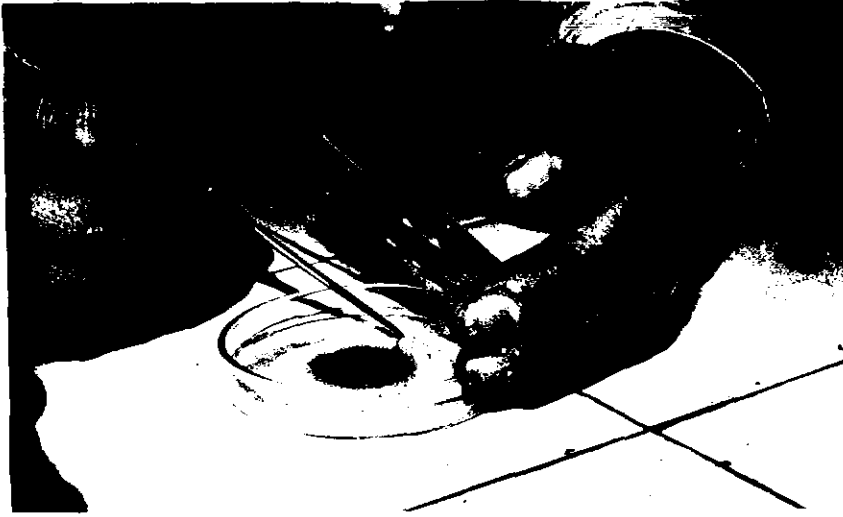
Miselyumdan Parça Alınması

Agarlı Dilüsyon Yöntemi

Ham saponozit taşıyan Sabouraud besiyerine (100 ml lik) 3.5 g toz agar ilave edilir, balon jojeler otoklavda 115°C de 1 atm. basınç altında 15' sterilize edilir, böylece değişik dilüsyonlarda ham saponozit taşıyan Sabouraud agar besiyerleri elde edilmiş olur. Bu besiyerlerinden 8 cm çapındaki petri kutularına 10 ar ml alınır. Besiyerlerinin homojen bir tabaka yapacak şekilde yayılması sağlanır, soğumaya bırakılır.

Bu yöntem uygulanarak 13 lü iki seri daha hazırlanır.

Fungus kültürlerinin ekilmesi, sıvı dilüsyon yönteminde olduğu gibi yapılır (Şekil-2,3,4)



Şekil-3

Miselyumdan Parça Alınması



Şekil-4

Miselyumdan Alınan Parçaların Tatbiki

Inoküle olmuş, ham saponozit taşıyan Sabouraud agar besiyeri 25°C de 7 gün inkübasyona bırakılır. Kullanılan fungusun miselyum meydana getirme özelliklerine göre deneyin devamı aşağıdaki yollardan biri kullanılarak yapılır.

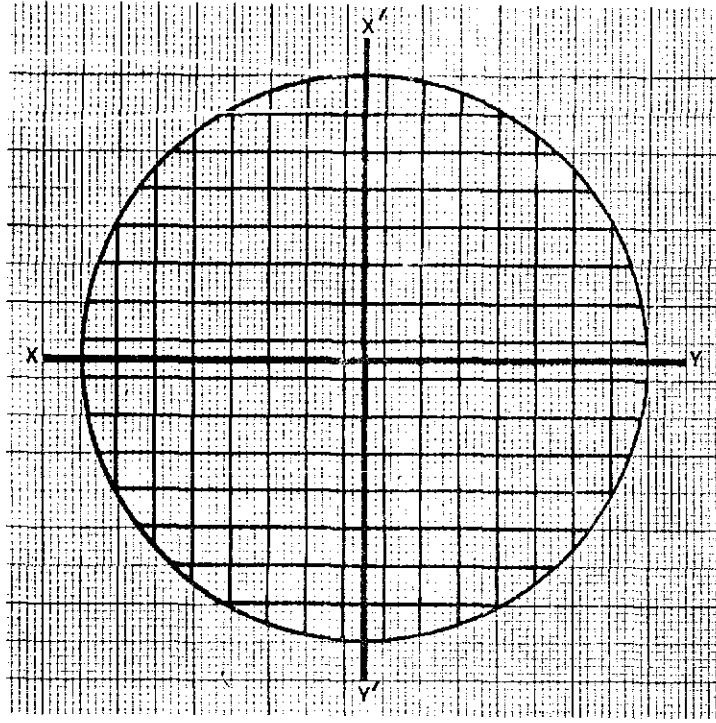
Gravimetrik Ölçüm Yöntemi : Inkübasyon süresi sonunda, fungusun üremesi sonucu meydana gelen miselyumlar besiyerleri ile beraber 10 cm çapındaki Whatman (No 1) süzgeç kağıtları üzerine aktarılır, besiyerinden tamamen kurtuluncaya kadar kaynar distile su ile yıkanır. Kullanılan süzgeç kağıtları daha önce sabit vezne getirilmiş olmalıdır.

Miselyumları taşıyan süzgeç kağıtları vakum etüvünde, 50°C de, 600 mm Hg negatif basınç altında 48 saat kurutulur, desikatöre alınır, hassas terazide tartılır. Süzgeç kağıdının darası düşülür ve üreme sonucu meydana gelen kuru miselyum miktarı hesaplanır.

Kontrol için hazırlanan petri kutusundaki üreme % 100 kabul edilerek diğer dilüsyonlardaki üreme % leri a/a üzerinden hesaplanır.

Çap Ölçümü Yöntemi:Meydana gelen,daire şeklindeki,miselyumların kapladıkları alanın çapı mm cinsinden kompas veya şeffaf bir cetvel ile ölçülür.Kontrol petrisinde meydana gelen miselyumların kapladıkları alanın çapı da aynı şekilde ölçülür, buradaki üreme % 100 kabul edilir,diger dilüsyonlardaki üremelerin çapları,kontroldeki üreme çapı ile mukayese edilerek sonuç % cinsinden hesaplanır.

Alan Hesabı Yöntemi: Üreme sonucu meydana gelen miselyumların kapladıkları alanın şekli,petri kutularının alt yüzünden işaretlenir.Bu şekil asetat kağıdına kopye edilir. Fungusun üreyerek kapladığı alan aşağıdaki şablon kullanılarak hesaplanır.



Şekil-5

Alan Hesabı İçin Kullanılan Şablon

Bu hesaplama sırasında şu hususlara dikkat edilir: Üreme alanının ağırlık merkezi xy ve x'y' eksenlerinin kesiştiği noktaya getirilir, alan içinde kalan tam kareler sayılır, tam olmayan kareler ayrıca sayılır ve yarısı kadar tam kare sayısı hesaba ilave edilir.

Toplam kare sayısı miselyumların kapladığı birim alanı verir.

Kontrol petri kutusundaki üremenin kapladığı alana tekabül eden kare sayısı % 100 kabul edilir ve diğer dilüsyonlardaki üreme % leri hesaplanır.

Difüzyon Yöntemleri

Oyuk Yöntemi

Sabouraud agar besiyeri otoklavda 115°C de 1 atm. basınç altında 15' sterilize edilir. 48°C lik su banyosunda ısı 48°C ye düşünceye kadar bekletilir, üzerine C.albicans'ın stok süspansiyonundan ilave edilir, homojen olarak karışması sağlanır. 25 ml Sabouraud agar besiyeri için ml de $3 \cdot 10^8$ C.albicans taşıyan süspansiyondan 0.05 ml ilave edilir.

C.albicans ile inoküle edilmiş besiyerinden 25 ml alınır, 12 cm çapındaki petri kutularına homojen bir şekilde yayılması sağlanır. Besiyerleri katılaşmaya bırakılır.

Oyukların Hazırlanması: 12 mm çapındaki cam tüplerin ağız kısımları besiyeri üzerine bastırılır, besiyeri kesilir ve bu şekilde her petri kutusuna 12 mm çapında 5 adet oyuk açılır. Oyukların petri kutusunun kenarlarından 2 cm içeride ve birbirlerine eşit uzaklıkta olmaları sağlanır.

Ham Saponozit Taşıyan Sabouraud
Besiyerli Dilüsyonların Tatbiki

Oyuklara tatbik edilecek ham saponozit çözeltileri tüpte sıvı dilüsyon yönteminde bahsedildiği gibi hazırlanır. Her dilüsyondan bir oyuga 0.2 ml tatbik edilir. Böylece bir petri kutusuna 5 değişik dilüsyon uygulanabilir ve bir seri için 3 petri kutusu kullanılır. Hazırlanan seriler 1 saat 4°C de bekletilir, 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılır. Aynı şekilde üç seri daha hazırlanır. Inkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon zonları mm cinsinden kompas ile ölçülür. Aynı dilüsyonların meydana getirdiği inhibisyon zonlarının çaplarının ortalaması alınır, sonuçlar mm cinsinden değerlendirilir.

Kağıt Disk Yöntemi

Mililitresinde 3.10^5 C. albicans taşıyan Sabouraud agar besiyeri 12 cm çapında petri kutularına oyuk yönteminde olduğu gibi yayılır.

Disklerin Hazırlanması: Whatman (No 3) süzgeç kağıtları 5 mm çapında diskler halinde kesilir. Ham saponozitin metanoldeki 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500, 400, 600, 800 ve 800 $\mu g/ml$ konsantrasyonundaki çözeltilere hazırlanır. Diskler bu çözeltilere bir defa batırılır, çıkarılır ve desikatörde kurutulur.

Disklerin Tatbiki: Petri kutularına, disklerden ilk beş dilüsyonda asetatlıp kurutulmuş olan 5 taneş dikkatli bir şekilde besiyeri üzerine tatbik edilir. Aynı şekilde, diğer dilüsyonlarda asetatlıp kurutulmuş olan diğer diskler de tatbik edilir.

Tatbik sırasında disklerin petri kutusunun kenarlarından 1 cm içeride ve birbirlerinden eşit uzaklıkta

olmalarına dikkat edilir. Deney iki paralel ile beraber yapılır. Petri kutuları 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları kompas ile ölçülür, sonuçlar mm cinsinden değerlendirilir.

Biyootografi Yöntemi

İnce Tabaka Kromatografisine Dayanan Yöntem

20x20 cm boyutlarındaki cam plaklar 0.3 mm kalınlığında Silicagel G ile kaplanır, aktive edilir.

Ham saponozitin metanoldeki 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış dilüsyonlarından plağa 0.2 şer ml tatbik edilir. Her plağa en çok dört tatbik yapılmalıdır.

Plaklar n. butanol; izopropanol; asetik asit; su (4:2:1:3) solvan sistemi ile sürüklenir, kendi hallerinde bırakılarak hiçbir koku kalmayınca kadar kurutulur. 20x20 cm lik çerçeveli cam plaklar ml sinde $3 \cdot 10^5$

C. albicans taşıyan Sabouraud agar besiyeri ile 0.3 cm kalınlığında kaplanır, katılaşması beklenir. Üzerlerine aynı ebatlarda kesilmiş Whatman (No 1) süzgeç kağıdı konur, sürüklenen plaklar adsorban iç yüze gelmek üzere süzgeç kağıtlarının üzerine dikkatle kapatılır. Plaklar bu durumda 4°C de 1 saat bekletilir. Adsorbanlı plaklar alınır, besiyerli plaklar 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen inhibisyon alanları işaretlenir.

Bu deney iki paralel ile beraber yapılır.

Diğer taraftan, fazladan bir seri daha hazırlanır ve % 30 luk sülfürik asit ile revele edilerek saponozit lekelerinin yerleri belirlenir. Bu işlem sürüklenmenin düzgün olup olmadığını ortaya çıkarmak bakımından önemlidir.

B U L G U L A R

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin antifungal aktivitelerinin tayini, materyal ve yöntemde, tablo-7 deki fungus ve yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bulgular kısmında bu deneylerin sonuçları tablo ve grafikler halinde verilmiştir.

Miselyal üremelerin kapladığı alan, materyal ve yöntem kısmında belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Bu hesaplamada, kontroldeki miselyal üreme % 100 kabul edilmiş, diğer dilüsyonlardaki miselyal üreme yüzdeleri buna göre hesaplanmıştır.

Miselyal üremenin değerlendirilmesi (+), (-) ve (0) işaretleri ile yapılmıştır. Yüzelere tekabül eden antifungal aktiviteler aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir:

<u>miselyal üreme</u>	<u>antifungal aktivite</u>
% 0-20	++++
%21-40	+++
%41-60	++
%61-85	+
%86-99	-
%100	0

Grafikler, pratik çalışmalar sonucu bulunan % miselyal üreme değerlerinin konsantrasyona karşı eğrilerinin çizilmesi ile hazırlanmıştır. Grafiklerin anlaşılır olmasını sağlamak için funguslar iki gruba ayrılarak eğriler çizilmiştir.

Candida albicans ile yaptığımız çalışmalarda uyguladığımız yöntemler farklı olduğu için, kullanılan yöntem ve sonucu belirleyen esas tablo-7 de ayrıca belirtilmiştir.

Sonuçlarını inhibisyon zonu şeklinde elde ettiğimiz yöntemlerde değerlendirme aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

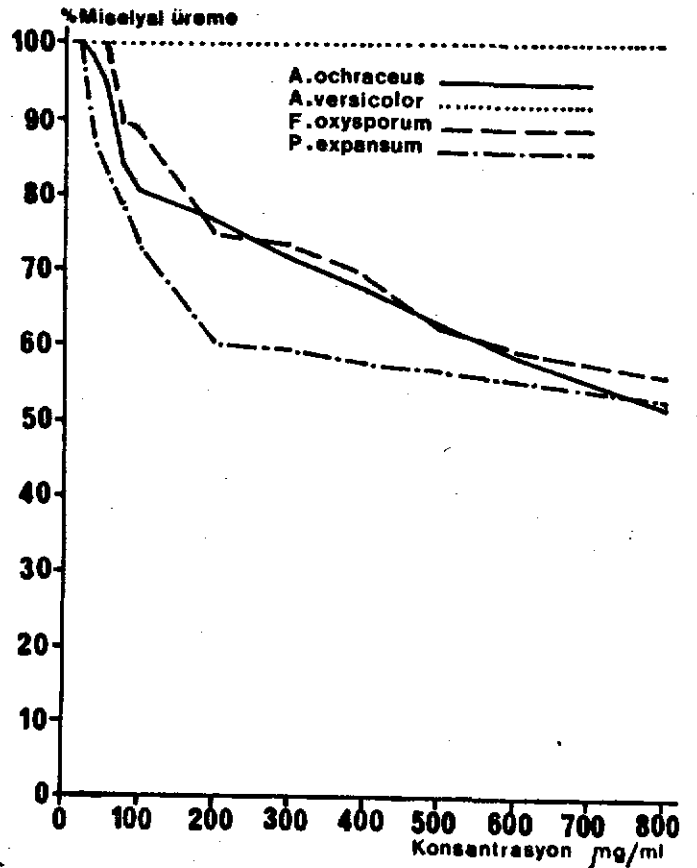
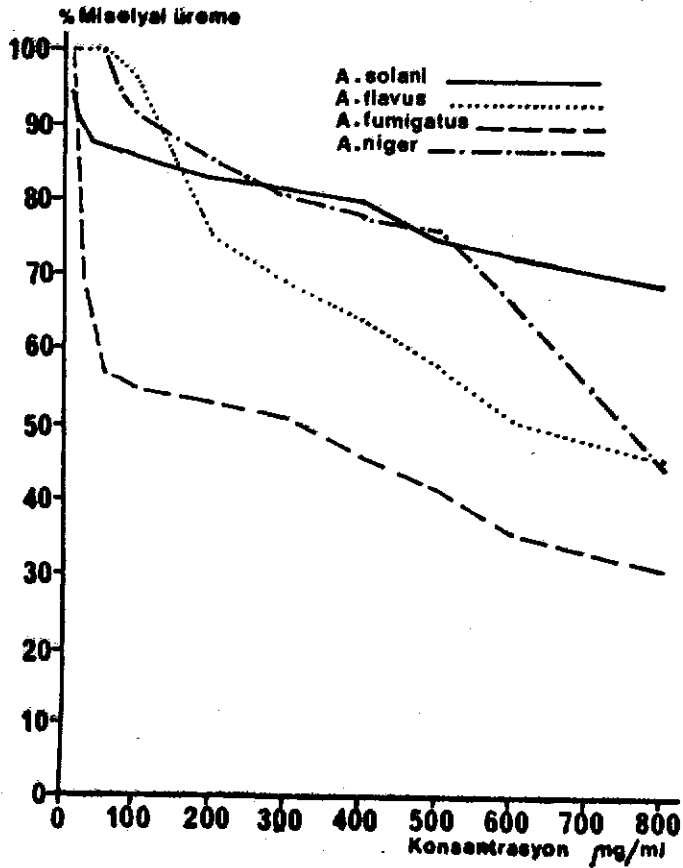
<u>Inhibisyon zonu çapı</u>	<u>Antifungal aktivite</u>
26 mm den fazla	++++
19-25 mm	+++
14-18 mm	++
9-13 mm	+
5-9 mm	-
inhibisyon yok	0

Sıvı dilüsyon yöntemi ile yapılan deneylerde ise sonuçlar Mc Farland standart nefelometre tüplerindeki bulanıklık ile ham saponozit taşıyan besiyerlerindeki C.albicans'ın üremesi sonucu meydana gelen bulanıklığın mukayesesi ile tespit edilmiştir.

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (µg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	0
A. FLAVUS	++	++	++	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0
A. FUMIGATUS	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	0	0
A. NIGER	++	+	+	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0
A. OCHRACEUS	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	0	0	0
A. VERSICOLOR IMI 49124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F. OXYSPORUM	++	++	+	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0
P. EXPANSUM IMI 37767	++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	0	0	0
C. ALBICANS	++++	++++	++++	++++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0

Tablo-8.

G.arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark.
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi

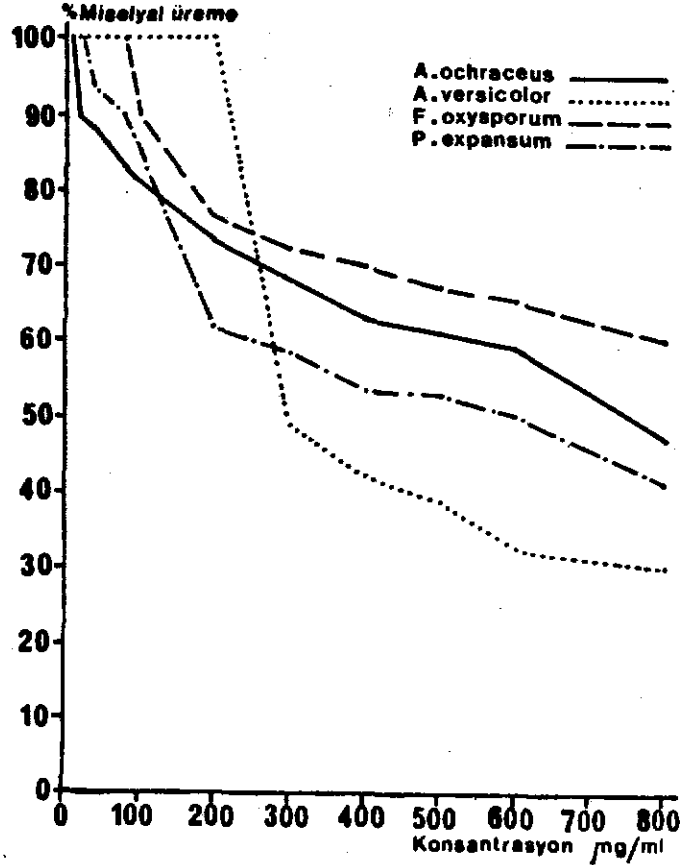
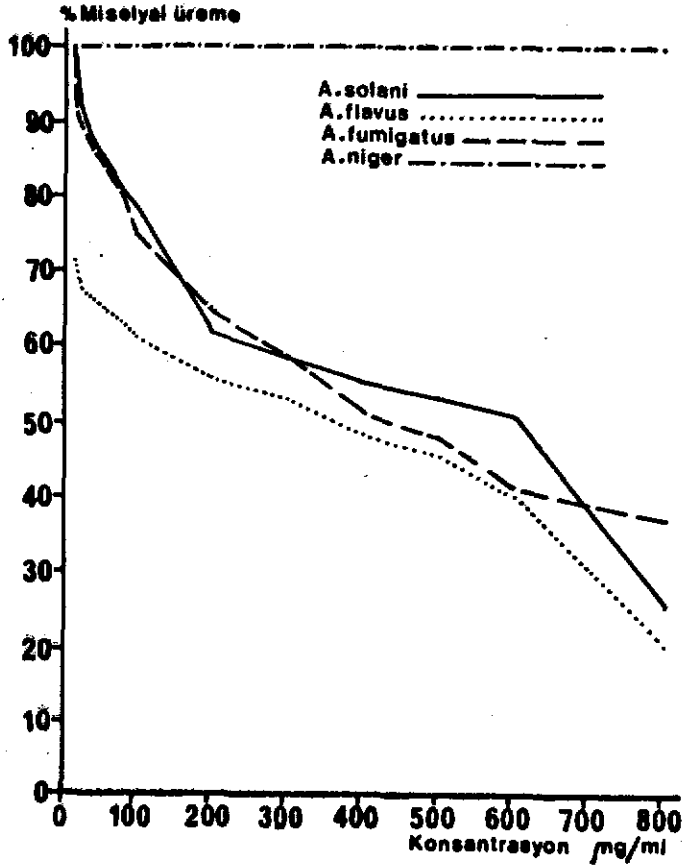


Şekil-6

G.arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.) Bark.
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (µg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	0	0
A. FLAVUS	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	0
A. FUMIGATUS	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	0	0
A. NIGER	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A. OCHRACEUS	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0	0
A. VERSICOLOR (MI 49124)	+++	+++	+++	++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
F. OXYSPORUM	++	+	+	+	+	+	-	0	0	0	0	0	0
P. EXPANSUM (MI 37767)	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	0	0	0
C. ALBICANS	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0	0	0	0	0	0

Tablo-9
G. bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi

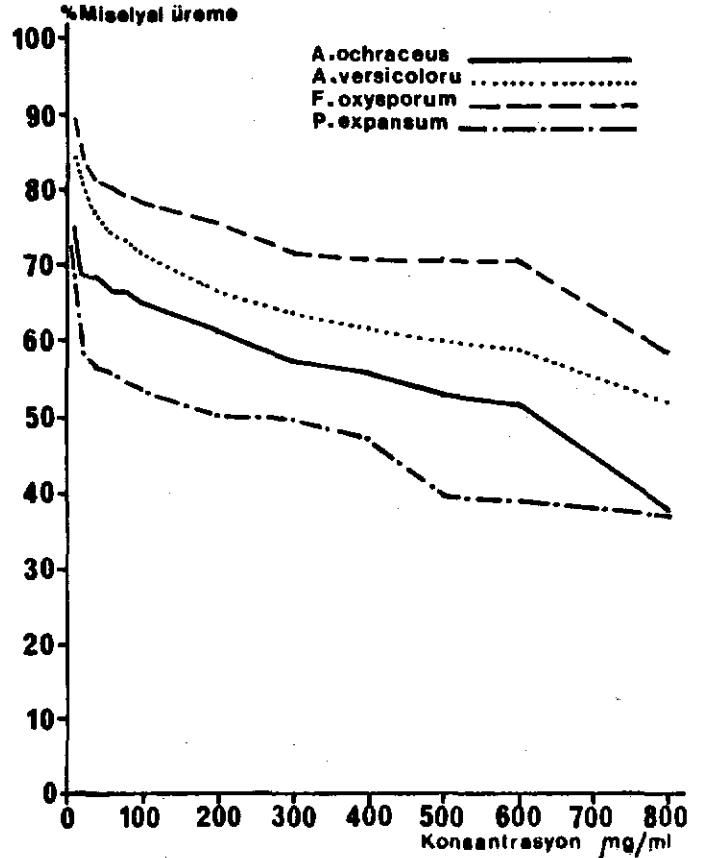
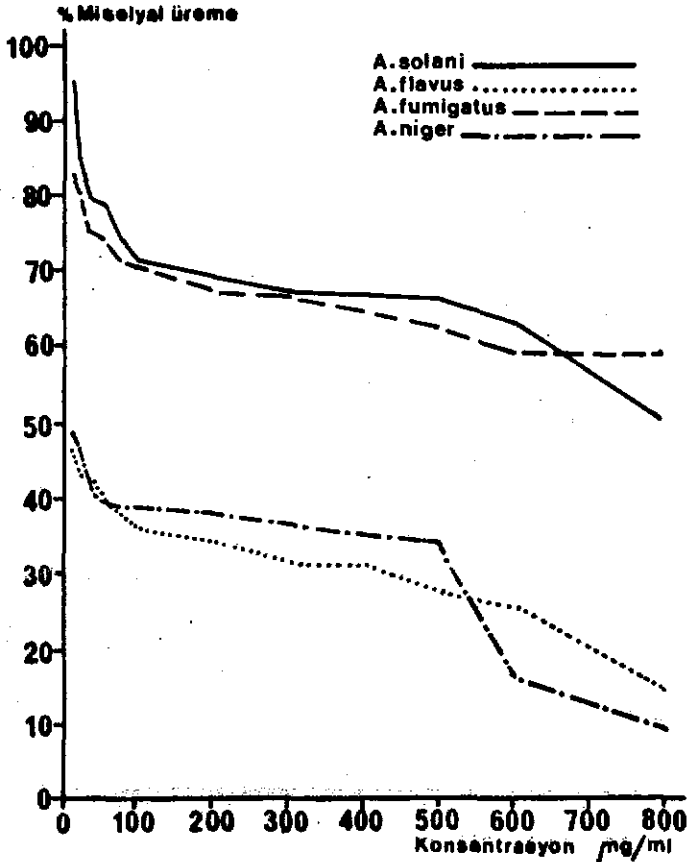


Şekil-7
G. bicolor (Freyn.&Sint.) Grossh.
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (mg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0
A. FLAVUS	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0
A. FUMIGATUS	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
A. NIGER	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	0
A. OCHRACEUS	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	0
A. VERSICOLOR IMI 49124	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
F. OXYSPORUM	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0
P. EXPANSUM IMI 37767	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	0
C. ALBICANS	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo-10

G.eriocalyx Boiss. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi



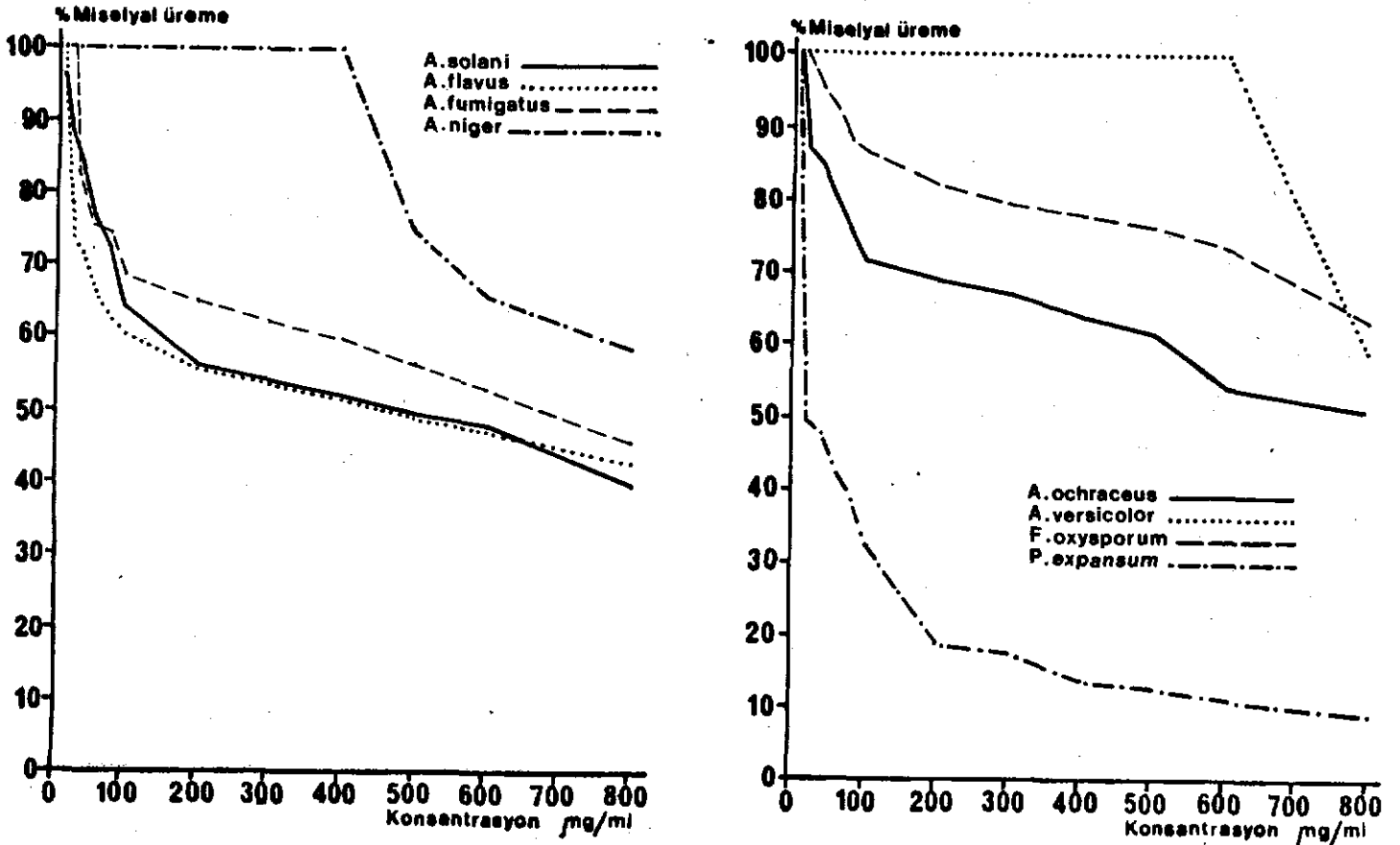
Sekil-8

G.eriocalyx Boiss.

Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafigi

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (mg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	0
A. FLAVUS	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	0	0
A. FUMIGATUS	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	0	0	0
A. NIGER	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A. OCHRACEUS	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0
A. VERSICOLOR IMI 49124	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F. OXYSPORUM	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
P. EXPANSUM IMI 37767	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	++	0	0
C. ALBICANS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

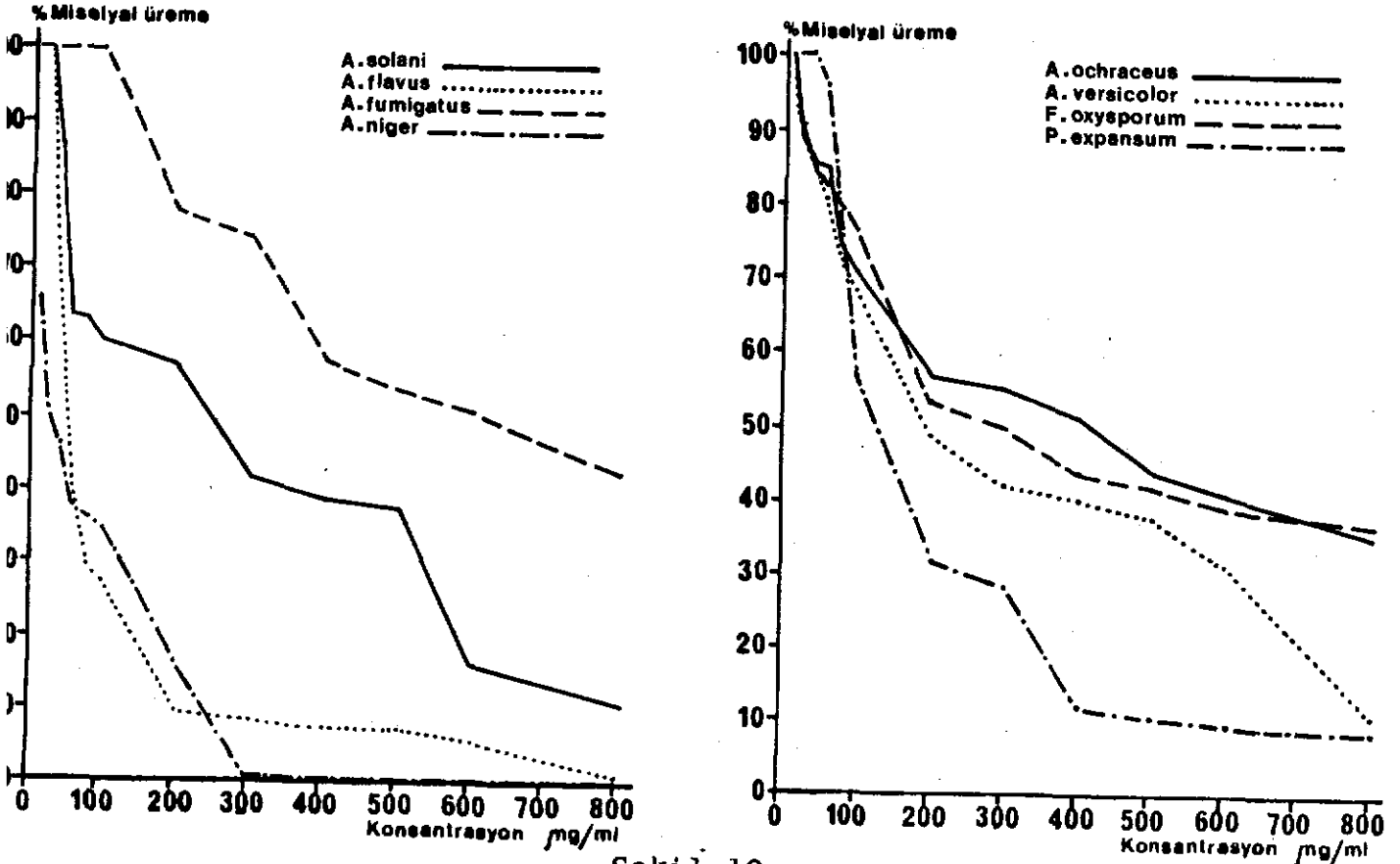
Tablo-11
G.perfoliata L. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi



Şekil-9
G.perfoliata L.
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (µg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	++++	++++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	0	0	0
A. FLAVUS	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	0	0	0
A. FUMIGATUS	++	++	++	++	+	+	0	0	0	0	0	0	0
A. NIGER	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	0
A. OCHRACEUS	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	-	-	0	0
A. VERSICOLOR IMI 49124	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	0	0
F. OXYSPORUM	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	0	0
P. EXPANSUM IMI 37767	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-	0	0	0	0
C. ALBICANS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo-12
P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi

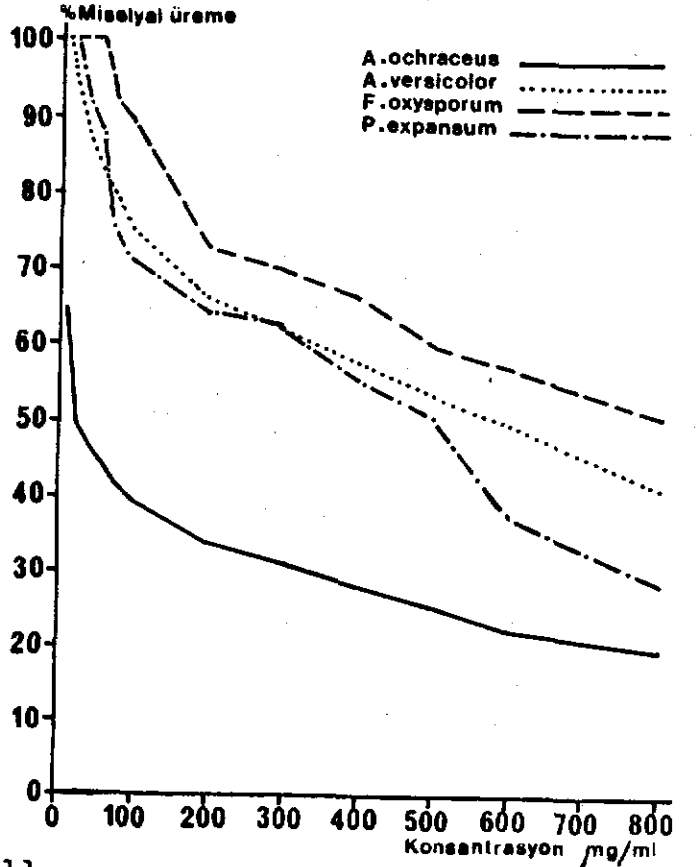
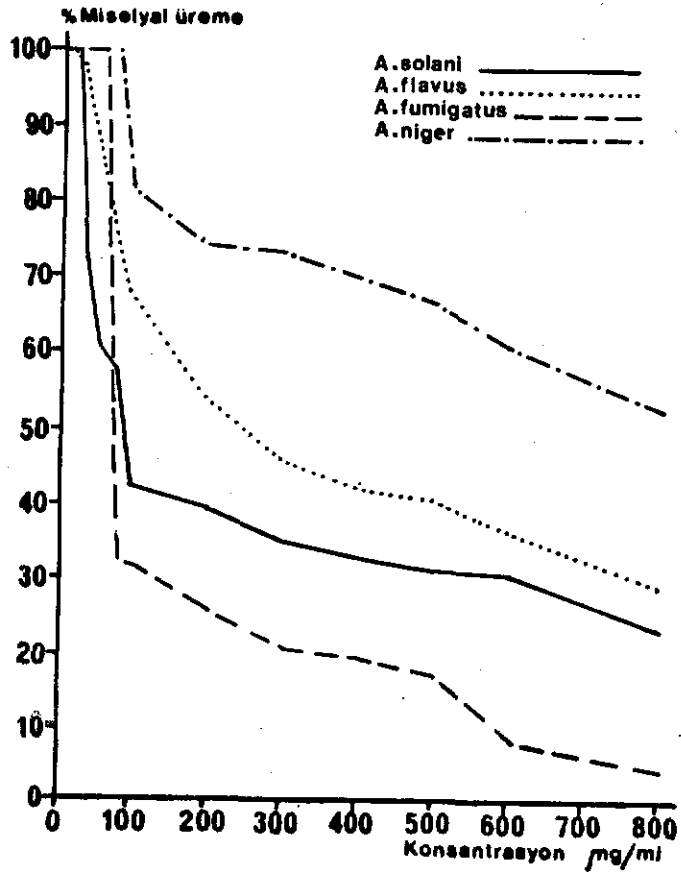


Şekil-10
P. pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen
Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği

FUNGUSLAR	Konsantrasyon (mg/ml)												
	800	600	500	400	300	200	100	80	60	40	20	10	K
A. SOLANI	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	0	0	0
A. FLAVUS	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	0	0	0
A. FUMIGATUS	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0
A. NIGER	++	++	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
A. OCHRACEUS	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	0
A. VERSICOLOR IMI 49124	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	0	0
F. OXYSPORUM	++	++	++	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0
P. EXPANSUM IMI 37767	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	0	0	0
C. ALBICANS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo-13

S. kotschy Boiss. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi



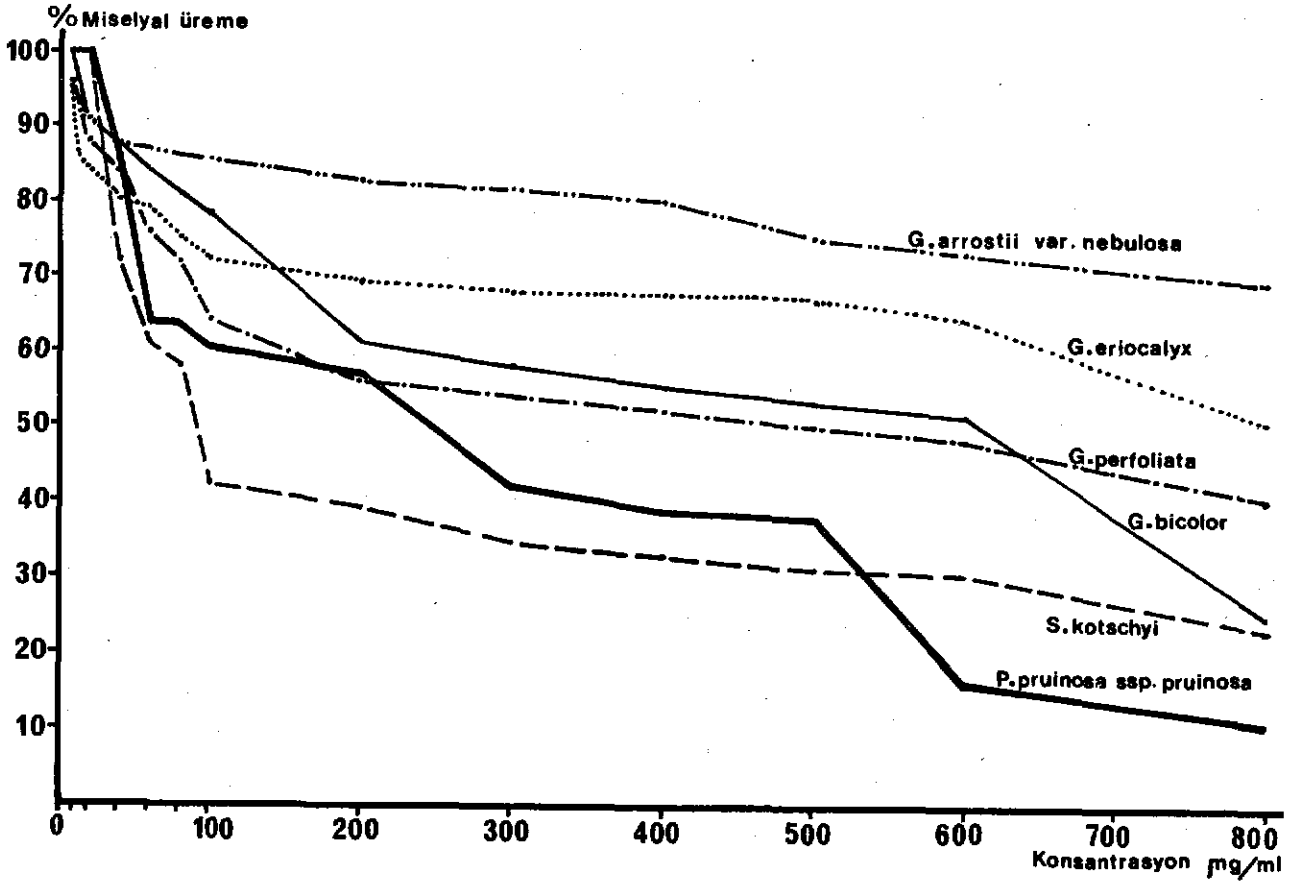
Şekil-11

S. kotschy Boiss.

Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği

S O N U Ç V E T A R T I Ő M A

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin funguslara etkisini gösterebilmek için miselyal büyümenin konsantrasyona karşı grafikleri hazırlanmıştır. Ham saponozitlerin antifungal aktiviteleri bu grafikler yardımı ile tartışılacaktır.

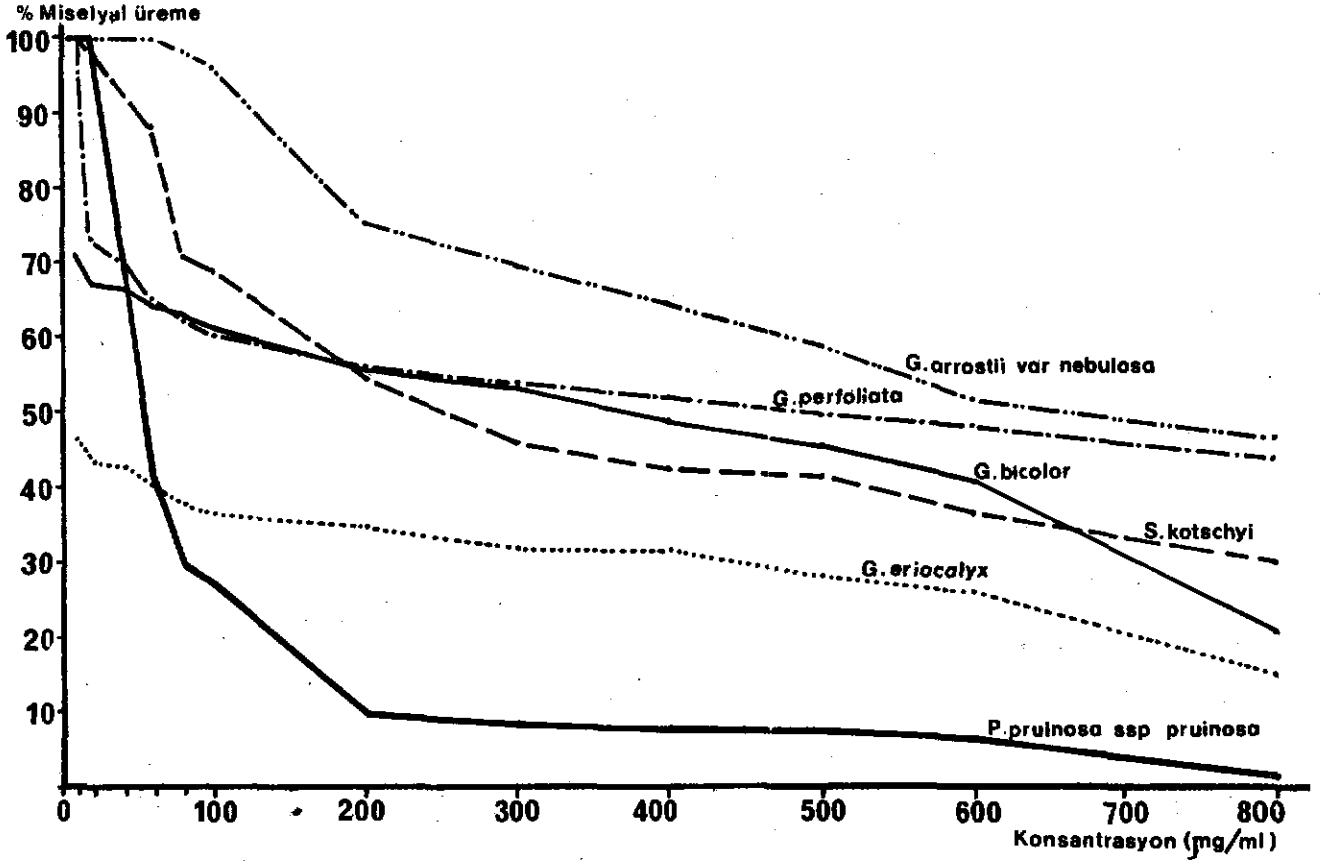


Şekil-12
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A. solani'ye Karşı

Alternaria solani'ye en kararlı etki^a S. kotschyi ham saponozitinde görülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda başlayan fakat kararlı olmayan bir etki de P. pruinosa ssp. pruinosa ham saponozitinde görülmektedir.

^a. Kararlı etki, düşük konsantrasyonlardan başlayıp yüksek konsantrasyonlara kadar benzer şekilde devam eden sürekli etkiyi ifade etmek için kullanılmıştır. Bu genellikle (++, +++, +++) şeklinde sürekli bir etkidir.

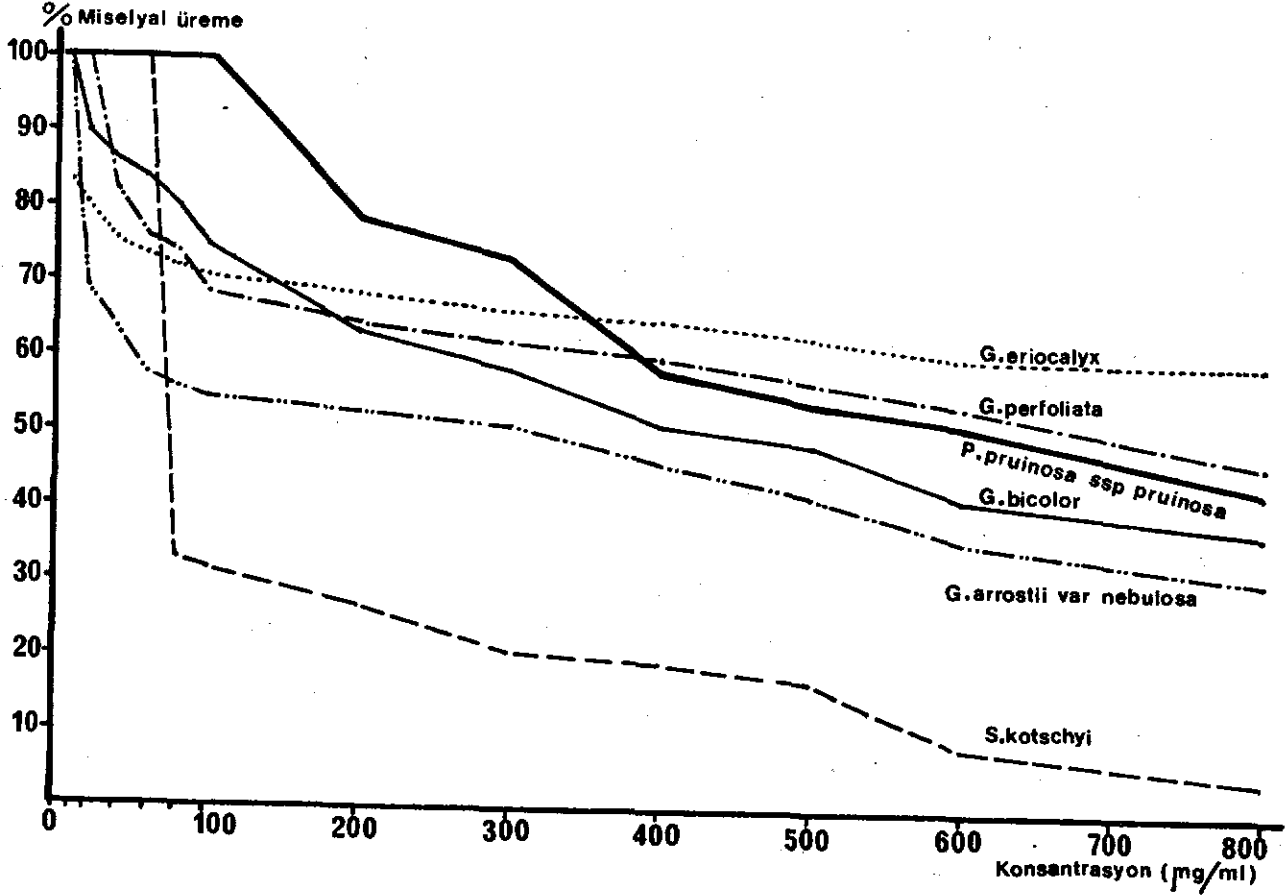
zitinde görülmektedir. G.bicolor ham saponoziti ise ancak yüksek konsantrasyonlarda etkili olmuştur. Diğer ham saponozitlerin A.solani'ye antifungal etkileri zayıftır.



Şekil-13

Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A.flavus'a Karşı

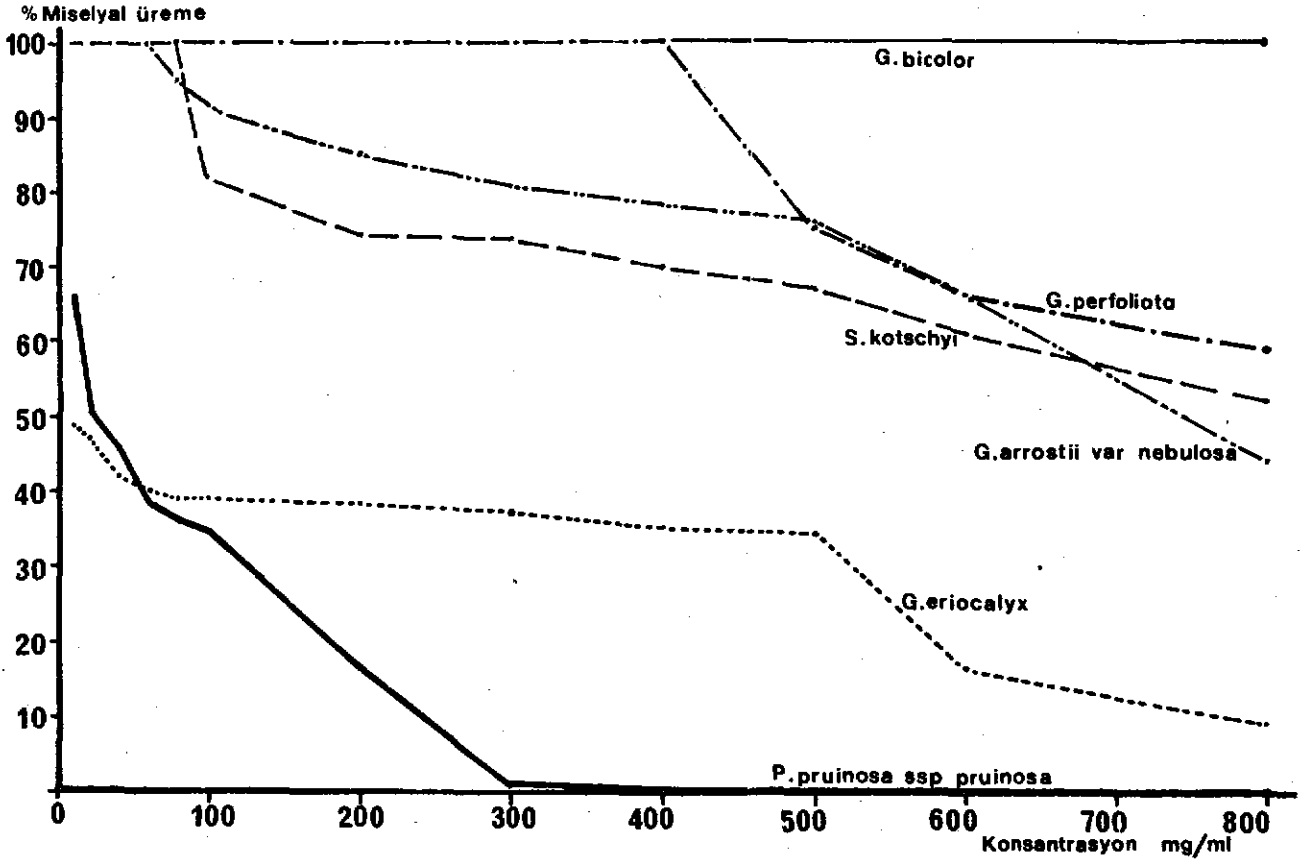
Aspergillus flavus'a en kararlı ve şiddetli etki P.pruinosa ssp. pruinosa ham saponozitinde görülmektedir. G.ariocalyx ham saponozitinin etkisi de kararlılık göstermektedir. S.kotschyi ham saponoziti de A.flavus'a etkili bir ham saponozit olarak düşünülebilir. G.bicolor ham saponoziti ise ancak yüksek konsantrasyonlarda etkili olmaktadır.



Sekil-14

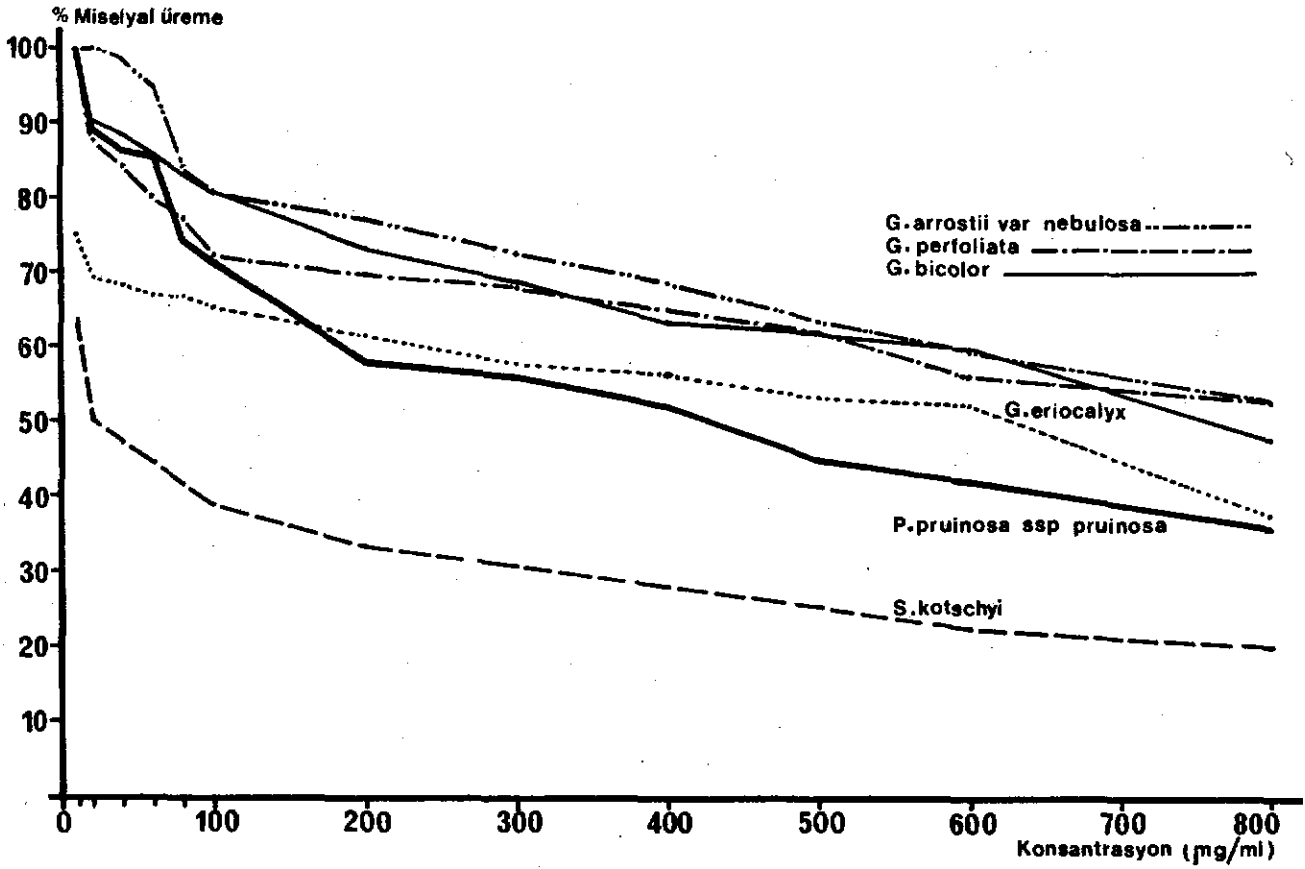
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A. fumigatus'a Karşı

Aspergillus fumigatus'a en kararlı etki S. kotschy ham saponozitine aittir. Diğer taraftan G. arrostii var. nebulosa ham saponozitinin de kararlı sayılabilecek fakat orta şiddette bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.



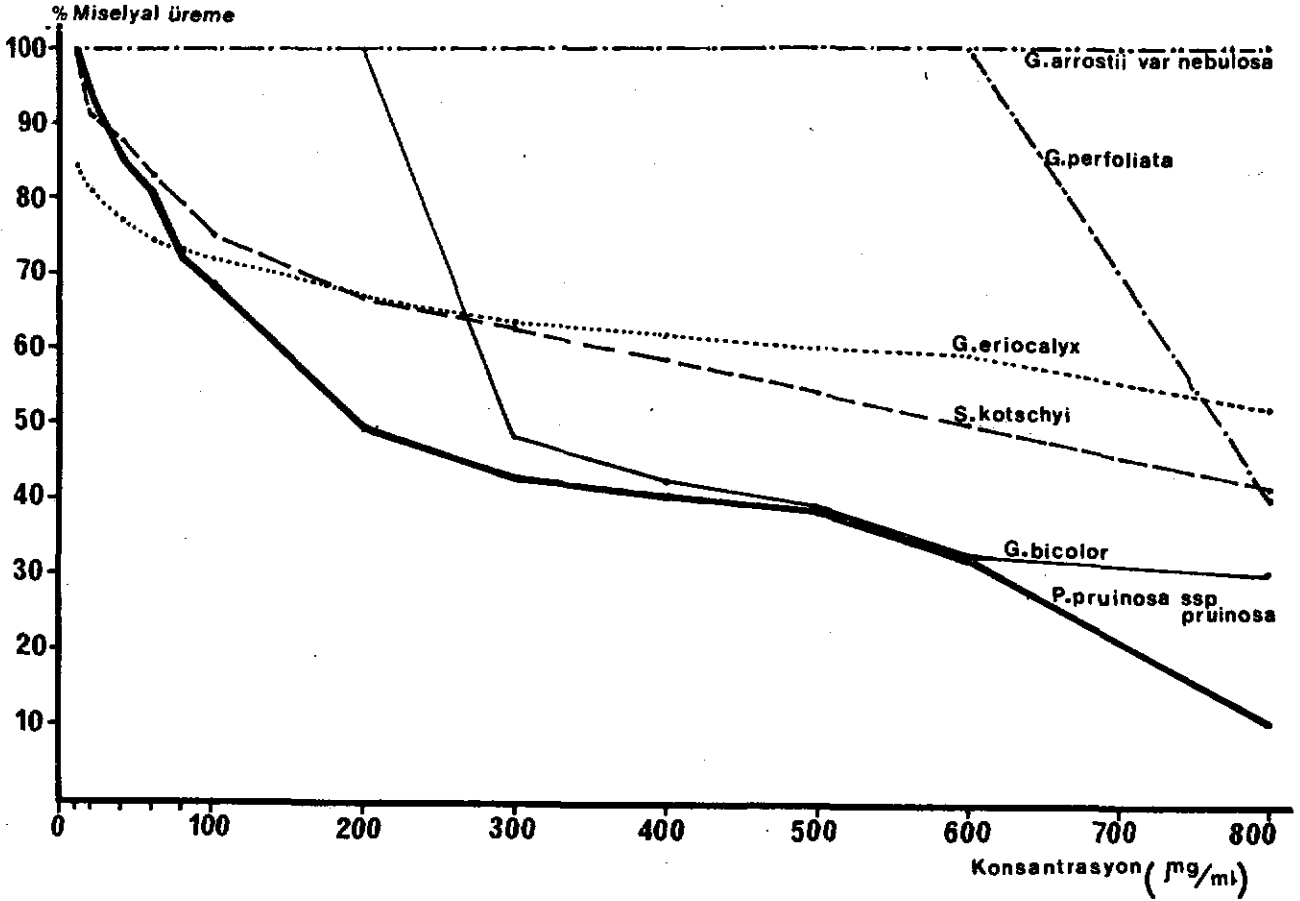
Şekil-15
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A.niger'e Karşı

Aspergillus niger'e en etkili ham saponozit P.pruinosa ssp. pruinosa'dan elde edilen ham saponozittir. G.eriocalyx ham saponozitinin de bu fungusa bariz etkisi bulunmaktadır.



Şekil-16
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A.ochraceus'a Karşı

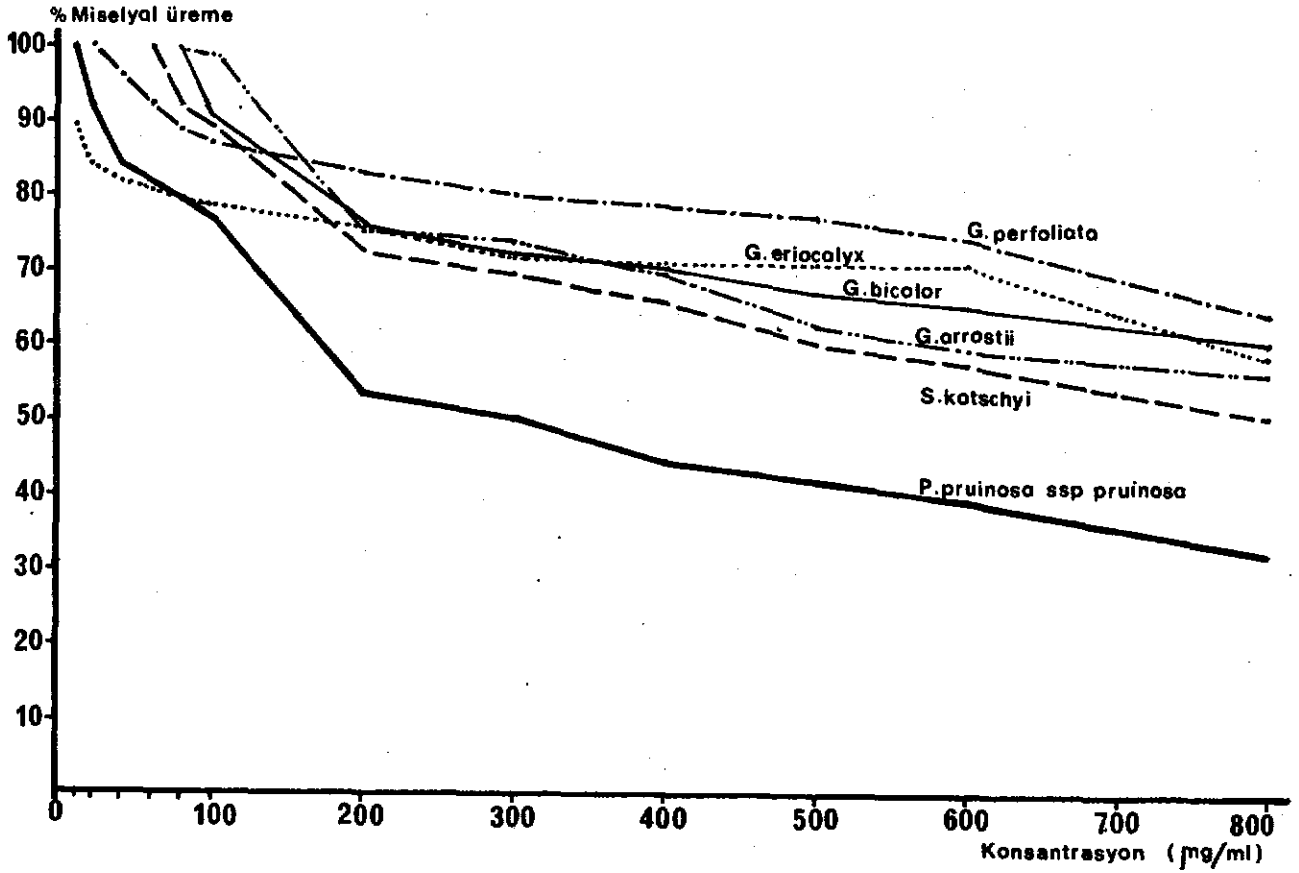
Aspergillus ochraceus'a en kararlı etki S.kotschyi ham saponozitinde görülmektedir. P.pruinosa ssp. pruinosa ve G.eriocalyx ham saponozitlerinin etkileri ise birbirine benzerdir.



Şekil-17

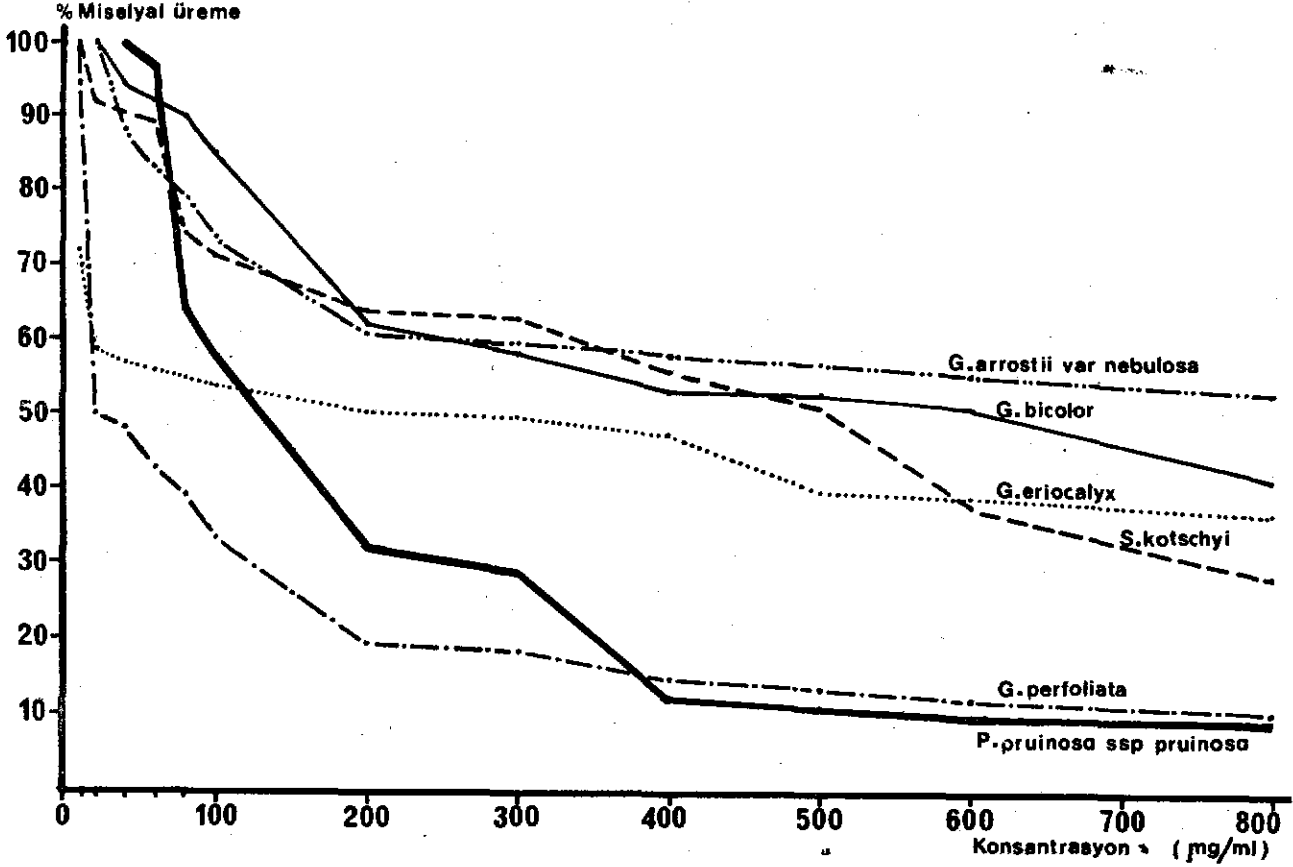
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-A.versicolor'a Karşı

Aspergillus versicolor'a en etkili ham saponozit P.pruinosa ssp.pruinosa dan elde edilendir.Fakat bu etki fazla kararlı görülmemektedir . G.bicolor dan elde edilen ham saponozit ancak yüksek konsantrasyonlarda etkilidir.



Şekil-18
Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-F.oxysporum'a Karşı

Fusarium oxysporum'a kararlı sayılabilecek etki, P.pruinosa ssp. pruinosa dan elde edilen ham saponozit te görülmektedir. Fakat yüksek konsantrasyonlarda bile etki kuvvetli değildir. Diğer Ham saponozitlerin etkileri ise benzer ve düşüktür.



Şekil-19

Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-P.expansum'a Karşı

Penicillium expansum'a en kararlı etki G.perfoliata ham saponozitinde görülmektedir. Diğer taraftan P.pruinosa ssp. pruinosa ham saponozitinin de kararlı sayılabilecek bir etkisi bulunmaktadır. G.eriocalyx ham saponozitinin etkisi de düşük konsantrasyonlarda başlamakta ve kararlı sayılabilecek bir eğri ile devam etmektedir, fakat etki orta şiddettedir.

Candida albicans'a G.bicolor ve G.arrostii var. nebulosa ham saponozitleri etkilidir. Bu etki benzer olup 100-200 µg/ml konsantrasyonları civarından başlayarak yüksek konsantrasyonlara doğru şiddetlenmektedir.

Şekillerde de görüldüğü gibi Polygala pruinosa ssp. pruinosa dan elde edilen ham saponozit , araştırmamızda kullanılan ve miselyum meydana getirerek üreyen fungusların 7/8 ine etkili olmuş ve bu etki de büyük bir kısımda kararlı olmuştur.

Saponaria kotschy 'den elde edilen ham saponozit, araştırmamızda kullanılan fungusların 4/8 üne etkili ve bu etki genellikle kararlı olmuştur.

Gypsophila eriocalyx'in ham saponoziti, araştırmamızda kullanılan fungusların 3/8 üne etkili olmuş ve bu etki bir tanesinde kararlılık göstermiştir.

Gypsophila bicolor ve Gypsophila arrostii var. nebulosa ham saponozitleri, miselyum meydana getirerek üreyen funguslarda daha çok yüksek konsantrasyonlarda, Candida albicans'a ise 100-200 µg/ml konsantrasyonlarından itibaren etkili olmuşlardır.

Araştırmamızın bir başka gayesi de, ham saponozitlerin antifungal aktivitelerinin tayininde kullanılan değişik yöntemleri uygulamak ve bunlar arasından, ilerdeki çalışmalarımızda, laboratuvar şartlarımıza uygun, kullanılabilecek yöntemlerin seçimini sağlamaktır.

Araştırmamızda bu gayeye ulaşmak için, saponozitlerin antifungal aktivite tayininde kullanılan yöntemlerden silindirik tabaka yöntemi hariç^a hepsi denenmiştir.

Miselyum meydana getirerek üreyen fungus türlerinde, genellikle agarlı dilüsyon, oyuk ve silindirik tabaka yöntemleri kullanılmaktadır. Silindirik tabaka ve oyuk yöntemi fungusların sporları kullanılarak yapılmaktadır. Çalışmamızda miselyumlar kullanıldığı için agarlı dilüsyon yöntemi seçilmiş ve tatbik edilmiştir.

a. Silindirik tabaka yöntemi, Bilim Dalımızda, antibiyotik aktivite tayini için devamlı kullanılmaktadır. Bu yüzden çalışmamız sırasında kullanılmamıştır.

Penicillium türleri , saponozitlerin antifungal aktivite tayininde nadiren kullanılmaktadır. Penicillium expansum , araştırmamızda, antifungal aktivite tayini deneyleri için kullanılacak bir fungus olarak dikkatimizi çekmiştir.

Miselyum meydana getirerek üreyen funguslar için agarlı dilüsyon yönteminin yanı sıra Gypsophila eriocalyx ham saponoziti için sıvı dilüsyon yöntemi de uygulanmıştır. Bu yöntemin sonuçları gravimetrik yolla hesaplandığı için daha uzun zaman almakta ve hata yapma oranı yüksek olmaktadır. Bu yüzden tavsiye edilir bir yöntem olarak görülmemiştir.

Candida albicans için araştırmamızda dört yöntem uygulanmıştır: Tüpte sıvı dilüsyon, kağıt disk, oyuk ve ince tabaka kromatografisine dayanan yöntem. Araştırmamız sonucunda bu yöntemlerden en iyi sonuç veren ve tekrarlanabilirliği fazla olanın oyuk yöntemi olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitler içinde, miselyum meydana getirerek üreyen funguslara en fazla etkiye sahip olan Polygala pruinosa ssp. pruinosa'dan elde edilmiş ham saponozittir.

Saponaria kotschyi ve Gypsophila eriocalyx ham saponozitleri de orta şiddetli antifungal etkiye sahiptirler. Candida albicans'a ise Gypsophila bicolor ve Gypsophila arrostii var. nebulosa dan elde edilen ham saponozitler etkili bulunmuştur.

Araştırmamızda kullanılan ham saponozitlerin elde edildiği türlerin kesin olarak belli olması, daha önce "Gypsophila saponin"i üzerinde yapılan araştırmalardan (31,32,33,34,35,36) çalışmamızı ayıran en önemli husustur.

Araştırmamızda kullandığımız türler arasında antifungal aktivite farklılıklarının bulunması da ilerideki araştırmaları yönlendirmek bakımından önemlidir.

Daha önce araştırılan Polygala türlerinin fungusit ve fungus-tatik etkiye sahip olmaları (32) ve araştırmamızda en yüksek antifungal aktiviteye Polygala pruinosa ssp. pruinosa ham saponozitinin sahip olması ,Polygalaların antifungal aktivite bakımından önemli türler olduğunu doğrulamaktadır.

Saponaria türlerinden sadece S.officinalis ham saponoziti üzerinde yapılan araştırmada (32), muhtelif funguslara fungusit, fungustatik ve kısmi tesire sahip olduğu belirlenmiştir.

Araştırmamızda Saponaria kotschyi' nin ham saponozitinin bilhassa Aspergillus türlerine antifungal olarak etkisinin bulunduğu ortaya çıkmıştır.

Diğer taraftan, miselyum meydana getirerek üreyen funguslar kullanılarak yapılacak çalışmalarda agarlı dilüsyon ; maya benzeri funguslar ile yapılacak çalışmalarda ise oyuk yönteminin laboratuvarlarımızda, daha ilerde yapılacak araştırmalarda, kullanılabilir uygun yöntemler olduğu tespit edilmiştir.

Ö Z E T

Bilim Dalımızda, daha önce yapılan araştırmalar sonucunda Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss.&Heldr.)Bark., Gypsophila bicolor (Freyn.&Sint.)Grossh.,Gypsophila eriocalyx Boiss., Gypsophila perfoliata L.,Polygala pruinosa Boiss.ssp. pruinosa J.Cullen ve Saponaria kotschyi Boiss! e ait ham saponozitler elde edilmiş ve bu araştırmada antifungal aktiviteleri tayin edilmiştir.

Araştırmada şu funguslar kullanılmıştır :(Miselyum yaparak üreyenlerden) Alternaria solani, Aspergillus flavus,Aspergillus fumigatus,Aspergillus niger,Aspergillus ochraceus,Aspergillus versicolor İMİ 49124, Fusarium oxysporum ve Penicillium expansum İMİ 37767,(maya benzeri) Candida albicans.

Antifungal aktivite tayinleri dilüsyon(tüpte ve petri kutusunda sıvı dilüsyon,agarlı dilüsyon yöntemleri),difüzyon(kağıt disk ,oyuk yöntemleri) ve biyootografi (ince tabaka kromatografisine dayanan yöntem) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

Araştırmamız sonunda, G.arrostii Guss. var. nebulosa(Boiss., &Heldr.) Bark. ve G.bicolor(Freyn.&Sint.)Grossh.'dan elde edilen ham saponozitlerin , miselyum meydana getirerek üreyen funguslara yüksek konsantrasyonlarda,C.albicans'a ise 100-200 μ g/ml konsantrasyonlardan itibaren etkili oldukları görülmüştür.

G.eriocalyx Boiss.den elde edilen ham saponozit, araştırma-
mızda kullandığımız fungusların 3/8 ünde antifungal aktivite gös-
termiştir.

G.perfoliata L. ham saponoziti ise sadece *Penicillium ex-*
pansum'a antifungal etki göstermiştir.

S.kotschyi Boiss.'den elde edilen ham saponozit, kullandığı-
mız fungusların 4/8 ünde miselyal üremeyi kararlı bir şekilde in-
hibe etmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız ham saponozitlerden en kararlı
ve yüksek antifungal aktiviteyi ise *P.pruinosa* Boiss. ssp.*pruinosa*
dan elde edilen ham saponozit göstermiştir.Bu ham saponozit kul-
landığımız fungusların 7/8 sine kararlı bir şekilde etki etmiştir.

Diğer taraftan, araştırmamız sonucunda, miselyum meydana ge-
tirerek üreyen funguslar kullanılarak yapılacak çalışmalarda
agarlı dilüsyon, maya benzeri funguslar kullanılarak yapılacak
Çalışmalarda ise oyuk yönteminin laboratuvarlarımızda ileride
yapılacak çalışmalarda kullanılabilir, uygun yöntemler olduğu
tespit edilmiştir.

S U M M A R Y

In this study, the antifungal activities of crude saponins, isolated early in different researches achieved in our department, from (the plants) Gypsophila arrostii Guss. var. nebulosa (Boiss. & Heldr.) Bark., Gypsophila bicolor (Freyn. & Sint.) Grossh., Gypsophila eriocalyx Boiss., Gypsophila perfoliata L., Polygala pruinosa Boiss. ssp. pruinosa J. Cullen and Saponaria kotschyi Boiss. are determined.

The fungi used, in this study, are cited below; Candida albicans (yeast-like fungi) ; Alternaria solani, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus ochraceus, Aspergillus versicolor IMI 49124, Fusarium oxysporum, and Penicillium expansum IMI 37767 (filamentous fungi).

The antifungal activities were determined by applying dilution (broth serial tube dilution, dilution in petri dishes, dilution in solid media), diffusion (hole-plate and filter paper disc methods) and bioautographic (which depends on TLC) methods.

According to the results obtained, the crude saponins isolated from G. arrostii var. nebulosa and G. bicolor were active in higher concentrations to filamentous fungi and in 100-200 µg/ml concentrations to C. albicans.

The crude saponin of G. perfoliata was active only to Penicillium expansum.

The crude saponin isolated from S. kotschyi constantly inhibited the mycelial growth of the 4/8 fungi used.

The crude saponin of P. pruinosa ssp. pruinosa gave the most stable results and showed the highest antifungal activity. This crude saponin was constantly active to 7/8 of the fungi used.

On the other hand, it was found out that for future researches with filamentous fungi, the dilution in solid media method, and with yeast-like fungi, hole-plate diffusion method were the most convenient methods for our circumstances.

L I T E R A T U R

1. Ainsworth, G.C., *The Fungi*, Cilt I, Academic Press, New York (1965).
2. Anonymus, Standardisation of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests, *Wld.Hlth.Org.techn.Ser.*, 210 (1961).
3. Assa, Y., Gestetner, B., Chet, I., Henis, Y., Fungustatic Activity of Lucern Saponins and Digitonin as Related to Sterols, *Life Sci.*, 11, 637(1972).
4. Aszolas, A., Davis, S., Frost, D., Classification of Crude Antibiotics by Instant Thin-Layer Chromatography, *J.Chromatog.*, 37, 487(1968).
5. Azarowicz, E.N., Hughes, J.E., Perkins, C.L., Antibiotics in Plants of Southern California Active Against *Mycobacterium tuberculosis* 607 and *Aspergillus niger*, *Antibiotics and Chemotherapy*, 2, 532(1952).
6. Carlson, H.J., Douglas, H.G., Screening Methods for Determining Antibiotic Activity of Higher Plants, *J.Bacteriol.*, 55, 235(1948).
7. Davis, B.D., Dulbecco, R., *Microbiology*, Hoeber Medical Div. New York (1970).
8. Defago, G., Rôle des Saponines dans la Resistance des Plantes aux Maladies Fongiques, *Ber.Schweiz.Bot.Ges.*, 87, 79(1977).

9. Desvignes, A., Leluan, G., Dupeyron, C., Mise au Point d'une Methode de Determination des Activités Antifongiques in Vitro vis-à-vis d'une Souche de Dermatophyte, Annales Pharmaceutiques Française, 37, 65(1979).
10. Gestetner, B., Assa, Y., Henis, Y. Yehudith, B., Bondi, A., Lucern Saponins. IV, Relationship between their Chemical Constitution and Haemolytic and Antifungal Activities, J. Sci. Fd. Agric., 22, 168 (1971).
11. Güven, K. C., Güler, E., Studies on Pterocladia capillacea (Gmel.) Born. et Thur., Part II, Pharmacological, Antibacterial and Antifungal Investigations, Hoppe, H. A., Levring, T., Tanaka, Y., Marine Algae in Pharmaceutical Science, Walter de Grueter, New York (1979).
12. Hiller, K., Friedrich, E., Zur antimykotischen Wirkung von Astrantia-, Eryngium- und Saniculasaponinen, Pharmazie, 29, 787(1973).
13. Honda, G., Tabata, M., Isolation of Antifungal Principle Tryptanthrin from Strobilanthes Cusio O. Kuntze, Planta Med., 36, 85(1979).
14. Idem, The antimicrobial Specificity of Tryptanthrin, Planta Med., 37, 172(1979).
15. Horber, E., Leath, K. T., Berrang, B., Marcarian, V., Hanson, C. H., Biological Activities of Saponin Components from DuPuits and Lahontan Alfalfa., Ent. exp. and appl., 17, 410(1974).
16. Kavanagh, F., Analytical Microbiology, Cilt I, Academic Press. New York (1963).
17. Idem, ibid, Cilt II, Academic Press. New York (1972).

18. Leven, M., Berghe, D.A.V., Mertens, F., Vlietinck, A., Lammens, E., Screening of Higher Plants for Biological Activities I. Antimicrobial Activity, *Planta Med.*, 36, 311(1979).
19. Margineanu, C., Cuçu, V., Grecu, L., Pârvu, C., Die anticandida Wirkung Der Primula Saponine, *Planta Med.*, 30, 35(1976).
20. Meyers, E., Smith, D.A., Bioautography of Antibiotic Spread-layer Chromatograms, *J. Chromatog.*, 14, 126(1964).
21. Moss, E.S., Mc Quown, A.L., Atlas of Medicinal Mycology, The Williams and Wilkins Co., Baltimore(1969).
22. Narasimhachari, N., Ramachandran, S., A Simple Bioautographic Technique for Identifying Biologically Active Material on Thin-layer Chromatograms, *J. Chromatog.*, 27, 494(1967).
23. Norris, J.R., Ribbons, D.W., Methods in Microbiology, Cilt I, Academic Press. New York (1969).
24. Olsen, R.A., Triterpenglycosides as Inhibitors of Fungal Growth and Metabolism, *Physiol. Plan.*, 24, 534(1971).
25. Pawlik, B., Kurasz, H.A., A Diffusion Method as Applied for Determining the Sensitivity of Yeast-like Fungi to Chemotherapeutics, *Med. Dosw. Mikrobiol.*, 30, 173(1978).
26. Pedersen, M.W., Zimmer, D.E., Anderson, J.O., Mc Guire, C.F., A Comparison of Saponins from DuPuits, Lahontan, Ranger and Uinta Alfalfas, *Crop. Sci.*, 7, 349(1967).
27. Schlösser, E., Rôle of Saponins in Antifungal Resistance, II. The Hederasaponins in Leaves of English Ivy (*Hedera helix* L.), *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 80, 11(1973).
28. Skinner, F.A., Antibiotics, Paech, K., Tracey, M.V., Modern Methods of Plant Analysis, Cilt III, Springer-Verlag, Berlin (1955).

29. Su, K.L., Staba, E.J., Abul-Hajj, Y., Aquatic Plants from Minnesota, III. Antimicrobial Effects, Water Resources Research Center, University of Minnesota, Minneapolis (1972).
30. Swatek, F.E., Laboratory Manual and Workbook for General Microbiology, The C.V. Mosby Comp., London (1969).
31. Tschesche, R., Wulff, G., Über die Antimikrobielle Wirksamkeit von Saponinen, Z. Naturforschg., 20, 543 (1965).
32. Wolters, B., Die Verbreitung Antibiotischer Eigenschaften bei Saponindrogen, Deutsche Apoth. Zeitung., 106, 1729 (1966).
33. Idem., Die Wirkung Einiger Triterpen-Saponine auf Pilze, Naturwissenschaften., 53, 253 (1966).
34. Idem., Zur Antimikrobiellen Wirksamkeit Pflanzlicher Steroide und Triterpene, Planta Med., 14, 391 (1966).
35. Idem., Saponine als Pflanzliche Pilzabwehrstoff, Planta(berl.), 79, 77 (1968).
36. Idem., Zur Verwendung Vobeschichteter Folien bei der Dünnschicht-Chromatographischen Untersuchung Pflanzlicher Fungustatica, Planta Med., 17, 42 (1969).
37. Zimmer, D.E., Pedersen, M.W., Mc Guire, C.F., A Bioassay for Alfalfa Saponins Using the Fungus *Trichoderma viride*. Pers. ex. Fr., Crop Sci., 7, 223 (1967).

E K L E R

E K L E R

1) Sabouraud Besiyerinin Hazırlanması

Dekstroz^a 40.0 g
Pepton^b 10.0 g
Distile su 1000 ml

Maddelerin çözünmesi için, karışım su banyosunda arasına çalkalanarak, ısıtılır. Otoklavda sterilize edilir, petri kutularına aseptik teknik ile gerekli miktarlarda ilave edilir.

Sabouraud agar besiyeri elde etmek için, sterilizasyondan önce , besiyerine % 3.5 oranında agar^c ilave edilir(21).

2) Sterilizasyon

Kullanılan cam ve metalik malzemeler bir dezenfektan^d ile yıkanır, su ve daha sonra distile su ile iyice durulanır, etüvde 180°C de 2 saat kuru hava sterilizasyonuna tabi tutulur.

Bankoların dezenfeksiyonu % 5 lik fenol ile yapılır(7). Ham saponozit taşıyan besiyerlerinin sterilizasyonu, literatür verilerine (27) ve ön denemelerimizde elde ettiğimiz bulgulara dayanılarak 115°C de 1 atm. basınç altında 15' da yapılmıştır.

a. Dextrose U.S.P Stock No 1-163-000, Chemo Puro MFG Corp.,
b. Neutralised Bacteriological Peptone, Cd.No 134, OXOID Ltd.
c. Bacto-Agar, Serie 0140-01, DIFCO Lab.,
d. Cetavlon, Imperial Cemical Ind.Ltd.

I N D E K S L E R

Şekiller

Sayfa No.

Şekil- 1.	Miselyum Parçası Almada Kullanılan Cam Boru	22
2.	Miselyumdan Parça Alınması	23
3.	Miselyumdan Parça Alınması	24
4.	Miselyumdan Alınan Parçaların Tatbiki	25
5.	Alan Hesabı İçin Kullanılan Şablon	26
6.	<u>G.arrostii</u> Guss. var. <u>nebulosa</u> (Boiss. Heldr.)Bark. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	33
7.	<u>G.bicolor</u> (Freyn. Sint.) Grossh. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	34
8.	<u>G.eriocalyx</u> Boiss. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	35
9.	<u>G.perfoliata</u> L. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	36
10.	<u>P.pruinosa</u> Boiss.ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	37
11.	<u>S.kotschyi</u> Boiss Ham Saponozitinin Antifungal Aktivite Grafiği	38
12.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.solani</u> 'ye Karşı	40
13.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.flavus</u> 'a Karşı	41
14.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.fumigatus</u> 'a Karşı	42
15.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.niger</u> 'e Karşı	43
16.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.ochraceus</u> 'a Karşı	44
17.	Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin Grafiği- <u>A.versicolor</u> 'a Karşı	45

18. Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-F.oxysporum'a Karşı 46
19. Ham Saponozitlerin Antifungal Aktivitelerinin
Grafiği-P.expansum'a Karşı 47

Tablolar

Sayfa No.

Tablo - 1.	S.officinalis, Polygala ve Gypsophila Türleri	
	Saponozitlerinin Antifungal Aktiviteleri	9
2.	Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla	
	Yapılan Çalışmalar	10
3.	Araştırmamızda Kullanılan Funguslarla	
	Yapılan Çalışmalar	11
4.	Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslarla	
	Yapılan Çalışmalar	12
5.	Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslarla	
	Yapılan Çalışmalar	13
6.	Araştırmamızda Kullanılmayan Funguslarla	
	Yapılan Çalışmalar	14
7.	Araştırmamızda Kullanılan Ham Saponozit,	
	Fungus ve Yöntemler	19
8.	<u>G.arrostii</u> Guss. var. <u>nebulosa</u> (Boiss. Heldr.)	
	Bark. Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi..	33
9.	<u>G.bicolor</u> (Freyn. Sint.) Grossh. Ham	
	Saponozitinin Antifungal Aktivitesi	34
10.	<u>G.eriocalyx</u> Boiss. Ham Saponozitinin	
	Antifungal Aktivitesi	35
11.	<u>G.perfoliata</u> L. Ham Saponozitinin Antifungal	
	Aktivitesi	36
12.	<u>P.pruinosa</u> Boiss. ssp. <u>pruinosa</u> J.Cullen	
	Ham Saponozitinin Antifungal Aktivitesi	37
13.	<u>S.kotschyi</u> Boiss. Ham Saponozitinin	
	Antifungal Aktivitesi	38

HAYAT HİKAYESİ

1954 yılında Bolu'da doğdum. İlk öğrenimimi Bolu'da, orta öğrenimimi İstanbul'da yaptım. 1973 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesine girdim. 1978 yılında haziran döneminde mezun oldum. Aynı yıl ekim ayında Farmakognozi Bilim Dalına asistan olarak girdim. Halen aynı görevde çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.