

T. C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

***EUPHORBIA SEGUIERIANA* BİTKİSİNDEN HAZIRLANAN
ÖZÜTLERİN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan : Bahar TİRYAKİOĞLU
Danışman : Yrd. Doç. Dr. Cahit AKGÜL

ÇANAKKALE – 2004

**Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No:2001-b/15)**

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|------------------------------|-------|
| ÖZ..... | I |
| ABSTRACT..... | II |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | III |
| ÇİZELGELER..... | IV |
| ŞEKİLLER..... | V |

GİRİŞ

| | |
|--|----|
| 1. BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN ETKEN MADDELER VE ETKİ MEKANİZMALARI..... | 1 |
| 1. 1 Bitkilerden izole edilen bileşiklerin temel grupları..... | 1 |
| 1. 1. 1. Fenolikler ve polifenolikler..... | 2 |
| 1. 1. 1. 1. Basit fenoller ve fenolik asitler..... | 2 |
| 1. 1. 1. 2. Kinonlar..... | 4 |
| 1. 1. 1. 3. Flavonlar, Flavonoller, Flavonoidler..... | 5 |
| 1. 1. 1. 4. Tanenler..... | 8 |
| 1. 1. 1. 5. Kumarinler..... | 9 |
| 1. 1. 2. Terpenoidler ve uçucu yağlar..... | 10 |
| 1. 1. 3. Alkaloidler..... | 11 |
| 1. 1. 4. Polipeptidler..... | 12 |
| 2. <i>EUPHORBIA SEGUIERIANA</i> BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ..... | 13 |
| 2. 1. <i>Euphorbia seguieriana</i> Sistematigi..... | 13 |
| 2. 2. <i>Euphorbiacea</i> Familyası..... | 13 |
| 2. 3. <i>Euphorbia</i> Cinsi..... | 13 |
| 2. 4. <i>Euphorbia seguieriana</i> Türü..... | 15 |
| 2. 5. <i>Euphorbiacea</i> familyasının farmakolojik etkileri ve kullanılışı.. | 15 |
| 2. 6. <i>Euphorbia</i> türlerinin farmakolojik etkileri ve kullanılışı..... | 16 |
| 3. BİTKİ ÖZÜTLERİNİN OLASI ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA KULLANILAN BAKTERİLER VE ÖZELLİKLERİ..... | 18 |
| 3. 1. <i>Escherichia coli</i> | 18 |

| | |
|--|----|
| 3. 1. 1. Genel Bilgiler..... | 18 |
| 3. 1. 2. Yaptığı Hastalıklar..... | 19 |
| 3. 1. 3. Tedavi..... | 19 |
| 3. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 20 |
| 3. 2. 1. Genel Bilgiler..... | 20 |
| 3. 2. 2. Yaptığı Hastalıklar..... | 20 |
| 3. 2. 3. Tedavi..... | 21 |
| 3. 3. <i>Staphylococcus aureus</i> | 21 |
| 3. 3. 1. Genel Bilgiler..... | 21 |
| 3. 3. 2. Yaptığı Hastalıklar..... | 22 |
| 3. 3. 3. Tedavi..... | 22 |
| 3. 4. <i>Enterococcus faecalis</i> | 23 |
| 3. 4. 1. Genel Bilgiler..... | 23 |
| 3. 4. 2. Yaptığı Hastalıklar..... | 23 |
| 3. 4. 3. Tedavi..... | 24 |
| 4. DENEYSEL BÖLÜM..... | 24 |
| 4.1. Materyal..... | 24 |
| 4.1.1. Bitkisel materyal..... | 24 |
| 4.1.2. Kimyasal materyal..... | 24 |
| 4.1.3. Mikroorganizmalar..... | 25 |
| 4.1.4. Besiyerleri..... | 25 |
| 4.1.5. Antibiyotikler..... | 25 |
| 4.1.6. Diskler..... | 25 |
| 4.1.7. Gereçler..... | 25 |
| 4.2. Yöntem..... | 26 |
| 4.2.1. Özüt elde edilmesi..... | 26 |
| 4.2.2. Metanol ekstresinin elde edilip fraksiyonlanması..... | 26 |
| 4.2.3. Besiyeri ve bakterilerin hazırlanması..... | 26 |
| 4.2.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması..... | 26 |
| 4.2.3.2. Bakterilerin hazırlanması..... | 27 |
| 4.2.4. Disk difüzyon yöntemi..... | 27 |
| 4.2.5. Zon çapı ölçümü..... | 28 |
| 4.2.6. MIC ve MBC değerlerinin saptanması..... | 28 |
| 4.2.7. Nitel Analiz | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.2.8. Fraksiyonların renk reaksiyonları..... | 31 |
| 5. BULGULAR..... | 37 |
| 5.1. Disk Difüzyon Testi sonuçları..... | 37 |
| 5.2. MIC ve MBC değerlerinin saptanması..... | 42 |
| 5.3. Nitel Analiz ve renk reaksiyonlarında elde edilen bulgular..... | 46 |
| 6. SONUÇ..... | 47 |
| ÖZET..... | 49 |
| SUMMARY..... | 50 |
| KAYNAKLAR..... | 51 |
| TEŞEKKÜR | |
| ÖZGEÇMİŞ | |

ÖZ

Bu çalışmada, Çanakkale yöresinden toplanan *Euphorbia seguieriana* bitkisinden çeşitli çözücülerle hazırlanan özütlere, bakteri hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, *Euphorbia seguieriana* bitkisinin metanol özütü ve dört fraksiyonunun, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* bakteri hücreleri üzerindeki etkileri Disk Difüzyon Testi ile incelendi ve MIC/MBC değerleri belirlendi. Ayrıca metanol özütü ve dört fraksiyonu için nitel analiz işlemleri de uygulanarak bitkideki molekül grupları belirlendi.

Euphorbia seguieriana bitkisinin metanol özütünün ve metanol özütünün diklormetan ve butanol fraksiyonlarının, *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Euphorbia seguieriana*, *Euphorbiaceae*, Disk Difüzyon Testi, Antibakteriyel Etki, İngenol

ABSTRACT

In this study, *Euphorbia seguieriana* was collected from Çanakkale. Antibacterial activities of several extracts have been studied. The effects of methanol extract and four fractions of *E. seguieriana* have been examined against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* by disc diffusion assay. MIC/MBC values have been determined.

It has been determined that, the methanol extract, the butanol and the dichloromethane fractions of *E. seguieriana* have antibacterial effect on *S. aureus*.

Key Words: *Euphorbia seguieriana*, *Euphorbiaceae*, Disc Diffusion Assay, Antibacterial effect, Ingenol

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>E. seguieriana</i> | <i>Euphorbia seguieriana</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| MIC | Minimum inhibisyon konsantrasyonu |
| MBC | Minimum bakterisidal konsantrasyonu |
| İTK | İnce tabaka kromatografisi |

ÇİZELGELER

| Çizelge No | Çizelge Adı | Sayfa |
|-------------------|---|--------------|
| Çizelge 1. 1 | Bitkilerden izole edilen etken maddeler ve etkileri..... | 3 |
| Çizelge 5. 1 | Disk Difüzyon Testi sonuçları..... | 37 |
| Çizelge 5. 2 | <i>Euphorbia seguieriana</i> bitkisinin metanol, butanol, diklormetan fraksiyonlarının <i>S. aureus</i> üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması..... | 42 |
| Çizelge 5. 3 | <i>Euphorbia seguieriana</i> bitkisinin metanol özütü, butanol, diklormetan fraksiyonlarının MBC değerleri... | 46 |

ŞEKİLLER

| Şekil numarası | Adı | Sayfa |
|----------------|--|-------|
| Şekil 1. 1 | Kafeik asit..... | 2 |
| Şekil 1. 2 | a)Kateşol b) Piragallol..... | 4 |
| Şekil 1. 3 | Kinon..... | 4 |
| Şekil 1. 4 | Hiperisin..... | 5 |
| Şekil 1. 5 | Flavon..... | 5 |
| Şekil 1. 6 | Chrysin..... | 6 |
| Şekil 1. 7 | Bitki fenolik bileşiklerinin fenilalanin yoluyla oluşumu..... | 7 |
| Şekil 1. 8 | Kondanse tanen..... | 8 |
| Şekil 1. 9 | Kumarin..... | 9 |
| Şekil 1. 10 | Warfarin..... | 9 |
| Şekil 1. 11 | Mentol..... | 10 |
| Şekil 1. 12 | Berberin..... | 12 |
| Şekil 2. 1 | a) <i>E. salicifolia</i> , b) <i>E. decipiens</i> , c) <i>E. paralias</i> ; bitkilerinden izole edilen makrosiklik diterpenler.... | 14 |
| Şekil 2. 2 | <i>Euphorbia seguieriana</i> bitkisinin doğadaki görünümü..... | 14 |
| Şekil 2. 3 | İngen an iskeleti..... | 18 |
| Şekil 4. 1 | <i>E. seguieriana</i> bitkisine uygulanan nitel analiz işlemi.. | 33 |
| Şekil 4. 2 | <i>E. seguieriana</i> bitkisinin metanol özütünden hazırlanan fraksiyonların renk reaksiyonları..... | 36 |
| Şekil 5. 1 | Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre <i>E. seguieriana</i> bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların <i>E. coli</i> üzerindeki etkisinin incelenmesi..... | 38 |
| Şekil 5. 2 | Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre <i>E. seguieriana</i> bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki etkisinin incelenmesi..... | 39 |

| | | |
|------------|---|----|
| Şekil 5. 3 | Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre <i>E. segueriana</i> bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların <i>E. faecalis</i> üzerindeki etkisinin incelenmesi..... | 40 |
| Şekil 5. 4 | Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre <i>E. segueriana</i> bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların <i>S. aureus</i> üzerindeki etkisinin incelenmesi..... | 41 |
| Şekil 5. 5 | Metanol özütünün MBC değerlerinin belirlenmesi..... | 43 |
| Şekil 5. 6 | Diklormetan ve butanol fraksiyonlarının MBC değerlerinin belirlenmesi..... | 44 |
| Şekil 5. 7 | Butanol fraksiyonunun MBC değerlerinin belirlenmesi. | 45 |

GİRİŞ

İnsanlardan önce hastalık etkenlerinin yeryüzünde bulunduğu çok eski devirlere ait kemikler, fosiller vb. kalıntılardan anlaşılmaktadır. İlk insandan itibaren hastalıklara karşı korunma çareleri aranmaya başlanmıştır. Bu koruma başlangıçta mutlaka onların iç güdülerini yardımcı ile olmuştur. Ancak aradan geçen uzun süre içinde insanlar çevrelerinde bulunan ekolojik ve biyotik faktörleri (bitkiler, hayvanlar v.b) kendi tedavilerinde kullanmaya başlamışlardır. Bu zamanla iç güdüsel bir yararlanma değil, bilinçli bir şekilde faydalanma durumuna dönüşmüştür. Tıbbi bitkiler hakkında zamanımıza kadar gelen hikayeler de bazı ipuçları sağlamaktadır (Ceylan, 1995).

Dünyada 250.000 ile 500.000 arasında bitki türü olduğu tahmin edilmektedir. Bunların nispeten küçük bir yüzdesi (% 1 ile 10) insanlar ve hayvanlar tarafından besin olarak kullanılmaktadır. Daha fazlasının ilaç olarak kullanılması olasıdır. Tüm kıtalardaki insanlar, tarih öncesi dönemlere dayanan doğal bitkilerin binlercesi olmasa da yüzlercesini, çay olarak içmiş ve yara lapası olarak uzun süre kullanmışlardır (Cowan, 1999).

Bitkiler hakkında derlenen bilgilerin bir kısmı tecrübeye dayalı, bir kısmı da bitkilerin etkili maddeleri bulunup ayıklanarak yapılan klinik çalışmalara ait bilgilerdir. Her şeye rağmen tüm dünya üzerinde büyük bir alana yayılmış olan bitkilerin tıbbi açıdan araştırılması tamamlanamamıştır (Asımgil, 1997).

Günümüzde, hala bir çok gelişmiş ülkede temel insan sağlığı için terapötik ilaçlarda, bitki materyalleri büyük bir rol oynamaya devam etmektedir ve bitkiler, yeni anti-mikrobiyal ajanlar için potansiyel kaynaklar olarak gösterilmektedir (Sökmen ve ark., 1999).

Bu çalışmaya konu olan *Euphorbia seguieriana* bitkisi Kırklareli'nden Ağrı'ya kadar geniş bir yayılım gösterir. Çanakkale çevresinde de sık sık rastlanan bir bitkidir. *Euphorbia* türlerinin sütü tahriş edici ve kuvvetli müshil etkiye sahiptir. Siğil tedavisinde de kullanılır. Bu çalışmada *Euphorbia seguieriana* bitkisi Çanakkale yöresinden toplanıp özütleri hazırlandıktan sonra antibakteriyel etkileri incelenecektir.

1. BİTKİLERDEN İZOLE EDİLEN ETKEN MADDELER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Bitkilerin antimikrobiyal etkileri içerdikleri çeşitli bileşiklerden kaynaklanabilir. Bu nedenle bazı yüksek bitkilerin antimikrobiyal etkileri araştırma konusu olmuştur (Dortunç, 1990).

Akın ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 102 bitkinin, su ve etanollü özütlerinin bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkileri incelenmiş ve etanol özütünün daha etkili olduğu bulunmuştur (Akın ve ark., 1986).

Sökmen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, Türkiye florasından toplanan 35 bitki türünden 76 özütün beş patojenik bakteri ve bir mantara karşı etkileri araştırılmış ve sekiz bitki türünden altmış özütün en az bir test mikroorganizmasına karşı etkili olduğu bulunmuştur (Sökmen ve ark., 1999).

Bir diğer çalışmada, *Allium sativum*' un su, alkol ve eterdeki 1/10'lük özütlerinin 5 bakteri ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve eter özütüyle elde edilen ortalama inhibisyon zon çaplarının su ve alkol özütleri ile elde edilenden daha büyük olduğu bulunmuştur (Kocabeyoğlu ve ark., 1992).

Ancak bu çalışmalarda genellikle total bitki özütleri kullanılmış ve antimikrobiyal etkinin bu bitkilerin içerdiği bileşiklerden hangilerinden kaynaklandığı bildirilmemiştir.

Yine bitki özütleri ve bitkilerden izole edilen maddeler ile yapılan antimikrobiyal etkinin araştırıldığı bazı çalışmalarda ise bu etkinin hangi bileşiklerden kaynaklandığı saptanmıştır (Dortunç, 1990).

Helichrysum pedunculatum bitkisinin yapraklarının diklormetan özütünün fraksiyonlanması sonucu izole edilen linoleik ve oleik asitin tüm Gram negatif test bakterilerini etkisiz hale getirdiği görülmüştür. *Staphylococcus aureus*'a karşı bu yağ asitlerinin sinerjetik etkisinin bulunduğu saptanmıştır.

1. 1. Bitkilerden İzole Edilen Bileşiklerin Temel Grupları

Bitkiler, çoğunluğu fenoller ya da fenollerin oksijen süstitüe türevleri olan aromatik maddeleri sentezlemek için sonsuz bir yeteneğe sahiptir. En az 12.000'i izole edilmiş bu aromatik maddeler, ikincil metabolitlerdir. Bu maddeler

mikroorganizmaların, böceklerin ve otoburların saldırılarına karşı bitkilerin savunma mekanizmalarını oluşturur. Bazıları terpenoid gibi, bitkiye koku verir; diğerleri (kinonlar, tanenler) bitki pigmentlerinden sorumludur. Bileşiklerin bir kısmı da bitkinin aromasından sorumludur.

Antimikrobiyal fitokimyasallar bir çok kategoriye ayrılabilir. Bu sınıflandırma Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Cowan, 1999).

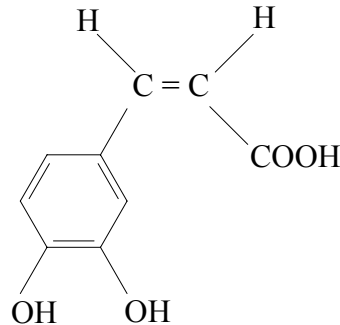
1. 1. 1. Fenolikler ve polifenolikler

Fenolik bileşikler, genellikle ikincil metabolitlerdir. Bu sınıftaki moleküller, aromatik halka üzerinde hidroksil grubu taşıyan fenol yapılarıdır. Bu yapılardan, antosiyaninler, kumarinler, fenilpropamitler, flavonoidler, tanenler ve lignin gibi büyük moleküller oluştururlar. Fenolik bileşiklerin oluşması için iki biosentetik yol vardır. Bu iki yol şikimik asit ve malonik asit yoludur. Şikimik asit yolu yüksek bitkilerde daha önemlidir (Wildman, 2001).

1. 1. 1. 1. Basit fenoller ve fenolik asitler

En basit biyoaktif fitokimyasallar, tek süstitüe fenolik halkalardan oluşmuştur. Sinnamik ve kafeik asitler en yüksek oksidasyon basamağındaki, fenilpropan-türevli bileşiklerin geniş bir grubunun en genel temsilcileridir.

Genelde tarhun ve kekik bitkileri, virüslere, bakterilere ve mantarlara karşı etkili olan kafeik asit içerirler (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1. Kafeik asit

Kateşol ve piragallol’de hidroksillenmiş fenollerdir ve mikroorganizmalara karşı toksik oldukları belirlenmiştir. Kateşolün iki –OH grubu, piragallolün üç-OH grubu vardır (Şekil 1. 2). Fenol gruplarına farklı konumlarda yeni hidroksil gruplarının eklenmesiyle

Çizelge 1.1. Bitkilerden izole edilen etken maddeler ve etkileri

| <u>Sınıf</u> | <u>Alt sınıf</u> | <u>Örnek</u> | <u>Etki Mekanizması</u> |
|-----------------|-------------------------|--|---|
| Fenolikler | Basit fenoller | Kateşol | Substrat yoksunluğu |
| | | Epikateşin | Membran bozucu |
| | Fenolik asit | Sinnamik asit | |
| | | Kinonlar | Hiperisin |
| | Flavonoids | | Chrysin |
| | | Flavonlar | |
| | Flavonoller | Abyssinone | Enzim inaktivasyonu |
| | | Totarol | HIV ters transkriptaz inhibisyonu |
| | Tanenler | Ellagitanen | Proteinlere bağlanma |
| | | | Enzim inhibisyonu |
| Terpenoidler | Kumarinler | Warfarin | Substrat yoksunluğu |
| | | | Hücre duvarıyla kompleksleşme. |
| | | Membran bozulması | |
| | | Metal-iyon kompleksleşmesi | |
| | | Ökaryotik DNA ile etkileşim | |
| | Uçucu yağlar | Capsaicin | Membran bozulması |
| | Alkaloidler | Berberin | |
| | | Piperin | Hücre duvarı veya DNA'ya eklenmek. |
| | Lektin ve polipeptitler | Monnoz-spesifik agglutinin | Viral fusyon yada adsorpsiyonun bloke olması |
| | | | Disülfid köprüsü oluşumu |
| Poliasetilenler | Fabatin | 8S-Heptadeka-2(Z), 9(Z)- Dien-4,6-diin-1,8-diol | |

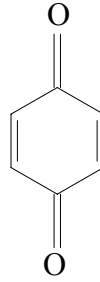
artan hidroksilasyonun, mikroorganizmalara karşı bu toksik etkiyi arttırdığı düşünülmektedir (Cowan, 1999).



Şekil 1. 2. (a) Kateşol (b) Piragallol

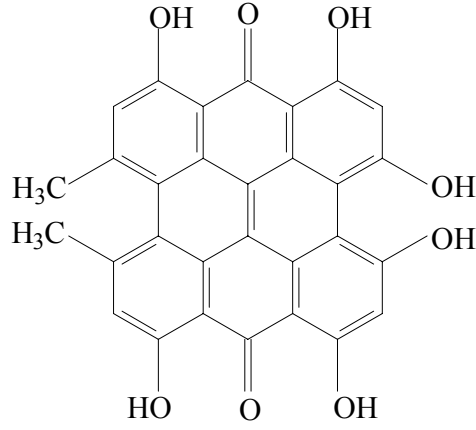
1. 1. 1. 2. Kinonlar

Kinonlar, iki keton süstitüsyonlu aromatik halkalardır (Şekil 1. 3). Doğada yaygın olarak bulunurlar ve karakteristik olarak yüksek reaktivliktedirler. Bu bileşikler, materyale boyama özelliği kazandırır. Difenoller (ya da hidrokinonlar) ile ketonlar (ya da kinonlar) arasındaki değişiklik, yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları ile kolayca gerçekleşir. Belirli kinon-hidrokinon çiftlerinin ayrı redoks potansiyeli, birçok biyolojik sistemde çok önemlidir. Memelilerin elektron transfer sistemindeki koenzim Q'nun rolü de bunu gösterir. K vitamini kompleks bir naftakinondur. Onun, antihemorrojik (kanamayı kesen) aktivitesi, vücut dokularında kolay oksitlenebilmesiyle ilgili olabilir. Hidroksillenmiş aminoasitler, polifenoloksidaz gibi uygun enzimlerin varlığında, kinonlar haline getirilebilir.



Şekil 1. 3. Kinon

Kararlı serbest radikal kaynağı olmasına ek olarak, protein inaktivasyonuna da neden olan kinonlar, proteinlerdeki nükleofilik aminoasitleri tersinmez olarak kompleksleştirmesi ile bilinir. Bu yüzden, kinonların antimikrobiyal etki potansiyellerinin oranı büyüktür. Mikrobiyal hücredeki olası hedefler, yüzey tutucu adhesinler, hücre duvarı polipeptidleri ve membrana bağlı enzimlerdir. Kinonlar, ayrıca mikroorganizmalara gereksiz substratları da sunabilirler.

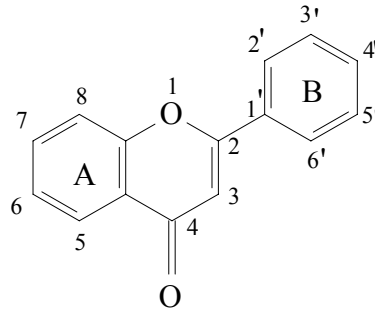


Şekil 1. 4. Hiperisin

Kazmi ve arkadaşları bir Pakistan ağacı olan *Cassia Italica*'dan *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* ve *Pseudomonas aeruginosa* için bakteriostatik, *Pseudomonas pseudomalliae* için bakterisidal etkili bir antrakinon tanımlamıştır. St. John'un hiperisin dediği bu antrakinon (*Hypericum perforatum*) sonraları antidepresant olarak popülerlik kazanmasıyla daha çok sayıda antimikrobiyel özelliği olduğunu göstermiştir (Cowan, 1999) (Şekil 1. 4).

1. 1. 1. 3. Flavonlar, Flavonoller, Flavonoidler

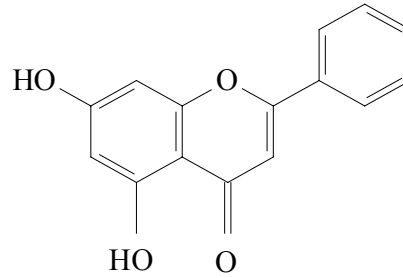
Flavonoidler, bitkilerdeki fenolik bileşiklerin en geniş sınıfıdır. Flavonoidlerin iskelet yapısı 15 karbon içerir ve karbon-3 köprüsüyle iki aromatik halka birbirine bağlanmıştır. Aromatik halkalar A ve B olarak isimlendirilir (Wildman, 2001). Flavonoidlerdeki OH veya OCH₃ sübstitüsyonları A veya B halkasında genellikle C-5, C-7, C-3 ve C-4'de bulunur (Tanker ve Sakar, 1991). Flavonlar, kinonların iki karbonil grubuna karşı tek karbonil grubu içeren fenolik yapılardır (Şekil 1. 5). 3-Hidroksil grubunun eklenmesiyle flavonol oluşur (Cowan, 1999).



Şekil 1. 5. Flavon

Flavonoidlerin bir çok farmakolojik etkileri vardır. Antihemorrojik, antisklerotik, antienflamatuar, ödem boşaltıcı, pozitif inotrop, spazmolitik, antihepatotoksik ve diüretik etkiler saptanmıştır (Tanker ve Sakar, 1991).

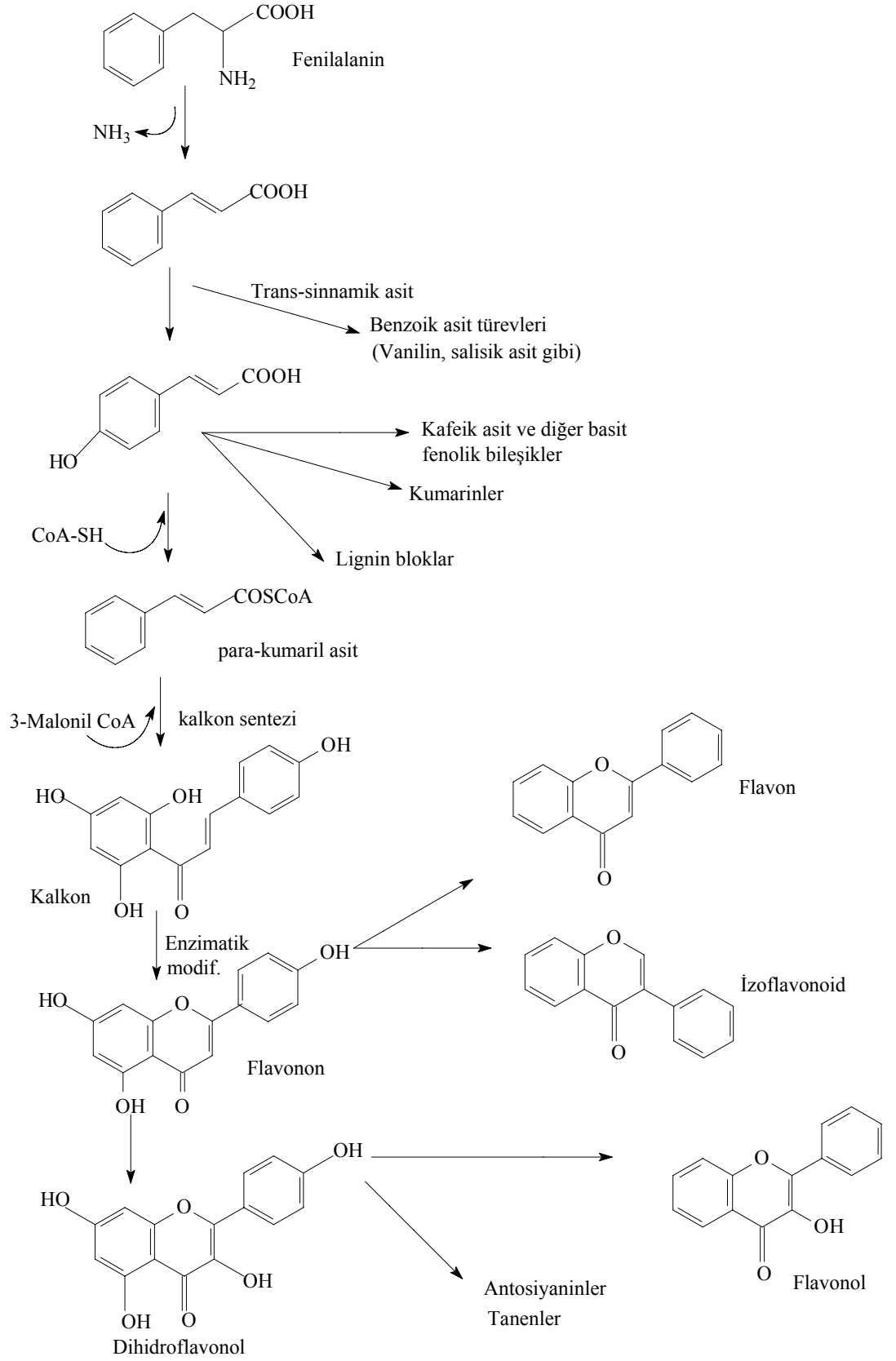
Flavonoidlerin mikroorganizmalara karşı etkisi, kinonlarda anlatıldığı gibi, bakteriyel hücre duvarı ile kompleksleşmesinden kaynaklanır. Lipofilik flavonoidler, mikroorganizmanın membranına da zarar verebilir. Flavonoid bileşikleri, çok sayıda virüse karşı inhibe edici özellik sergiler. Chrysinin, HIV'e karşı etkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma olmasına karşın, virüsleri inhibe ettiğini gösteren çalışma sayısı azdır (Cowan, 1999) (Şekil 1. 6).



Şekil 1. 6. Chrysin

Flavonoidlere bitkinin bütün kısımlarında rastlanmakla beraber, bu bileşikler, daha çok bitkinin toprak üstü kısımlarında yer alır (Tanker ve Sakar, 1991).

Bir çok fenolik bileşik, trans-sinamik asitten oluşur. Trans-sinamik asitten oluşan fenolik bileşikler, benzoik asit türevi olan, vanilin ve salisilik asiti de içerir. Trans-sinamik asit, para-kumarik aside dönüşür. Para kumarik asitin basit fenolik türevleri, kafeik asit ve ferulik asitide de içeren CoA, para-kumaril CoA'yı oluşturmak için para-kumaril aside saldırır. Para-kumarik asit ve para-kumaril CoA, lignin bloklarını, para-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolü oluşturmak için kullanır. Diğer fenolik grupları oluşturmak için para-kumaril CoA, (kalkon gibi) polifenolik molekülleri oluşturmak için üç malonil CoA molekülünü kapsayan enzimatik modifikasyonlara uğrar ve kalkondan sonra flavononlar oluşur. Flavonon yapısı, flavonlar, izoflavonlar, dihidroflavoneller yoluyla tanenler ve antosiyaninlerin yapılmasında kullanılır (Wildman, 2001) (Şekil 1. 7).



Şekil 1. 7. Bitki fenolik bileşiklerinin fenilalanin yoluyla oluşumu

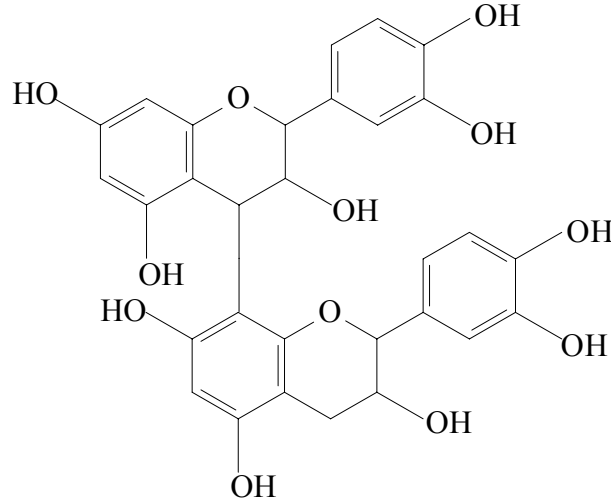
1. 1. 1. 4. Tanenler

Bitkilerde bulunan, azotsuz, polifenolik yapı, su, alkol, asetonda çözünen, deriyi tabaklama yeteneğinde olan bileşiklerdir.

Yapıları tam bilinmediği için mevcut sınıflamalar yeterli değildir. Genellikle iki büyük gruba ayrılırlar.

1-Hidroliz olabilen tanenler (Gallik tanenler): Asit fenoller ile şekerlerin esterleridir. Asit fenol olarak, gallik asit digalik asit veya elajik asit; şeker olarak da genellikle glikoz bulunur.

2-Kondanse tanenler (kateşik tanenler): Kateşinin kondenzasyonu ile oluşan bu tanenler ne asitler, ne de fermentler ile hidroliz olmazlar (Çubukçu, 1992) (Şekil 1. 8).



Şekil 1. 8. Kondanse tanen

Drogların kurutulması ve depolanması esnasında tanenler, polimerleşerek suda çözünmeyen flobofen veya tanen kırmızısı denilen bileşiklere dönüşür (Tanker ve Sakar, 1991).

Çok çeşitli hastalıkları tedavi eden veya önleyen tanenleri içeren özellikle kırmızı şarap ve yeşil çay gibi meşrubatların tüketilmesi önerildiğinden, son yıllarda bu bileşik gruplarına karşı ilgi önemli ölçüde artmıştır.

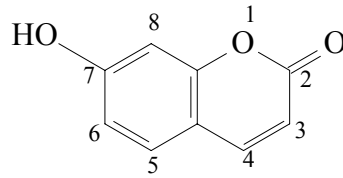
Geniş çapta anti-infektif etkileri, ara-konakçı tümör etkisi, fagosidik hücrelerin uyarılması gibi insan fizyolojik aktivitelerinin çoğu tanenlerle ilişkilidir. Kovalent bağ ve hidrojen bağı oluşturarak, proteinler ile kompleksleşebilirler. Böylece kinonlar bölümünde anlatıldığı gibi, antimikrobiyal etkileri; mikrobiyal adhesinleri, enzimleri,

hücre-zar transfer proteinlerini inaktivite etmeleri ile ilişkilidir. Bitkilerdeki tanenler, böcek gelişimini inhibe eder ve geviş getiren hayvanların sindirim olaylarını bozar.

Kondanse tanenlerin, ruminal bakterilerin hücre duvarlarına bağlanarak, büyümelerine ve proteaz etkisini önlediği de belirlenmiştir (Cowan, 1999).

1. 1. 1. 5. Kumarinler

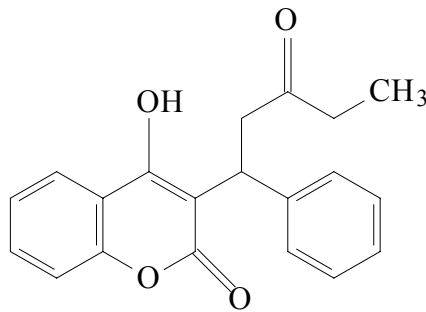
o-Hidroksi-cis-sinamik asitin laktonudur (Şekil 1. 9). Kumarin canlı bitkide kokusuzdur ve o-hidroksi-trans veya cis-sinamik asitin O-heteroziti halinde bulunur. Bitki parçalandığında veya kurutulmaya başlandığında heterozid parçalanır ve serbest kumarik asidin laktonu oluşur. Bu şekildeki laktonlu kumarinler karakteristik kokuludur.



Şekil 1. 9. Kumarin

En basit kumarin genel olarak C-7’de bir OH grubu taşır, diğer OH grubu veya metoksil grupları çoğunlukla C-6’da veya C-5, C-8, C-4’de bulunur. Kumarinler genellikle mavi veya mavi-yeşil floresans verir (Tanker ve Sakar, 1991).

1996’dan itibaren en az 1300 tane kumarin belirlenmiştir. Ünlere temel olarak antitrombotik, anti-inflamatuar ve vasodilatör (kan damarlarının genişletilmesi) aktivitesinden gelir. Büyük ölçüde rodentisit (kemirici hayvanlar üzerinde öldürücü etkiye sahip ilaç.) ve oral antikoagulant olarak kullanılan warfarin, çok bilinen bir kumarindir (Şekil 1. 10). Antiviral etkiye de sahiptir.



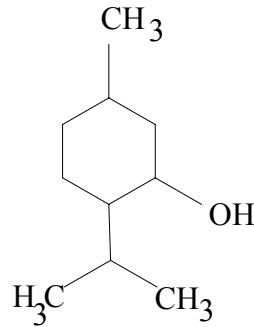
Şekil 1. 10. Warfarin

Grup olarak kumarinlerin, enfeksiyonlara dolaylı olarak negatif etki yapan makrofajları uyardığı bulunmuştur. Daha özel olarak insanlarda oluşan uçukların yenilenmesini önlemek için kullanılır. Ama cüzzama karşı etkisiz olduğu bulunmuştur. Kumarinlerle ilişkili hidroksisinnamik asidin Gram pozitif bakterileri inhibe edici olduğu görülmüştür. Genel olarak kumarinlerin spesifik antibiyotik özellikleriyle ilgili bilginin az olmasına rağmen bir çok rapor, bu fitokimyasalların yararlı olduğunu ortaya koymuştur (Cowan, 1999).

1. 1. 2. Terpenoidler ve uçucu yağlar

Terpenler 5 karbonlu izopren moleküllerinden oluşmuştur. İzopren moleküllerinin birbiriyle kafa ve kuyruk pozisyonundan bağlanmasıyla mono, seski, di, sester, tri, tetra ve politerpenler meydana gelir (Tanker ve Sakar, 1991). Bu yüzden izoprenoidler ve terpenoidler, aynı molekül sınıfı için kullanılan terimlerdir. Tokoferol, tokotrienol, karotenoidler bu bitki sınıfına dahil edilirler (Wildman, 2001). Terpenler genelde oksijen gibi ek elementler içerdiğinde terpenoidler olarak isimlendirilirler (Cowan, 1999).

Monoterpenlere örnek olarak mirsen, limonen, mentol ve timol'ü seskiterpenlere örnek olarak farnesol, bisabolol ve kamazulen'i diterpenlere örnek fitol ve abiatik asit'i, triterpenlere örnek olarak skualeni, tetraterpenlere örnek olarak karotenoidleri gösterebiliriz (Şekil 1. 11).



Şekil 1. 11. Mentol

Mono ve seskiterpenler genellikle sıvıdır ve uçucu yağların bileşimine girer (Tanker ve Sakar, 1991). Uçucu yağlar bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan kokulu,

uçucu ve su buharı ile sürüklenen bileşiklerdir. Bitkilerde salgı sistemlerinde oluşur ve birikirler (Çubukçu, 1992). Uçucu yağların çok karmaşık bir kimyasal yapıya sahip oldukları ve bileşimlerinde hidrokarbonlar, alkoller, asitler, esterler, aldehitler, ketonlar ve fenoller gibi çeşitli bileşikler bulduklarını bilinmektedir (Dortunç, 1990).

Terpen ya da terpenoidler bakteri, mantar, virüs ve protozoalara karşı aktiftir. 1977'de, o tarihe kadar incelenen uçucu yağ türlerinin % 30'u bakterileri inhibe ederken, % 60'nın da mantarları inhibe ettiği bildirilmiştir. Terpenlerin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ama lipofilik bileşikler ile membran parçalanmasını içerdiği tahmin edilmektedir (Cowan, 1999).

Antimikrobiyal etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılamaması uçucu yağların çok karmaşık bir kimyasal yapıya sahip olmaları ile açıklanabilir (Dortunç, 1990).

Karotenoidler, terpenoid sınıfında, bitkilere renk verdiği bilinen, ismini havuçtan alan bileşiklerdir. Genellikle sarı, turuncu ve kırmızı renk verirler (Wildman, 2001).

1. 1. 3. Alkaloidler

Alkaloidler, insan ve hayvan organizmasında, karakteristik fizyolojik etkilere sahip ve genelde bitkilerde bulunan azot içeren kompleks yapıda bazlardır.

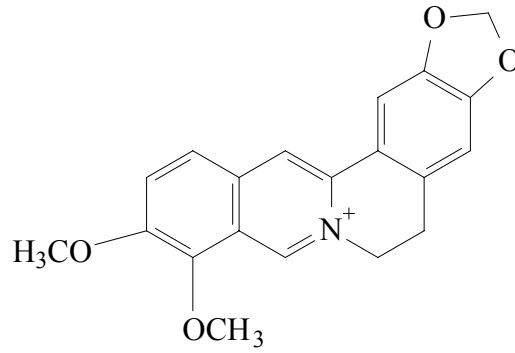
Alkaloidlerin yapısındaki azot genellikle bir heterosiklik halkanın içindedir (pirolidin, piperidin, tropan, indol, imidazol, purin vs. halkalarındaki gibi). Fakat azotu halka dışında olan bazı alkaloidler de vardır (Colhin, ephedrinigalegin, mescaline vb.). Alkaloidleri ve alkaloid taşıyan drogları sınıflandırmada bu durum esas alınır (Çubukçu, 1992).

Alkaloidler bitkilerde organik asitlerle, suda çözünebilen tuz şeklinde bulunur. Bazı alkaloidler tanenlere bağlıdır. Alkaloidler genellikle renksiz, optikçe aktif, kristalize maddelerdir. Sadece koniin, nikotin, spartein gibi oksijensiz alkaloidler sıvıdır (Tanker ve Sakar, 1991).

Alkaloidlerin tıbbi olarak kullanılmasına ilk örnek 1805'te *Papaver somniferum*' dan (haşhaş) izole edilen morfindir. Morfin ismi rüyalar tanrısı *Morpheus*'tan gelir. Kodein ve eroin, morfinin türevleridir. Dügün çiçeği familyasının bitkilerden izole edilen diterpenoid alkaloidlerinin genel olarak antimikrobiyal

aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. *Solanum khasianun*'un meyvelerinde bulunan bir glikoalkaloid olan solamargine ve diğer alkaloidler, AIDS'le ilgili enfeksiyonlara, karşı etkili olabilir.

Berberin, alkaloid gruplarının önemli bir temsilcisidir (Şekil 1. 12). Berberin tripanazomlara ve plasmodialara karşı etlidir. Berberin ve harman gibi yüksek düzeyde aromatik, düzlemsel ve kuarterner alkaloidlerin etki mekanizması, DNA ile eklenebilmesidir.



Şekil 1. 12. Berberin

1. 1. 4. Polipeptidler

Mikroorganizmalar için inhibitör olan peptidler ilk defa 1942'de bulunmuştur. Genelde disülfid bağları içerirler ve pozitif olarak yüklenmişlerdir. Etki mekanizmaları, mikrobiyal membrandaki iyon kanallarının oluşumu ya da mikrobiyal proteinlerin, polisakkarit reseptörleri topluluğuna bağlanmasının yarışmalı inhibisyonu olabilir.

Acı kavundaki MAP 30, Gelonium Multiflorumdaki GAP 31 ve jacalin gibi bir çok bitkide mannoz-spesifik lektinleri içeren, büyükçe lektin molekülleri, tehlikeli hücre bileşenleriyle viral etkileşimi inhibe etmesi yüzünden, viral üremeyi (HIV, sitomegalovirüs) inhibe ederler (Cowan, 1999).

2. *EUPHORBIA SEQUIERIANA* BİTKİSİ VE ÖZELLİKLERİ

2. 1. *Euphorbia Segueriana* Sistematığı

Bölüm : *Dicotyledonea*

Alt bölüm : *Rosidae*

Takım : *Euphorbiales*

Familya : *Euphorbiace*

Genus (Cins): *Euphorbia*

Tür : *Euphorbia sequierana* (Zeybek ve Zeybek, 1994).

2. 2. *Euphorbiaceae* Familyası

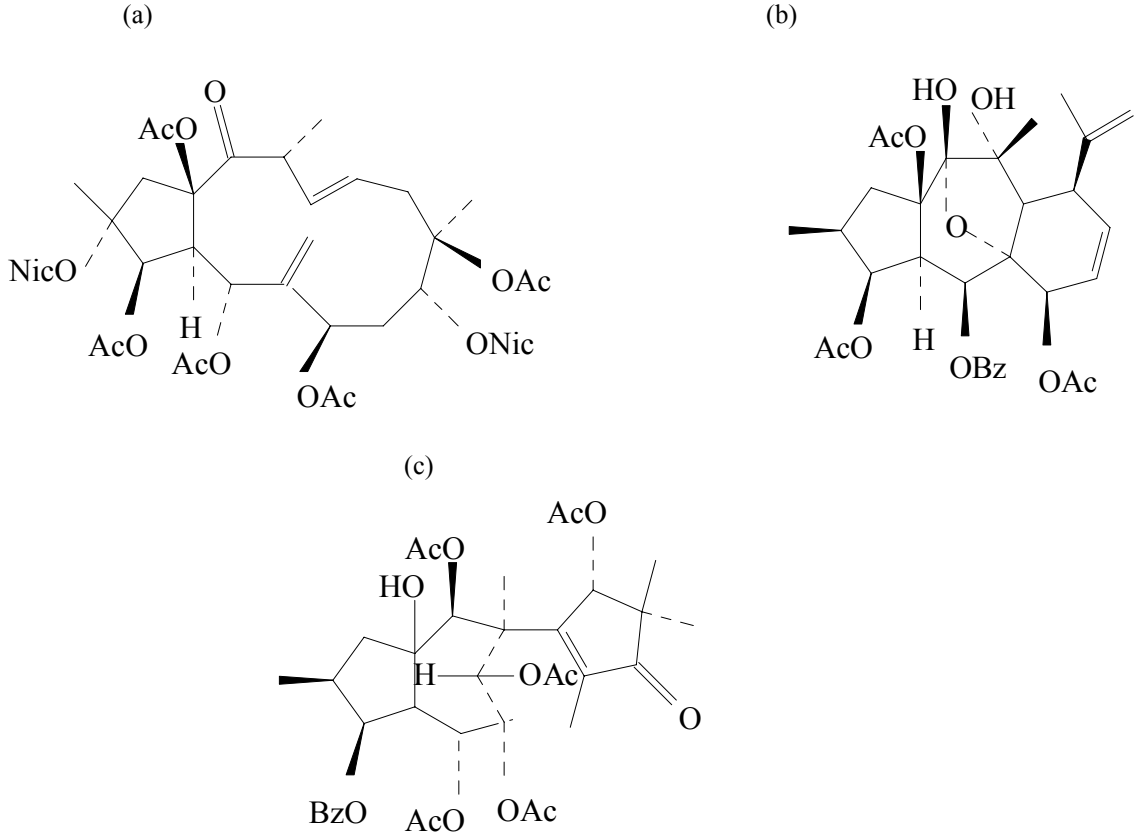
Euphorbiaceae familyası bir ve çok yıllık otsu ve odunsu bitkiler olup, bir veya iki evciklidirler. Kauçuk ve boya maddesi elde edilen ve ilaç sanayinde kullanılan türleri vardır. Bazı türleri süs bitkisi olarak kullanılır (Engin, 1991).

Euphorbiaceae türlerine verilen genel Türkçe ad sütleğendir. Süddüyen, sütlüvan, süldüğü, sütgen, sütlen, sütlengeç, sütlücen (Kastomonu) sütlüyen, sütlügan, sütlügan, sütlü ot, sütlüvan, zerana (Artvin) diğer eş anlamlı Türkçe adlarıdır (Baytop, 1997).

2. 3. *Euphorbia* cinsi

Euphorbia cinsi, yaklaşık 1100 türü ile, sütleğen familyasının en geniş üyesidir. Türlerin en belirleyici özelliği, çok tahriş edici süt bulundurmalarıdır. Tahriş edici özellikleri, makrosiklik tipteki diterpenler nedeniyledir (Jeske ve ark., 1995).

Euphorbia türleriyle yapılan çalışmalarda çok sayıda makrosiklik diterpenler saptanmıştır. *E. salicifolia* bitkisinden euphosalicin ve trisiklik salicifolin; *E. decipiens* bitkisinden de makrosiklik diterpenler ; Segeten A, *E. paralias* bitkisinden izole edilmiştir (Hanson, 2003).



Şekil 2.1 : a) *E. salicifolia*, b) *E. decipiens*, c) *E. paralias* bitkilerinden izole edilen makrosiklik diterpenler. (Ac: Asetil, Bz: Benzoil, Nic: Nikotil)

Euphorbia türlerinin bazıları dere ve göllerde balıkları zehirleyerek avlamada kullanılmaktadır. Sudaki tüm canlıları öldürdüğünden yasaklanmış olduğu gibi, bu şekilde avlanan balıklar insanlarda da zehirlenmelere yol açtığından tehlikelidir (Zeybek ve Zeybek, 1994).



Şekil 2.2. *Euphorbia seguieriana* bitkisinin doğadaki görünümü

2. 4. *Euphorbia Seguieriana* türü

Euphorbia seguieriana 60 cm'ye kadar boylu, birkaç gövdeli çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2. 2). Gövde yaprakları linear, obloag-linear, akut veya subakuttur. Umbrella tabanı yapraklar linear-lanseolat veya ovat. Siatyum brakteleri ovat, uçta subakut, mukronat, taban kuneat veya trunkat. Meyva 3 loplü, 3-3,5 mm çapında, tüysüz ve düzdür. Tohumlar ovoid veya elips biçiminde, 2 mm çaplı, soluk gri, bazen kahverengi ve beneklidir.

Orman, çalılık, step, kayalık yamaçlar, dere kenarları ve nadaslarda 10-1900 m yükseklikde yetişir. Mart-Ekimde çiçeklenir.

Türkiye'de Kırklareli, İstanbul, Bolu, Ankara, Amasya, Samsun, Erzurum, Eskişehir, Van, Ağrı ve Isparta'da yayılış gösterir. Çanakkale'de ise İntepe, Eceabat, Kilitbahir, Alçitepe, Gelibolu ve Yenice'de yayılış gösterir. Bitkinin tümü boyarmadde taşıır. Mordanla sarı boyar madde elde edilir (Uysal, 1991).

2. 5. *Euphorbiaceae* familyasının farmakolojik etkileri ve kullanılışları

Euphorbiaceae familyasına ait bitkiler deri için inflamatuvar, kostik, tahriş edici lateks ve tohum yağı üretirler. Bu etkinin temel nedeni, diterpen phorpol'un C-12 ve C-13 pozisyonları ve ingenol türevlerinin C-3 pozisyonuna bağlanmış, doymuş yağ asitlerinin uzun zincirli esterlerinin var olmasıdır. Bu diterpen esterlerinin, kuvvetli tümör önleyici olduğu saptanmıştır (Upadhyay, 1996).

Euphorbiaceae familyasının 7 cinsine ait (*Adenopeltis*, *Argythamnia*, *Avellanita*, *Colliguaja*, *Croton*, *Dysopsis* ve *Euphorbia*) 45 tür üzerinde yapılan bir çalışmada, *Euphorbia* cinsininin fazla bioaktif bileşiğe sahip olduğu bulunmuştur (Bittner ve ark., 2001). *Euphorbia* cinsiile yapılan son kimyasal çalışmalarda, bu türün, terpenler (bazıları yeni yapılarla) ve flavanoidler içerdiği bulunmuştur. Diğer cinslerin daha önceden bilinen triterpenler ve flavanoidler taşıdığı saptanmıştır.

Yapılan çok sayıdaki fitokimyasal ve farmokolojik araştırmalar göstermiştir ki, bu türde varolan bioaktif, antikanser aktiviteler kadar toksik, tahriş edici, kokarsinojen etkilerde sergileyen diterpenoidlerdir. Şu ana kadar bu türden, iskelet yapısı 14 karbonlu 300'den fazla diterpenoid izole edilip, belirlenmiştir. Shi ve Jia'nın yaptığı bir

çalışmada, Çin'deki *Euphorbia* türlerinin yeni diterpen esterleri ve bunların tahriş edici, antikanser ve bakterisid etkileri incelenmiştir (Shi ve Jia, 1997).

2. 6. *Euphorbia* türlerinin farmakolojik etkileri ve kullanılışları

Oldukça çok sayıda *Euphorbia* türünün lateksi ok zehirinin katkı maddesi olarak kullanılır. *Euphorbia* lateksi, okun açtığı yara üzerinde tahriş edici etkiyi iki kat artırır. Tanzanya'daki *Euphorbia* türleri balık zehiri olarak kullanılır.

Euphorbia türlerinin bileşenlerini belirleyebilmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Tüm türlerin latekslerinde kristallenebilen euphorbon bulunmuştur. Marloth (1932) 'a göre euphorbon tahriş edici etkiye neden değildir (Watt ve Brandwijk, 1962). *Euphorbia* türlerinin, toksik etkisinin, az miktardaki nitrik asit üzerine derişik H_2SO_4 eklenmesiyle kırmızımsı-mor bir renk veren resinden kaynaklandığı açığa çıkmıştır.

1949'dan 1953'e kadar *Euphorbia ingens*, *Euphorbia tirucalli* ve *Euphorbia triangularis*'in muhtemel kauçuk kaynağı olmasıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (Watt ve Brandwijk, 1962). Latekslerinde, %12,5 oranında kauçuk ve %50 oranında resin saptanmıştır.

Güney Rodos'ta *Euphorbia abyssinica* yara ve ağrılara uygulanır. Bu bitkinin zehirli olduğu söylenir ama ne lateksi ne de su ekstresinin deneklere ağız yoluyla verildiğinde toksik olmadığı görülmüştür. Afrikada deri losyonlarında kostik ve temizleyici olarak kullanılır. % 16-76 oranında kauçuk euphorboresin, euphorbon ($C_{14}H_{24}O$)_n ve % 2 oranında yağimsı maddeler içerdiği bildirilmiştir (Watt ve Brandwijk, 1962).

Euphorbia candelabrum'un lateksi zehirli ok yapımında kullanılır. Bu bitkinin uyuşturucu etkileri vardır. Doğu Afrikada, resin ve euphorbon içeren lateks, göz tümörlerine uygulanır.

Euphorbia clovarioides'in lateksi Afrikada, kanser ağrılarında ve yaralara uygulanır. Bu bitkiden, şişen ayaklar için hazırlanan banyolara losyonlar hazırlanmıştır. Ayrıca bu lateks yapıştırıcı yapımında da kullanılır.

Euphorbia heliscopia lateksinin yaraları iyileştirmede kullanıldığı söylenir ve bu etkinin tahriş edici resin olan euphorbondan geldiğine işaret edilir. Bu bitkinin toksik kaynağının euphorbindir. Fernandes (1947)'e göre, İspanyada bitki gövdesinin % 0,295

ve köklerin % 0,074 oranında kauçuk içerdiği bulunmuştur. Bitki antibakteriyel testlere karşı negatif sonuç vermiştir ve zehirsiz görünmektedir (Watt ve Brandwijk, 1962).

Euphorbia hirta bitkisinden hazırlanan infuzyon Portekiz’de, Doğu Afrika’da mide ağrıları ve dizanteri için kullanılırken, Hindistan’da kökleri yılan ısırıklarına karşı kullanılır. Bushnell (1950) ‘e göre Hawaii’de bitki müshil, gargara ve yara lapası olarak kullanılır ama bakteriyel etki testlerine negatif sonuç vermiştir. Bitki hidrosiyamik asit üretir. Bitkinin lateksi euphorbon içerir. Kuru bitkide gallik asit, fenolik bir bileşik olan $C_{28}H_{18}O_{15}$ ve bir alkol olan euphoster ($C_{25}H_{39}OH$) ve az miktarda alkaloid bulunmuştur (Watt ve Brandwijk, 1962). Bitki antibiyotik testlerine negatif sonuç vermiştir ama başka araştırmacılar 1:5’den 1:60’a seyreltilmiş özütlerde biraz antibiyotik etki saptamıştır.

Euphorbia hypericifolia, Anon (1939)’a göre Angola’da tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Doğu Afrika’da lateksi temizleyici ve deri lezyonlarında kostik olarak kullanılır. Lateksin resin ve euphorbon içerdiği düşünülmektedir. Bitki fenolik bir madde, uçucu yağ ve az miktarda alkaloid ve glukozid taşır (Watt ve Brandwijk, 1962).

Euphorbia neriiifolia’da Angola’da medikal amaçla kullanılmaktadır ama ayrıntıları bilinmemektedir. Bitki lateksi kulak ağrılarını, öksürük ve astımı iyileştirmek için kullanılır.

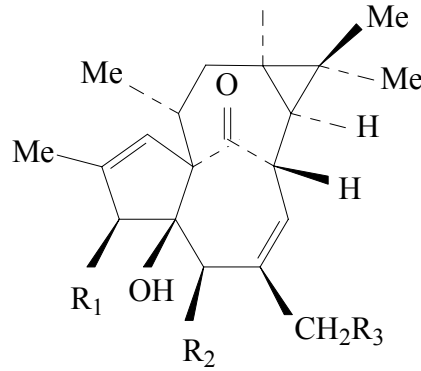
Euphorbia pulcherrima, Güney Afrika’nın tarım alanlarında ekzotik olarak yetiştirilir. Lateksi çok tahriş edicidir. Kabukları, dalları ve kökünün önemli derecede toksiktir. Bitki antibakteriyel testlere olumsuz sonuç vermektedir. Bitkinin az miktarda alkaloid içerdiği bulunmuştur.

Euphorbia tirucalli, Rodos’un güneyinde en bilinen kauçuk kaynağıdır. Lateksi deri için oldukça tahriş edicidir. Deri veya göz yuvarlağındaki bir kesiğe değerse çok yakar ve acı verir. Ancak göz yuvarlağı üzerinde deridekinden daha fazla tahriş edicidir ve günlerce süren geçici körlüğe sebep olabilir. Ayrıca, 0,4 mL lateksin %10’luk çözeltisi, ağız yoluyla farelere verildiğinde deneklerin öldüğü gözlenmiştir. İnsanlarda da bu etkinin aynısı gözlenir. Sulu özütlerin antibiyotik testleri *S. aureus* ile pozitif, *E. coli* ile negatif sonuç vermiştir. Bitkiden pentasiklik bir triterpenoid olan taraksasterol izole edilmiştir (Watt ve Brandwijk, 1962).

En yaygın tür olan *Euphorbia*, çok sayıda bioaktif bileşiklerin kaynağıdır. Tiglian, ingenan ve dafnan diterpenlerinden dolayı deriyi tahriş eder ve tümör oluşumunu önler. Kimyasal farklılığı ve bioaktifliği sebebiyle makrosiklik diterpenlere

çok önem verilmiştir. *Euphorbia* türleriyle yapılan son çalışmalarda, çok sayıda yeni diterpen sınıfları bulunmuştur. *Euphorbia* türlerinin, tahriş edici ve tümör önleyici bileşikleri diterpen esterlerini, inceleyen çok sayıda araştırma yapılmıştır (Hofmann ve ark., 1999).

Euphorbia türlerindeki tahriş edici etkinin diterpen esterlerinin ingenan iskeletinden kaynaklandığı gözlenmiştir (Şekil 2. 3).



Şekil 2. 3. İngenan diterpeninin iskelet yapısı (İngenol $R_1=R_2=R_3=OH$)

İran Azerbaycan'ında Saidabad çevresinden toplanan *E. seguieriana* bitkisinin balında, diterpen ingenol'un bir triaçilatı bulunmuştur. Bu bitkinin tahriş edici etkisinin bu bileşikten kaynaklandığı ve bu bileşiğin bala nektardan bal arıları tarafından taşındığı bulunmuştur. İngenol açılımları kanser önleyicidir (Upadhyay ve ark., 1980).

Euphorbia peplus bitkisiyle yapılan ayırma ve preparatif İTK çalışmasıyla, iki inflamatuvar etkiye sahip diterpen esteri bulmuşlardır. İlk bileşik 20-Deoxiingenol 3-O-angelat, diğeri ise ingenol 20- O- Oktanoat'tır (Rizk ve ark., 1985).

3. BİTKİ ÖZÜTLERİNİN OLASI ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASINDA KULLANILAN BAKTERİLER VE ÖZELLİKLERİ

3. 1. *Escherichia coli*

3. 1. 1. Genel Bilgiler

Escherichia cinsi içinde en önemli tür *Escherichia coli* 'dir. *E. coli* basil şeklinde yani boyu eninden daha uzun 2-6 mm boy ve 1-1.5 mm ende düz bakterilerdir.

Gram negatif, bazen hareketli, fakültatif anaerop, 1-2 mm çapında S tipi koloniler yapan bakterilerdir. Özellikle 44°C' de üremesi diğer bakterilerden (*Enterobacter* ve *Serratia*) ayrılmasını sağlar.

Dezenfektanlara, bazı boya (Malaşit yeşili, Füksin vb.) maddelerine, safra ve safra tuzlarına ve %7 NaCl ' e karşı duyarlı, fakat ısı ve soğuğa dirençlidir.

E. coli dışkı içinde bulunan bir bakteridir. Diğer bağırsak bakterileri gibi çeşitli antijenlere sahiptir.

3. 1. 2. Yaptığı Hastalıklar

Normal bağırsak bakterisi olarak memeliler ve kuşlarda bulunur. Bağırsak içinde kokuşma, mayalaşma ve beslenme ile ilgili işlemlerde yardımcı bir bakteri ve diğer bağırsak bakterileri ile dengeli olarak bulunan flora bakterisidir. Fakat canlılığının savunma gücünün azaldığı durumlarda doku ve kana yayılarak enfeksiyon etkeni özelliği taşır.

E. coli, bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklar şeklinde hastalık yapar.

Bağırsak dışı hastalıklar; *E. coli*, bağırsak dışına çıkarak dokulara geçebildiği zaman çeşitli enfeksiyonlara neden olur. Bunlar; üriner sistem, safra ve safra yolları enfeksiyonları, menenjit, peritonit, hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura, abse, sinüzit, otit ve yara enfeksiyonlarıdır (Unat, 1982).

3. 1. 3. Tedavi

E.coli oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C sıcaklıkta 30 dakika, oda sıcaklığında uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa dirençlidir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir. Malaşit yeşili, Brilliant yeşili ve fuksin gibi boyalar, safra, safra tuzları, sodyum tetraiyonat, bizmut sitrat, sodyum sülfat, sodyum dezoksikolat selenit tuzlarına karşı dirençleri Salmonella ve Shigella gibi bakterilere göre daha azdır. Bu maddeler belli konsantrasyonlarda besiyerlerine konularak *E. coli* basillerinin inhibisyonu ile birlikte buldukları Salmonella ve Shigella'lar için ayırteci ve çoğaltıcı özellikler kazandırır (Beyhan, 1999).

Tedavi antibiyotiklerle olur. Fakat direnç çok sık karşılaşılan bir problem olduğu için antibiyogram testi yapıldıktan sonra duyarlı antibiyotikler seçilerek tedavi yapılmalıdır.

3. 2. *Pseudomonas aeruginosa*

3. 2. 1. Genel Bilgiler

Pseudomonas aeruginosa, sporsuz, kapsülsüz çomakçıklardır. Çoğu kez bir uçlarında bir veya nadiren iki veya üç adet kirpiği vardır ve çok hareketlidirler. Gram negatif, 1.5 - 3 mm uzunluğunda ve 0.5 mm genişliğinde, çiftli veya kısa zincirler halinde görülen bakterilerdir. Genellikle 30 – 37 °C' lerde ürer. 41 °C' de üremesi *P. fluorescens*'den ayrılmasını sağlar. Buyyonda yüzeyde zar yaparak yoğun ve homojen bir üreme gösterir ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti belirir. Eski kültürleri zamanla alkali olduğundan bakteriler eritici fermentlerin etkisiyle erirler ve buyyon berrak hale dönüşür.

Pigmentleri oksijensiz ortamda görülmez, oda ısısı ve etüvde daha iyi oluşur. Genelde pyocyanin ve pyoverdin veya fluorescein olmak üzere iki tip boya özelliği vardır. Pyocyanin; suda ve kloroformda erir, mavimsi renk oluşturur ve *P. aeruginosa* türüne özgüdür. Pyocyanin maddesinin antibiyotik özelliği bulunur. Bu nedenle *Brucella*, *Shigella*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella*, *Vibrio* gibi mikroorganizmalara bakteriyostatik etki yapar.

Doğada yaygın olarak bulunabilen bir bakteri olduğu için, organik maddeler içinde, sularda uzun süre canlı kalabilirler. İnsan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunur. Yüksek ısı ve kuruluğa dirençsizdirler. Hastane ortamları organik madde (kan, irin, deri döküntüleri) yönünden zengin olduğu için ve direnç gösteren kökenlerin bu ortamlarda daha fazla oluşması nedeniyle sık rastlanılan bir patojen olarak görülür (Akman ve Gülmezoğlu, 1976).

3. 2. 2. Yaptığı Hastalıklar

Pseudomonas aeruginosa türünün proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikli hücre dışı salgılarının olması ve fırsatçı patojen özelliğinin

bulunması çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olur. *Pseudomonas* türleri idrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilirler.

3. 2. 3. Tedavi

Tedavi antibiyotikler ile yapılır. *Pseudomonas* türleri çabuk dirençli duruma geçebildikleri için üretildiği kültürlerden izole edildikten sonra antibiyogram testi yapılarak kullanılacak antibiyotik kararı verilmelidir. Genel olarak betalaktamlar, aminoglikozidler, kinolonlar ve sefalosporinler etki edici antibiyotiklerdir (Beyhan, 1999).

3. 3. *Staphylococcus aureus*

3. 3. 1. Genel Bilgiler

Staphylococcus aureus pigmentli, fakültatif anaerop çoğunlukla aerop üreyen, koagülaz ve hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehaloz' dan asit yapabilen, % 10 NaCl' de üreyebilen, alfa toksin yapan, Novobiocin' e duyarlı, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdür. Lizozim etkisiyle erimez. İnsan ve sıcak kanlı hayvanlarda gıda zehirlenmesi ve piyojenik enfeksiyonları yapabilen bir stafilokoktur. Doğada her yerde yaygın olarak bulunur.

Stafilokok türleri basit besiyerlerinde üreseler de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve kolonilerinin etrafında tam hemoliz meydana getirir. 37 °C de ve pH 7,4 de iyi ürer. Jeloz besiyerinde ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1 - 2 mm çapında koloniler yapar. *Staphylococcus aureus* altın sarısı renginde pigment oluşturur.

Isıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre daha dayanıklı oldukları gibi *Stafilokok* türleri hızla kemoterapötiklere direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen kökenler haline dönüşürler.

Stafilokok türleri; koagülaz, deoksiribonukleaz, lipaz, hiyalüronidaz, stafilokinaz, betalaktamaz ve antifagositik maddeler gibi enzim yapısında maddeler

salgılarları. Toksinleri ve enzim yapısındaki maddelerin etkisiyle çeşitli enfeksiyonların oluşmasına neden olurlar (Brooks ve ark., 1998).

3. 3. 2. Yaptığı Hastalıklar

Stafilokok enfeksiyonları; deri ve mukoza da oluşan enfeksiyonlardır ki bunlar; abseler, fronkül (sivilce), sikozis (sakal ve kıl kökü iltihabı), kan çıbanı (carboncule), panaris (dolama), hidroadenit (ter bezi iltihabı), biefarit (göz kapağı iltihabı), bademciklerin iltihaplanması, farenjitler, peritonsiller abse ve anjinler sayılabilir. Deri döküntülü hastalık olarak toksik şok sendromu görülebilir. Sepsis, endokardit, pnömoni, gıda zehirlenmesi ve enteritler yaptıkları diğer hastalıklardır. *Stafilokok* enfeksiyonlarından sonra bağışıklık meydana gelmez.

3. 3. 3. Tedavi

Stafilokok türleri oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 ° C'da 30 dakika bekletilmekle öldükleri halde *stafilokoklar* bir saat sonra bile canlılıklarını muhafaza edebilirler. Aynı şekilde sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklılıkları da fazladır. Bazı dezenfektanların alışıl gelmiş konsantrasyonlarına dayanabilirlerse de kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların, düşük konsantrasyonları dahi onları öldürebilmektir. Genel olarak sofonamid ve antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre dayanıklı oldukları gibi, *stafikoklar* kemoterapötiklere direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen suşlar haline dönüşürler (Bilgehan, 1995).

Stafilokok enfeksiyonlarında tedavi antibiyotikler kullanılarak yapılır. Antibiyogram testi yapılarak uygun antibiyotik seçilir. Metisiline dirençli *stafilokok* enfeksiyonları çoklu direnç göstermeleri ve hastane kaynaklı olmaları nedeniyle önemlidir. Metisiline dirençli olan *stafilokoklar*; Nafcillin, Oksacillin ve Sefalosporinler dahil tüm betalaktam antibiyotiklere ve ayrıca Gentamycin, Tobramycin gibi aminoglikozidlere, Tetrasiklin, Sulfamethoprim, Ciprofloxacın ve Clindamycin'e de dirençli olabilecekleri için tedavide Vancomycin veya onunla birlikte Rifampin kullanılabilir (Beyhan, 1999; www.mikrobiyoloji.org)

3. 4. *Enterococcus faecalis*

3. 4. 1. Genel Bilgiler

Gram (+) koklar içinde katalaz olumsuz olanlar arasında en geniş grubu Streptokoklar oluşturur. Bugüne kadar *Streptokok* türlerinin sınıflandırılmasında çeşitli yöntemler uygulanmıştır (Şenel, 1999)

Lancefield sınıflandırmasında *Streptokok* türleri içerdikleri polisakkarit yapısındaki C antijenik maddesine göre A, B, C, D,,S diye serolojik gruplara ayrılır. Sherman sınıflandırmasında ise hemoliz yapıp yapmamalarına, üreyebildikleri sıcaklık derecelerine, bazı biyokimyasal özelliklerine göre 4 gruba ayrılırlar.

- 1- Piyojenik *streptokok*
- 2- Viridans *streptokok*
- 3- Laktik *streptokok*
- 4- *Enterokok* (Serter ve Bilgehan, 1968).

E. faecalis, Lancefield'in D grubundadır ve Sherman'ın dördüncü grubunun üyesidir. *E. faecalis* pnömokok türlerine benzeyebilir, diplokok ve kısa zincirler yapar. Bu bakteri adi besiyerinde, ayrıca 10-45⁰ C'da, % 6,5 NaCl'li buyyonda, pH 9, 6'da ürer ve % 0,1 metilen mavili sütü indirger. Karbonatlı tamponlu ortamda pH 10-10,5' de bile çoğalır. Bu bakteriler % 0,4 tellüritli ortamda ürer ve tellürü açığa çıkarırlar. Safra-eskülin reaksiyonu pozitifdir.

E. faecalis dirençli bir bakteridir. 60⁰ C'da 30 dakika ısıtılmaya dayanıklıdır. Soğuk ve nemli toprakta 12 hafta canlı kalır; fakat donma ve sonra yeniden erime durumları ömrünü azaltır (Unat, 1982).

3. 4. 2. Yaptığı Hastalıklar

Enterokok türlerinin 12 türünden en sık enfeksiyonlara neden olanı *E. faecalis*'tir. *Enterokok* enfeksiyonlarının % 85-90'ı *E. faecalis*'ten kaynaklanır. Bu bakteri genelde hastanelerde bir hastadan diğerine medikal araçlarla bulaşır ve gastrointestinal bölgede taşınır.

E. faecalis yetişkinlerde endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, kolesistid, nadiren menenjit, septisemi gibi enfeksiyonlar yapabilir. Safra yolu enfeksiyonlarında *E. coli* türünden sonra gelir (Brooks ve ark., 1998).

3. 4. 3. Tedavi

Enterokok türleri, antibiyotiklerin ve kimyasal tedavi etkenlerinin çoğuna dirençlidir. Penisilin bunların üremesini çoğu kez önleyebilirse de, aminoglikozitlerle birlikte olmadıkça öldüremezler (Akman ve Gülmezoğlu, 1976).

4. DENEYSEL BÖLÜM

4. 1. Materyal

4. 1. 1. Bitkisel Materyal

Euphorbia sequieriana bitkisi Nisan 2001'de Çanakkale, İntepe yerleşim bölgesine yaklaşık 1 km uzaklıktaki kayalık yamaçlardan toplandı. Gölgede kurutuldu. Thomas Willey 4 markalı değirmende öğütüldü (Tarım il Müdürlüğü Laboratuvarı).

4. 1. 2. Kimyasal Materyal

Özütleme işlemleri için n-hekzan, petrol eteri, metanol (Merck) ve saf su kullanıldı. İTK için slikajel kaplı Aluminyum plaklar (DC alufolin Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) kullanıldı.

Ayırma işlemlerinde, hekzan, diklormetan, etilasetat ve butanol kullanıldı. Merck firmasından temin edildi.

Nitel analiz işlemleri için Riedel-de Haen firmasından alınan dietileter, etanol, aseton ve Merck firmasından alınan metanol, asetik anhidrit, kloroform, sülfürik asit, antimontriklorür, hidroklorik asit, metalik magnezyum, amonyak, sodyum hidroksit, demir (III) klorür kullanıldı.

4. 1. 3. Mikroorganizmalar

Bakteri suşları İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden tüpler içerisinde besiyerlerine pasajlanmış olarak temin edildi.

| | |
|----------------------------------|------------|
| 1. <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 |
| 2. <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |
| 4. <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 |

4. 1. 4. Besiyerleri

Katı besiyerlerinin hazırlanmasında Mueller Hinton Agar (Merck), sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında Mueller Hinton Broth (Merck) kullanıldı.

4. 1. 5. Antibiyotikler

Gentamisin antibiyotik diski (10 µg /disk) (Oxoid) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

4. 1. 6. Diskler

Disk Difüzyon Testinde 6 mm çaplı diskler kullanıldı (Oxoid).

4. 1. 7. Gereçler

Sterilizasyon işlemleri için Nüve OT-O12 markalı otoklav kullanıldı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı.

İnkübasyon işlemleri için Nüve EN 400 markalı etüv kullanıldı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü.

Tartımlar için Sartorius GP 603S markalı elektronik terazi kullanıldı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü.

Isıtma işlemleri için Electrothermal EM0100 markalı mantolu ısıtıcı kullanıldı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü.

Deney düzenekleri ve cam malzemeler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden temin edildi.

4. 2. Yöntem

4. 2. 1. Özüt Elde Edilmesi

Çanakkale, İntepe yöresinden toplanan *Euphorbia sequieriana* bitkisinin toprak üstü kısımları, gölgede kurutulduktan sonra toz haline getirildi. Soxhlet aparatı ile farklı çözücüler kullanılarak tüketildi.

4. 2. 2. Metanol özütünün elde edilmesi ve fraksiyonlanması

50 g *Euphorbia sequieriana* bitkisi Soxhlet düzeneğinin ekstraktör kısmına yerleştirildi. Balon yarısına kadar metanol ile doldurulduktan sonra tüketmeye başlandı. Çözücü ısıtıcı ile muntazam kaynatıldı. Sifondan akan sıvının rengi tamamen açılıncaya kadar tüketmeye devam edildi. İşlem tamamlanınca, çözücü indirgenmiş basınçta tamamen uzaklaştırıldı.

Bu işlemler sonunda 8,3 g özüt elde edildi. Total metanol özütünün antibakteriyel etkilerinin araştırılması için 0,5 g özüt bir flakona alındı. Özütün kalanı 40 mL saf su ile çözülerek, bir ayırma hunisine alındı. Polarlıklarına göre, n-hekzan diklormetan, etilasetat, n-butanol ile özütleme yapıldı. Her çözücü ile 3 kez aynı işlem tekrarlandı. Bir araya toplanan özütlerin çözücüleri indirgenmiş basınçta uzaklaştırılarak tamamen kuruması sağlandı. Elde edilen 4 fraksiyonların miktarları hesaplandı.

4. 2. 3. Besiyeri ve Bakterilerin Hazırlanması

4. 2. 3. 1. Besiyerlerin Hazırlanması

Bu çalışmada bakterilerin gelişimi için genel amaçlı bir besiyeri olan Muller Hinton Agar ve Muller Hinton Broth kullanıldı. Mueller Hinton Agar 17 g tartılarak

500 mL destile suda, Muller Hinton Broth 15 g tartılarak 500 mL destile suda çözüldü. Hazırlanan berrak karışımlar otoklavda steril edildi. Mueller Hinton Agar petri kaplarına her biri 25 mL olacak şekilde döküldü, oda sıcaklığında katılaştırıldı.

4. 2. 3. 2. Bakterilerin hazırlanması

Bu çalışmada, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* bakterileri kullanıldı. Çalışma sırasında oda sıcaklığına getirilmiş bakteri kültürlerinden Mueller Hinton Agarlı petrilere pasaj alınıp 37° C'da bir gece inkübe edildi. Böylece taze bakteri kültürü kullanılmış ve bakterilerin saflıkları kontrol edilmiş oldu.

4. 2. 4. Disk Difüzyon Yöntemi

Taze bakteri kültürlerinden, uygun 4-5 koloni seçilip, içinde Muller Hinton Broth besiyeri bulunan tüplere bırakıldı. 3-4 Saat inkübe edildi. Oluşan besiyerinin bulanıklığı 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına (1×10^8 CFU/mL) ayarlandı. Mc Farland standart tüpü sülfürik asidin 99 mL'sine 0,5 mL baryum sülfat katılarak hazırlandı. Metanol özütünün dört fraksiyonundan üçünün 5mg/25µL ve 1mg/ 25µL' lik konsantrasyonları hazırlandı. n-Hekzan fraksiyonu çözülemediği için istenilen konsantrasyonlar hazırlanamadı.

---Konsantrasyonların hazırlanması :

Fraksiyonların miktarı; diklormetan: 0.220 g; etilasetat: 0.590 g; butanol: 0.910 g olarak ölçüldü. Metanol özütünden 0.50 g alındı.

220 mg diklormetan fraksiyonu 1100 µL metanolde çözülerek 5mg/25µL'lik konsantrasyon hazırlanmış oldu. Aynı yöntemle etilasetat fraksiyonu 2950 ; Butanol fraksiyonu 4450 ; Metanol ekstraktı 2500 µL metanol ile çözülerek 5mg/25µL'lik konsantrasyonlar hazırlandı.

1mg/ 25 µL'lik konsantrasyonlar ise 5mg/ 25 µL'lik numunelerden seyreltmeler yapılarak hazırlandı.

8 tane petri kapı hazırlandı. Kağıt diskler üzerine fraksiyonların istenilen konsantrasyonlarından 25 µL emdirildi, kuruyana kadar beklendi. Gentamisin

antibiyotiği emdirilmiş disk pozitif, 25 µL metanol özütü emdirilmiş disk negatif kontrol olarak kullanıldı.

Sıvı besiyerinde üretilen ve bulanıklığı 0,5 Mc Farlanda ayarlanan bakteriler pamuklu silgiç yardımıyla petri kaplarının üzerine iyice yayıldı. Yayıma işleminde sonra bir süre kurumaya bırakıldı. Sonra agar yüzeyine özüt emdirilmiş diskler planlandığı gibi dış çeperden en az 14 mm, birbirlerinden en az 25 mm ayrı olacak biçimde steril pensin ucuyla iyice bastırılarak yerleştirildi.

Bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C 'de inkübatöre ters şekilde konuldu. Bir gece boyunca inkübe edildi.

4. 2. 5. Zon çapı ölçümü

Bir gecelik inkübasyon süresinden sonra disk çevresinde oluşan zonların çapları ölçülerek tabloya kaydedildi.

4. 2. 6. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerlerinin saptanması

Bu işlemler, disk difüzyon testine göre; etkin olduğu gözlenen fraksiyonlar için uygulandı. Eldeki özütün antibakteriyel etkinliğinin araştırılması için 1×10^8 CFU/mL'ye ayarlanmış bakteri suspansiyonu kullanıldı. Yaklaşık olarak 10 x10 mm boyutlu steril tüplerden 3 dizi oluşturuldu.

Dizide, ilk tüp dışındaki tüplere 0.5 mL besiyeri konuldu. İlk tüpe 900 µL besiyeri ve üzerine 100 µL özüt eklendi. Tüpten tüpe 500 µL'lik aktarmalar yapılarak çift kat seyreltmeler yapıldı. Son tüpten bir önceki tüpte seyreltme işleminde yapılmadan alınan numune dışarı atıldı. Tüplerden birine negatif kontrol olması için 1000 µL besiyeri bırakıldı.

Son olarakta, hazırlanan bakteri süspansiyonundan birinci tüpten son tüpe kadar 500 µL eklendi ve 37° C' de bir gece inkübe edildi. Son tüp (500 µL besiyeri ve 500 µL bakteri) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu işlemler metanol , diklormetan ve butanol için uygulandı.

Üremenin olup olmadığı tüpler belirlendi. Üremenin görülmediği en düşük özüt konsantrasyonu MIC olarak alındı. Üreme göstermeyen tüplerden ayrı ayrı 10 µL alınıp agarlı petri kaplarına yayıldı. 37° C’da bir gece inkübasyona bırakıldı, üreme görülmeyen en düşük özüt konsantrasyonu MBC olarak alındı.

4. 2. 7. Nitel Analiz (Civlel, 1982)

50 g toz halindeki bitki numunesi sırasıyla dietil eter, metanol ve saf su ile Soxhlet cihazında özütleme işlemine tabi tutuldu. Tüm özütler 50 mL’ye kadar değiştirildi. Her bir özüt içerdiği bileşik sınıflarının tespiti için ayrı ayrı incelendi. Aşağıda her bir özüt için yapılacak işlemler ayrıntıları ile anlatılmıştır (Şekil 4. 1).

Eter özütünden alınan 10 mL’lik bir numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Eğer kalan hoş kokulu ve yağimsı bir görünüme sahipse tekrardan az bir miktar etil alkolde çözüldü. Alkol tekrar uçurularak, numune kurutuldu. Bitkimizde uçucu yağların varlığını tespit etmek için, kalan kısmın karakteristik bir hoş kokuya sahip olup olmadığı incelendi.

Eter özütünden alınan 10 mL’lik bir numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Üzerine 1 mL asetikanhidrit katılarak çözüldü ve 1-2 mL kloroform ilavesiyle çözelti seyreltildi. Çözelti bir deney tüpüne aktarılıp ve pipet yardımıyla tüpün dibine kons.sülfürük asit eklendi. Numune çözeltisiyle sülfürük asit çözeltisinin temas yüzeyindeki kahverengi-kırmızı veya mor renkli bir halka oluşup oluşmadığı gözlenerek, sterol veya terpen varlığı araştırıldı.

Eter özütünden alınan 10 mL’lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Üzerine antimontriklorürün doymuş çözeltisi eklendi. Önce mavi sonra kırmızı renk gözlenmesi, kons.sülfürük asit ilavesiyle siyahımsı-yeşil bir rengin oluşması gözlenerek karotenlerin varlığını araştırıldı.

Eter özütünden alınan 10 mL’lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Üzerine potasyum hidroksitinin etil alkoldeki (10 mL 0,5 N) çözeltisi ilave edildi. Sıvı yüzeyindeki yağ damlacıkları kaybolana kadar su banyosunda reflux edildi. Sonra bir evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırılıp ve sıcak destile suda (15-20 mL) çözülerek bir ayırma hunisine aktarıldı. 10 mL’lik eter ilavesi ile 4 kez özütlendi. Sulu çözelti ayrılıp ve kons. hidroklorik asit ile pH = 3-4 olana kadar asitlendirildi. Böylece yağ asitlerinin alkali tuzları oluşturuldu. Asidik sulu çözelti tekrar bir ayırma hunisine

aktarıp eter ile (8-10 mL) 3 kez özütlendi. Böylece yağ asitlerinin alkali tuzları eter fazına geçti. Eter özütü kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Geriye yağimsı bir maddenin kalıp kalmadığı gözlenerek, yağ asitlerinin varlığı araştırıldı.

Eter özütünden alınan 10 mL'lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalan 1,5 mL % 2'lik hidroklorik asit ile çözüldü. Elde edilen çözelti üç tüpe, eşit hacimde bölündü. Birinci tüpte 0,5 mL asidik çözelti bulunurken, diğer tüplerden birine 2-3 damla Bertrand reaktifi, diğerine 2-3 damla Mayer (1,35 g civa II klorür 50 mL su ile çözülür sonra çözeltiliye 5 g KI ilave edilip su ile 100 mL'ye seyreltilir) reaktifi damlatıldı. Matlaşma ve beyazımsı-sarı çökelek oluşup oluşmadığı gözlenerek, alkaloidlerin varlığını araştırıldı.

Eter özütünden alınan 5 mL'lik numune üzerine 1 mL % 25'lik amonyak eklendi. Kırmızı renk oluşup oluşmadığı izlenerek, emodollerin varlığı araştırıldı.

Eter özütünden alınan 5 mL'lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Sıcak suda çözülüp soğutuldu. İkiye ayrılarak bir tanesi referans olarak saklandı. Diğerinin üzerine 1 mL %10'luk amonyak çözeltisi eklendi. UV ışığı altında yeşil-mavi renkte bir floresans verip vermediği gözlenerek, kumarin varlığı araştırıldı.

Alkol özütünden alınan 1 mL'lik numune 2 mL su ile seyreltildi. Çözelti üzerine sey. demir (III) klorür çözeltisi ilavesi ile siyahımsı mavi veya siyahımsı yeşil renk oluşumu gözlenerek, tanenlerin varlığı araştırıldı (Siyahımsı mavi-renk gallik tanenlerin, siyahımsı-yeşil renk kateşol tanenlerin varlığına işaret eder).

Alkol özütünden alınan 1 mL numune 1-2 mL su ile seyreltildi. Üzerine 1 mL Fehling (I+II) çözeltisi eklenip ısıtıldı. Kiremit kırmızı renkli bir çökelti oluşması izlenerek indirgeyici bileşiklerin varlığını araştırıldı.

Alkol özütünden 20 mL'lik numune bir kapsüle alınıp, sıcak-su banyosunda buharlaştırıldı. 5-10 mL, % 10' luk hidroklorik asit kalıntı üzerine eklendi. Amonyak çözeltisi ile (% 10' luk, pH = 8 -9) sulu çözeltildeki alkaloidler, çöktürülüp eter ile özütlendi. Eter çözeltisi kapsülde kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı 1,5 mL, % 2'lik hidroklorik asit ile çözüldü. Üç tüpe eşit, hacimde aktarıldı. Bir tüp referans olarak bırakıldı. Diğerine Mayer, üçüncü tüpe de Bertrand reaktifi eklendi. Matlaşma veya sarımsı-beyaz çökelek oluşup oluşmadığı gözlenerek alkaloidlerin varlığı araştırıldı.

25 mL alkol özütü hidroliz edildi. Hidrolizden sonra, ayırma hunisinde etil eter ile 3 kez özütleme yapıldı. Özütler toplandı.

Eter özütünden alınan 4 mL'lik numune üzerine % 25' lik 2 mL amonyak çözeltisi eklendi. Koyu kırmızı renk oluşup oluşmadığı gözlenerek emodol varlığı araştırıldı.

Eter özütünden alınan 5 mL'lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve 2-3 mL suda çözülerek iki tüpe aktarıldı. Tüplerden birisine 0,5 mL % 10'luk amonyak çözeltisi eklendi ve UV ışığı altında diğer tüple birlikte kontrol edildi. Mavi veya yeşil bir floresans göstermesi izlenerek, kumarin sınıfı bileşiklerin varlığı araştırıldı.

Eter özütünden alınan 10 mL'lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kalıntı üzerine 0,5 mL asetik anhidrit ve 0,5 mL kloroform eklendi. Çözelti iki ayrı tüpe aktarıldı ve kons. sülfürik asit pipetle tüpün dibine aktarıldı. Temas yüzeyinde kırmızı-kahverengi ve morumsu-kahverengi halka oluşup oluşmadığı gözlenerek steroid yada triterpenlerin varlığını araştırıldı.

Eter özütünden alınan 5 mL' lik numune kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve metil alkolde çözüldü. Küçük bir parça metalik magnezyum ve 5-6 damla kons. hidroklorik asit ilave ile kırmızı veya turuncu renk oluşup oluşmadığı gözlenerek flavonoid varlığı araştırıldı. Asidik çözeltinin rengi eğer kırmızı ise ve ortama der. sodyum hidroksit çözeltisi ilavesi ile önce viyole sonra yeşil veya maviye dönüşüp dönüşmediği gözlenerek antosiyan varlığı araştırıldı.

Sulu çözeltinin 2 mL 'si içinde 10 mL alkol yada aseton bulunan test tüpüne aktarıldı. Kalın bir çökelti oluşup oluşmadığı izlenerek poliüronidlerin (pektin, müsilaj, sakız) bulunuşu araştırıldı.

Sulu çözeltinin 1 mL' si 1 mL su ile seyreltilip ve bir tüp içinde 15 dakika çalkalandı. En az 1 cm yüksekliğinde ve en az 15 dakika içinde yok olmayan köpük oluşumu gözlenerek saponinlerin varlığı araştırıldı.

4. 2. 8. Fraksiyonların renk reaksiyonları

Fraksiyonların içerikleri, İTK ve spesifik belirteçler kullanılarak belirlenmeye çalışıldı. Çözücü sistemi olarak CHCl_3 : EtOAc ve EtOAc: n-BuOH kullanıldı. İTK plaklarına n-BuOH, CH_2Cl_2 , EtOAc fraksiyonları ve MeOH özütü uygulandı (Şekil 4. 2).

UV lambası altında 254 nm ve 356 nm'de floresans veren lekeler işaretlendi. Plakaya Dragendorff reaktifi (1,7 g bazik bizmut nitrat ve 20 g tartarik asit 40 mL saf su

ile çözülür. Bu çözelti 16 g KI ve 40 mL su ile 1 saat karıştırılarak hazırlanan çözelti ile karıştırılır.) püskürtülüp daha sonra plak kurutulup ve 15 dakika sonra oluşan renkler kaydedildi. Kırmızı-turuncu lekeler alkaloid varlığını gösterir.

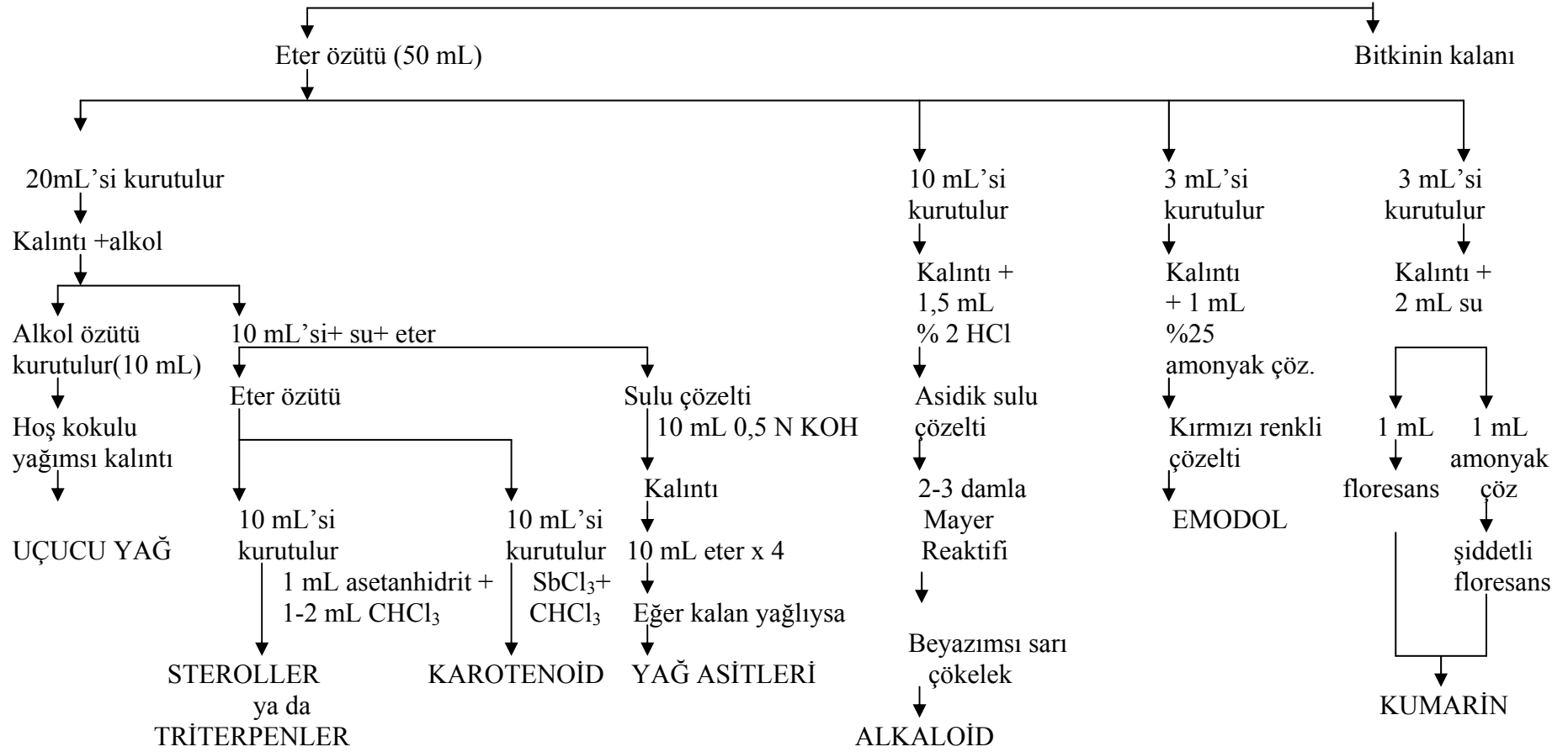
Fraksiyonların İTK' sı yapıldı. Plaka havada kurutulduktan sonra, kromatograma % 5'lik sulu bakırsülfat çözeltisi püskürtüldü, 105° C' de kurutuldu ve gün ışığında bakıldı. Sarı renk flavon, kahverengi flavonol, kırmızı renk ise antosiyan pigmentinin varlığını gösterir.

İnce tabaka kromatogramına 5 mL sülfonik asit, 10 mL konsantre asetik asit ile karıştırılıp püskürtüldükten sonra 5-10 dakika 130° C'da ısıtıldı. Ardından UV₃₆₅ nm'de kontrol edildi. Kromatogramda kırmızı-kahverengi, mavi-mor renkli floresans veren lekeler saponinlerin varlığını gösterir.

Vanilin'in metanoldeki % 1' lik çözeltisi, kromatograma püskürtüldükten sonra % 37'lik konsantre HCl püskürtüldü. Ardından plak etüvde 105-110° C'da 5-10 dakika ısıtıldı. Vanilin-HCl reaktifi ile kondanse tanenler turuncu-kırmızı renk alır.

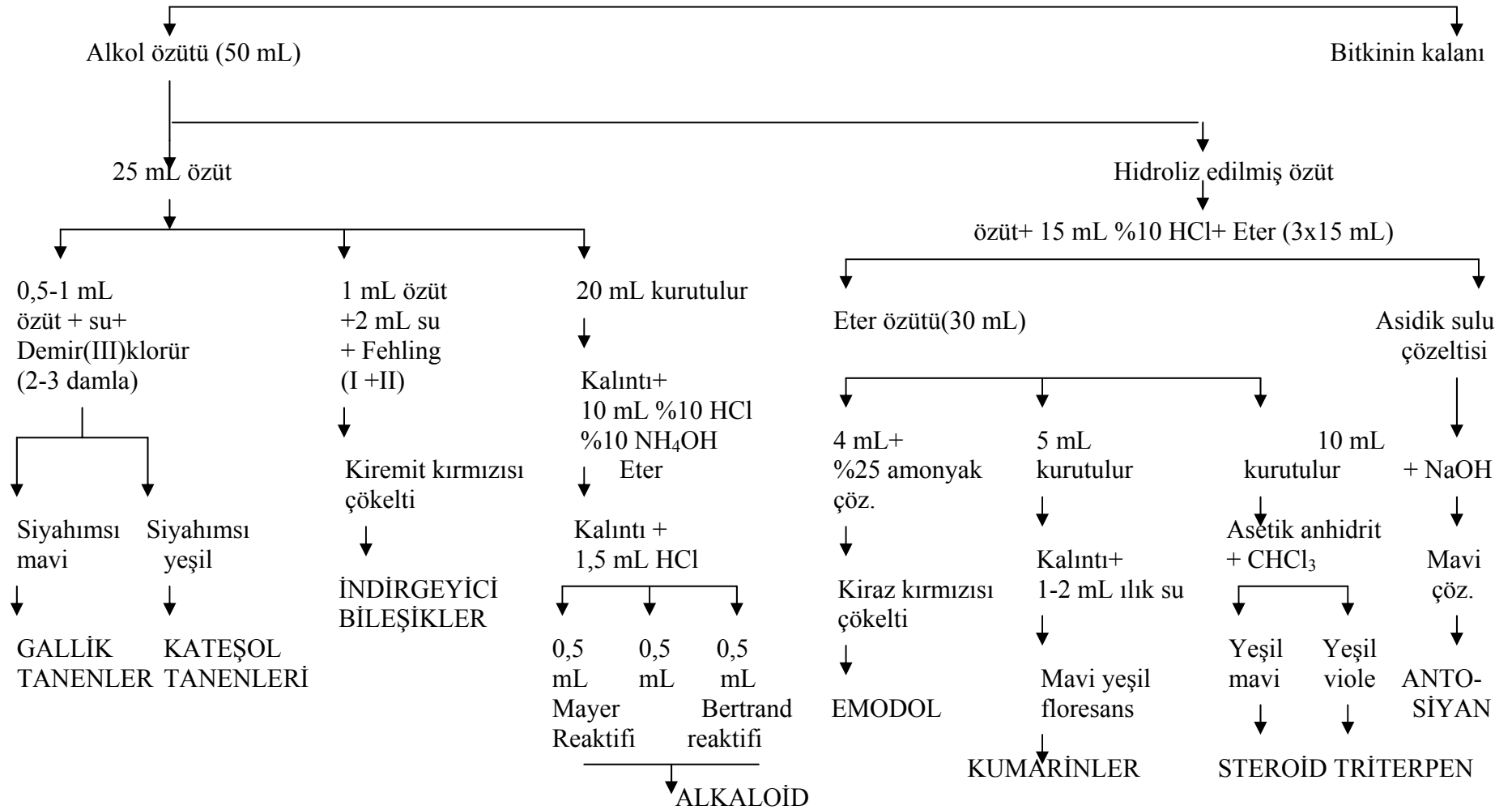
Kurutulmuş kromatogram üzerine, 1g vanilin + 100 mL kons H₂SO₄ ile hazırlanmış vanilin-sülfürik asit reaktifi püskürtüldü. Sonra etüvde 10 dakika 105-110° C'da ısıtıldı. Kromatogram üzerinde oluşan kırmızı kahverengi lekeler uçucu yağ ve terpenleri, mor-menekşe renkli lekeler iridoitlerin varlığını gösterir.

50 g bitki materyali eter ile tüketildi

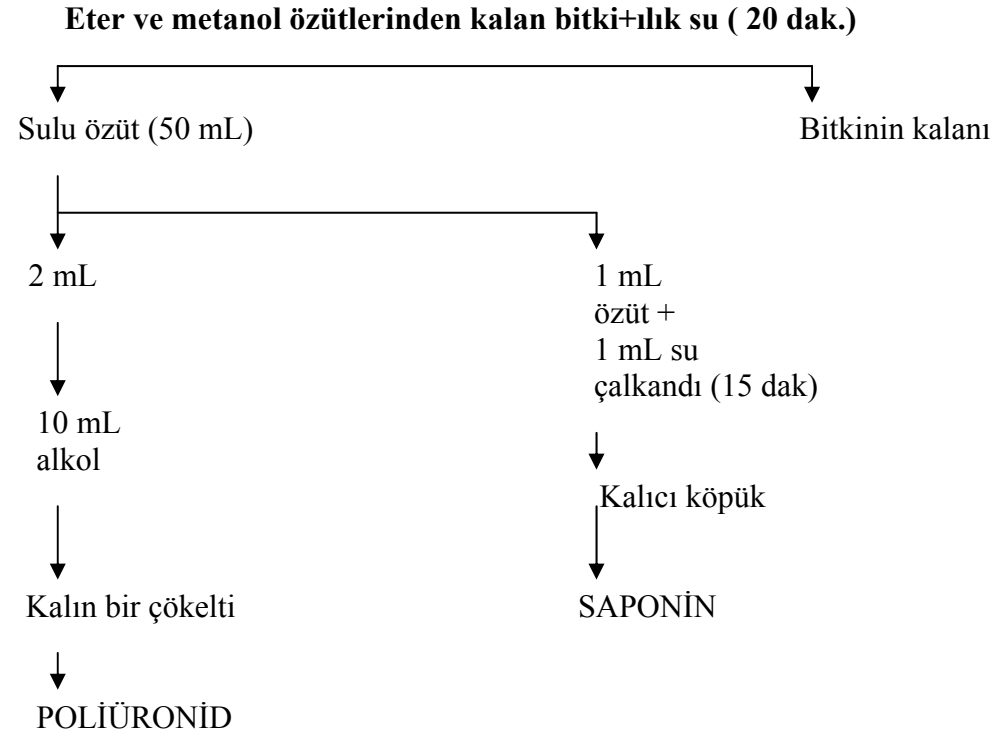


Şekil 4. 1. *E.seguieriana* bitkisine uygulanan nitel analiz işlemi

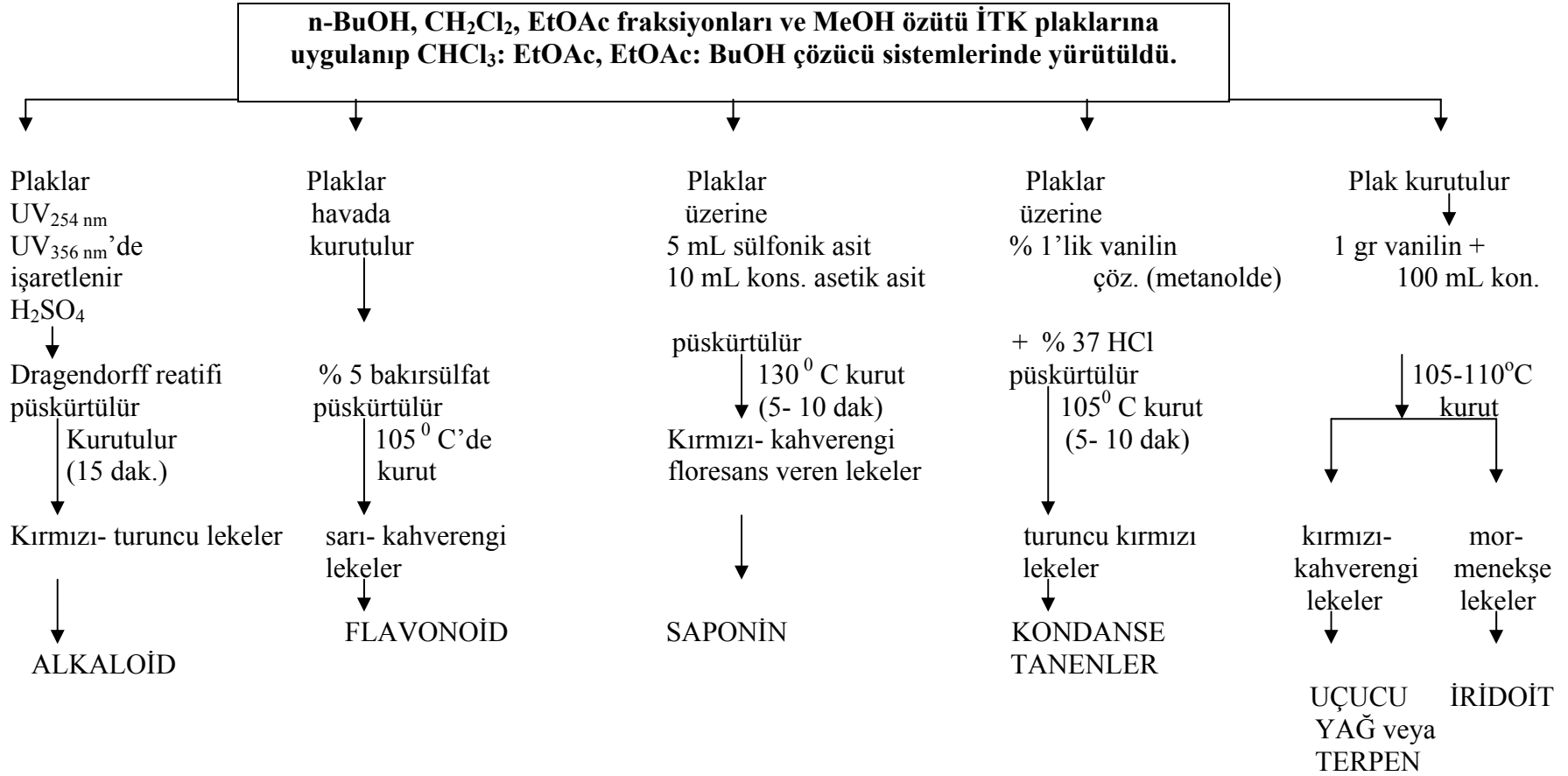
Eter özütünden kalan bitki + metanol ile reflux edilir (40 dak)



Şekil 4. 1. *E.seguieriana* bitkisine uygulanan nitel analiz işlemi (Devam)



Şekil 4. 1. *E.seguieriana* bitkisine uygulanan nitel analiz işlemi (Devam)



Şekil 4. 2. *E. Segueriana* bitkisinin metanol özütünden hazırlanan fraksiyonlarının renk reaksiyonları

5. BULGULAR

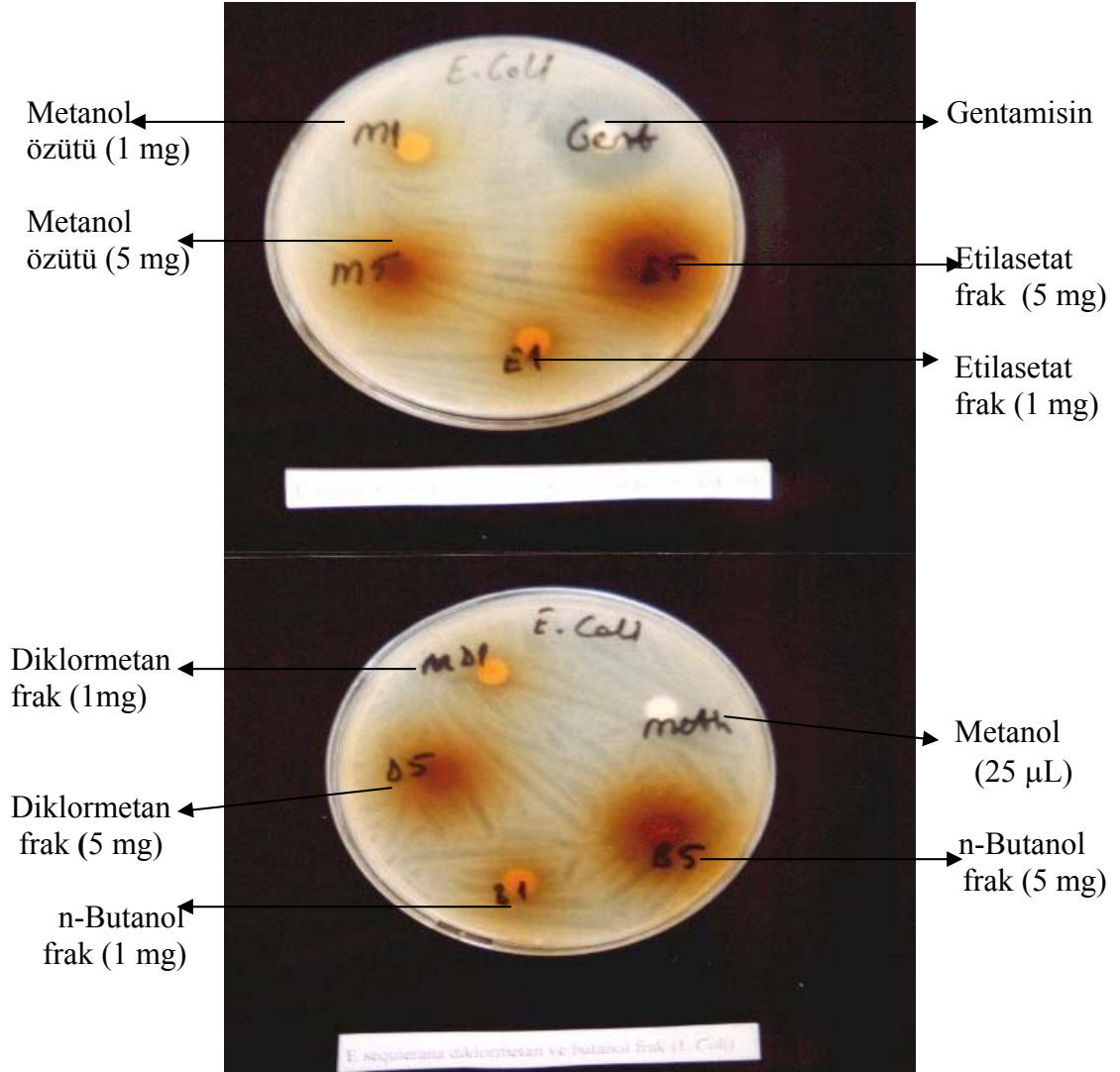
5.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Bölüm 4. 2. 4’de anlatıldığı şekilde yapılan deneylerden elde edilen inhibisyon zon çapları Çizelge 5.1’de verilmiştir. Deneyler en az üç defa tekrar edilip elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır.

Çizelge 5.1. Disk difüzyon testi sonuçlarında elde edilen inhibisyon çapları

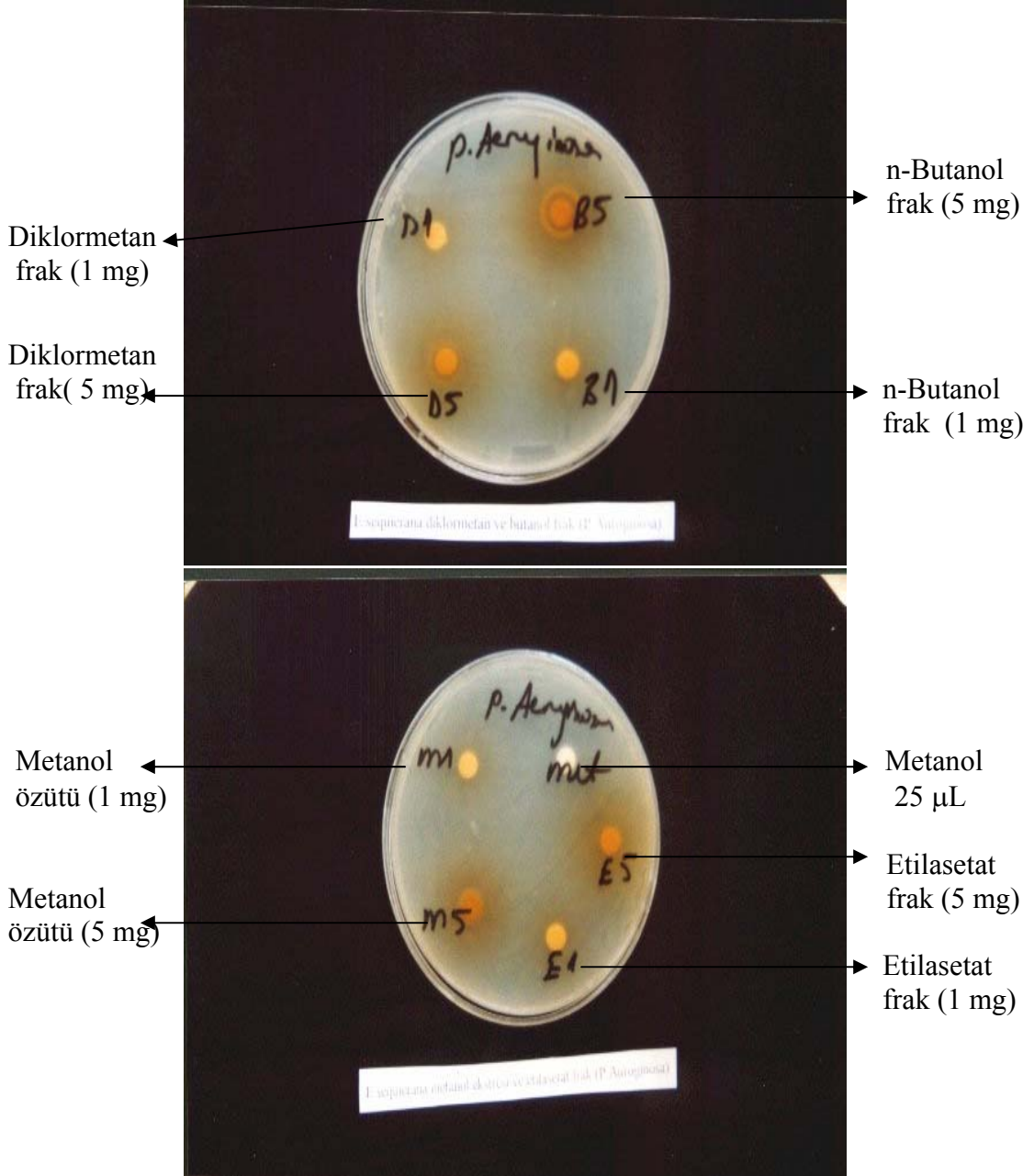
| | E. coli | | S. aureus | | E. faecalis | | P. aeruginosa | |
|---------------------------|------------|----------|------------|----------|-------------|----------|---------------|----------|
| | 1mg/25µL | 5mg/25µL | 1mg/25µL | 5mg/25µL | 1mg/25µL | 5mg/25µL | 1mg/25µL | 5mg/25µL |
| Metanol | -- | -- | -- | 18 mm | -- | -- | -- | -- |
| n-Butanol | -- | -- | 12 mm | 18 mm | -- | -- | -- | -- |
| Diklormetan | -- | -- | 10 mm | 16 mm | -- | -- | -- | -- |
| Etilasetat | -- | -- | 11 mm | 12 mm | -- | -- | -- | -- |
| | E. coli | | S. aureus | | E. faecalis | | P. aeruginosa | |
| Gentamisin (+ kontrol) | 10µg/ disk | | 10µg/ disk | | 10µg/ disk | | 10µg/ disk | |
| | 22 mm | | Denenmedi | | Denenmedi | | Denenmedi | |
| Metanol (- kontrol) | 25µL/ disk | | 25µL/ disk | | 25µL/ disk | | 25µL/ disk | |
| | -- | | -- | | -- | | -- | |
| n-Hekzan | Çözülemedi | | | | | | | |

E. coli bakterisi suspansiyonu ile yapılan çalışmada *Euphorbia seguieriana* bitkisinden elde edilen metanol ekstraktı ve n-butanol, diklormetan, etilasetat fraksiyonlarının farklı iki konsantrasyonlarının Disk Difüzyon Yöntemine göre *E. coli* etrafında hiçbir zon oluşturmadığı yani antibakteriyel etkisinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 5.1). Pozitif kontrol olarak kullanılan Gentamisin antibiyotik diskinin verdiği inhibisyon çapı da şekilde görülmektedir.



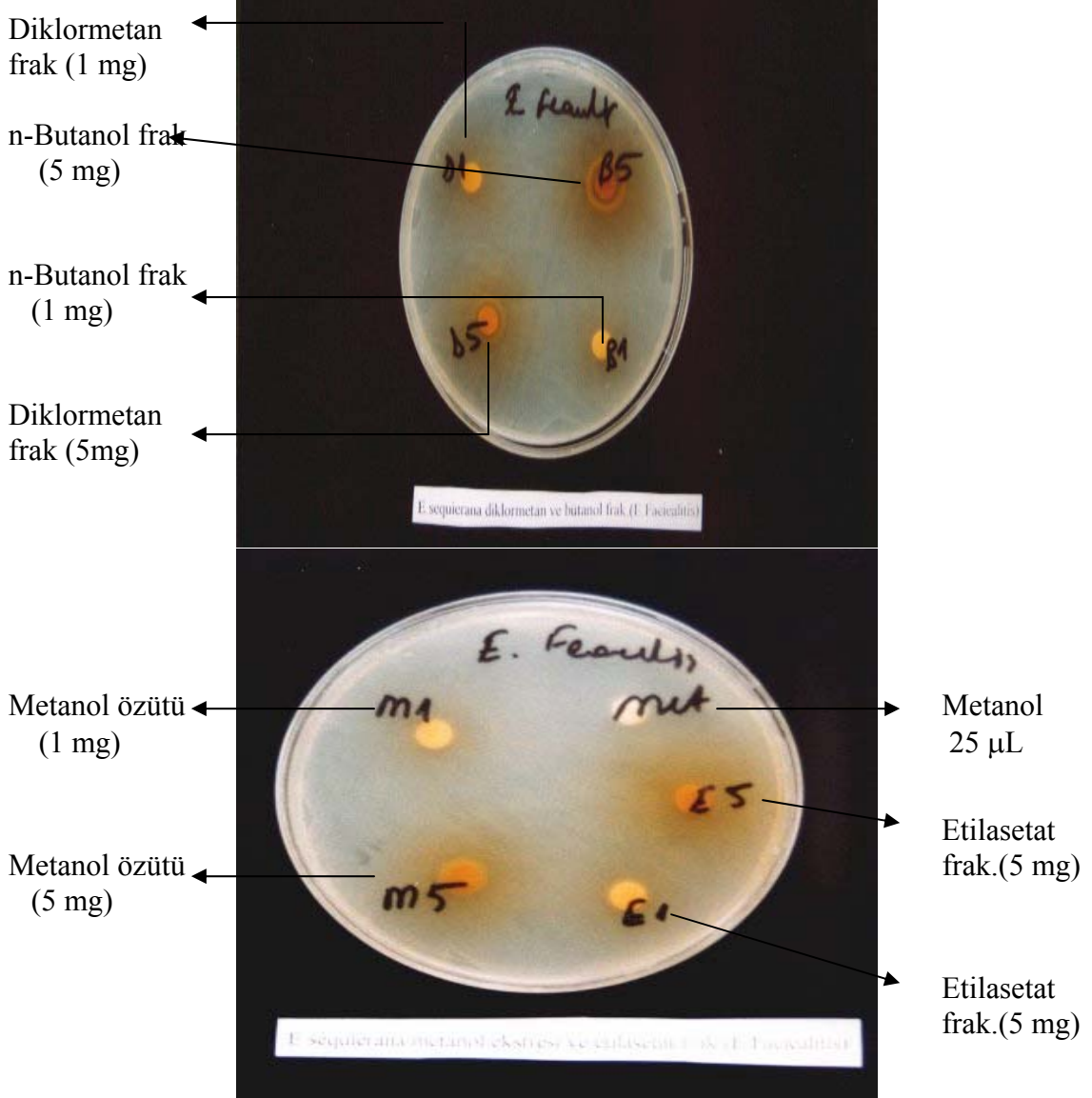
Şekil 5. 1. Agarlı besiyerine sahip petrilerde Disk Difüzyon Yöntemine göre *E. segueriana* bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların *E. coli* üzerindeki etkisinin incelenmesi

P. aeruginosa bakterisi suspansiyonu ekilmiş Mueller Hinton Agarlı petrilere, *Euphorbia seguieriana* bitkisinden hazırlanan, iki farklı konsantrasyonlu özüt ve fraksiyonların, Disk Difüzyon Yöntemine göre antibakteriyel etkinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 5. 2).



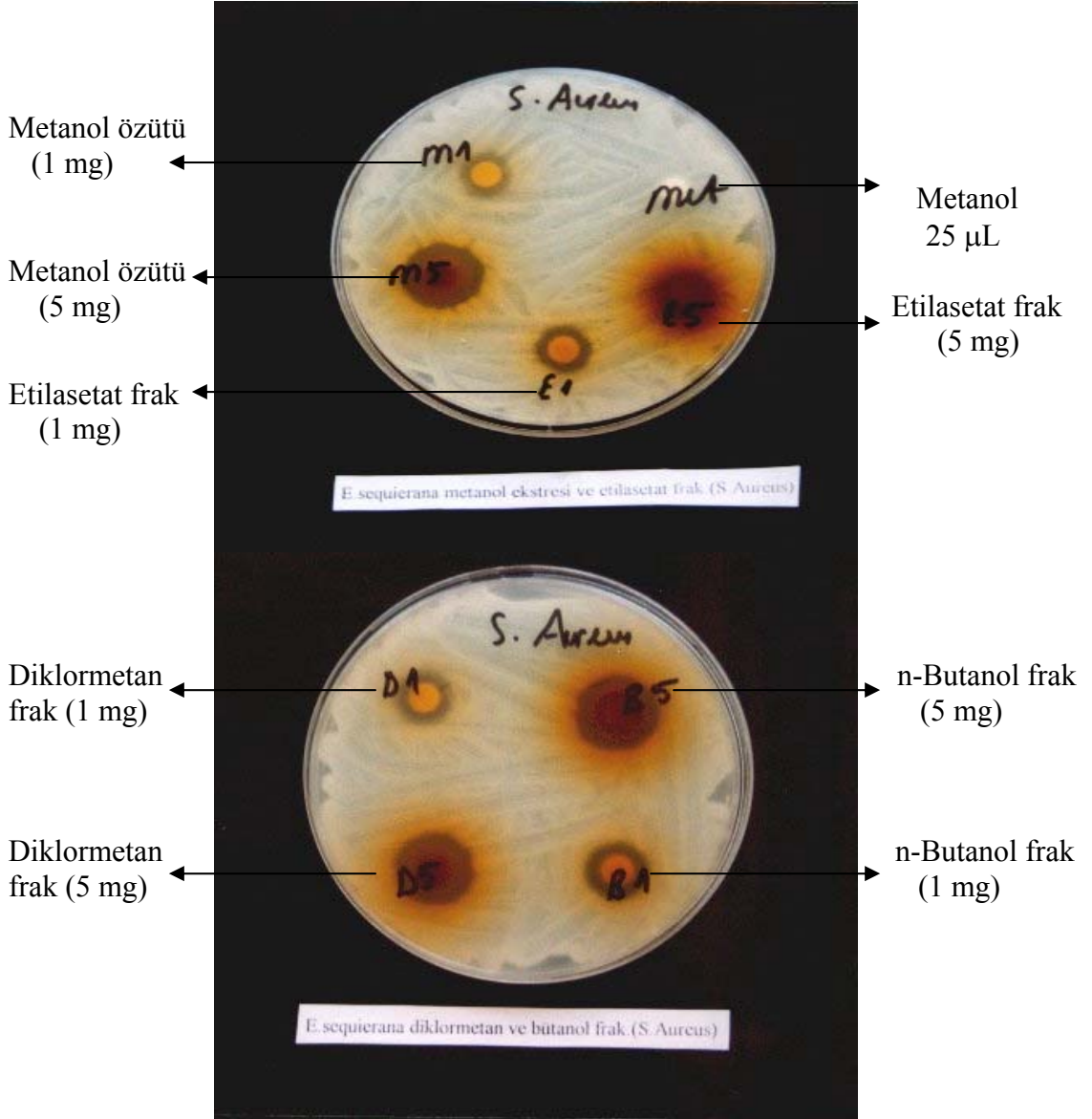
Şekil 5. 2. Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre *E. seguieriana* bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların *P. aeruginosa* üzerindeki etkisinin incelenmesi

E. faecalis bakteri suşları yayılmış petri kaplarında, *E. seguieriana* bitkisinden hazırlanan özütlerin emdirildiği disklerin etrafında bir inhibisyon zonu oluşumu gözlenmedi (Şekil 5. 3).



Şekil 5. 3. Agarlı besiyerine sahip petrilerde Disk Difüzyon Yöntemine göre *E. seguieriana* bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların *E. faecalis* üzerindeki etkisinin incelenmesi

Euphorbia seguieriana bitkisinin metanol özütünün ve butanol fraksiyonunun 5mg/25µL' lik konsantrasyonların *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu zon çapının 18 mm olarak ölçülmesiyle tespit edildi. Diklormetan fraksiyonunun 5mg/25µL'lik konsantrasyonunun inhibisyon zon çapı 16 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 5. 4).



Şekil 5. 4. Agarlı besiyerine sahip petrilere Disk Difüzyon Yöntemine göre *E. seguieriana* bitkisinden elde edilen özüt ve fraksiyonların *S. aureus* üzerindeki etkisinin incelenmesi

5. 2. MIC ve MBC DEĞERLERİNİN SAPTANMASI

E. seguieriana'nın diğer bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisi olmadığı Disk Difüzyon Yöntemiyle belirlendiği için MIC ve MBC değerleri sadece *S. aureus* için belirlendi.

Çizelge 5. 2. *Euphorbia seguieriana* bitkisinin metanol, n-butanol, diklormetan fraksiyonlarının *S. aureus* üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

| | 10 mg/mL | 5 mg/mL | 2,5mg/mL | 1,25mg/mL | 0,625mg/mL |
|----------------|----------|---------|----------|-----------|------------|
| (1)Metanol | - | - | - MIC | + | + |
| (2)n-Butanol | - | - | - MIC | + | + |
| (3)Diklormetan | - | - | - MIC | + | + |

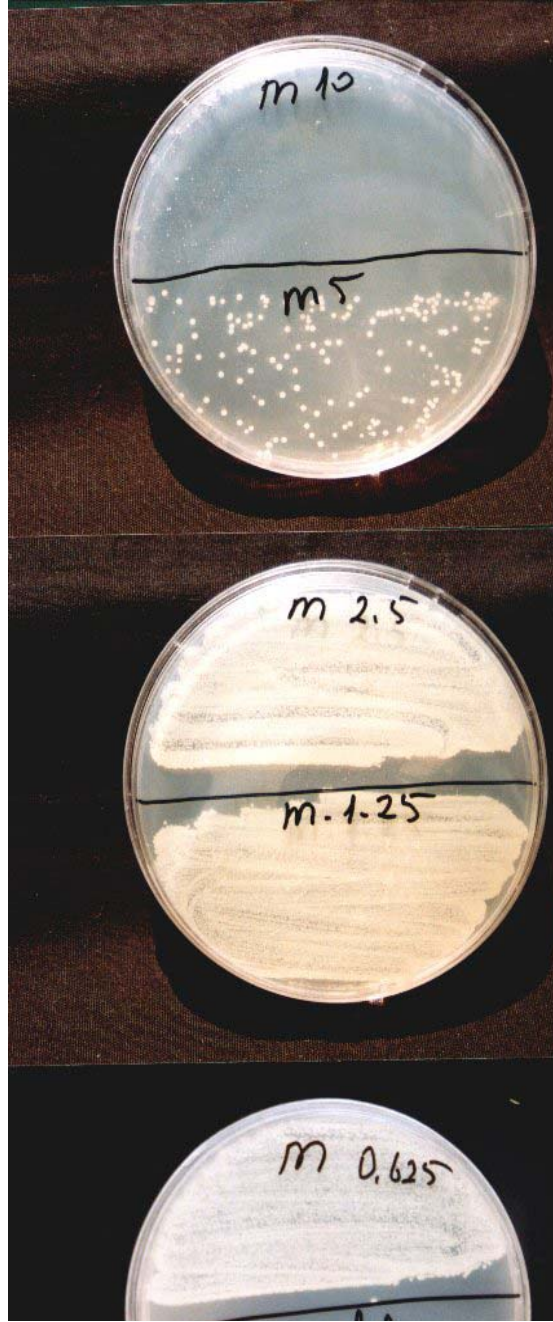
(1) MIC :2,5 mg/mL (-) Büyüme yok

(2) MIC :2,5 mg/mL (+) Büyüme var

(3) MIC :2,5 mg/mL

Etilasetat fraksiyonunun etkisi çok az olduğu için MIC ve MBC değerleri araştırılmadı.

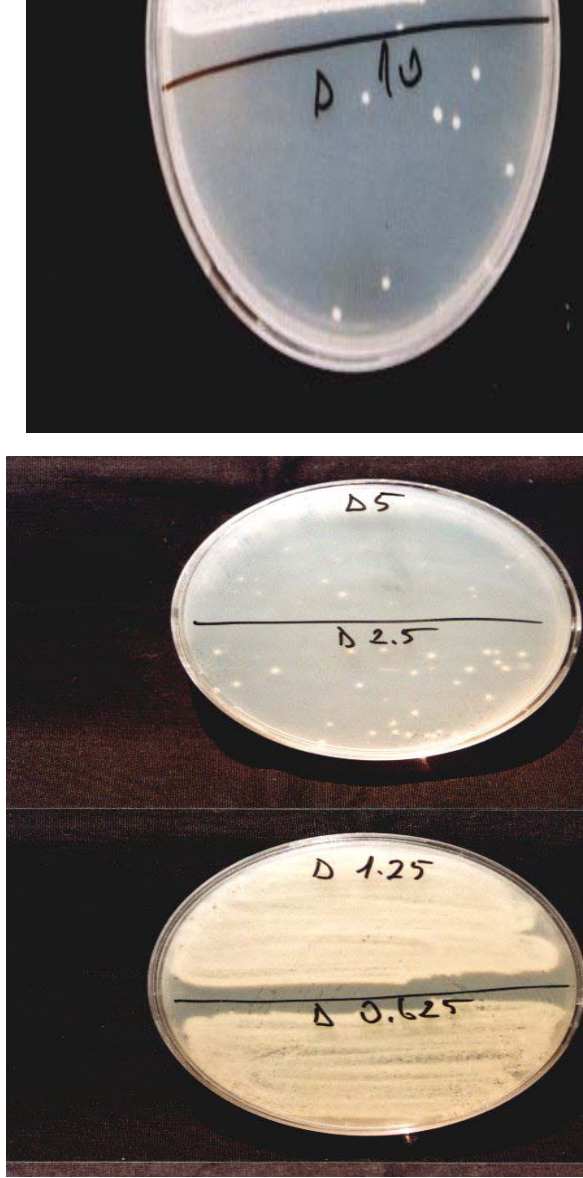
Bitki özütlerinin iki kat seyreltmelerini içeren sıvı besi ortamlarında *S. aureus* suşunun büyümesini engelleyen en küçük konsantrasyon MIC değeri olarak alındı (Çizelge 5. 2). Büyüme gözlenmeyen tüplerden 10 µL agarlı besiyerlerine yayıldığında, gecelik inkübasyondan sonra koloni oluşumu gözlenmeyen en küçük konsantrasyon MBC değeri olarak alındı. *Euphorbia seguieriana* bitkisinden elde edilen metanol özütü, diklormetan ve butanol fraksiyonlarının MBC değerlerinin belirlenmesiyle ilişkili resimler, Şekil 5. 5, Şekil 5. 6, Şekil 5. 7' de sunulmuştur.



Şekil 5. 5. Metanol özütünün MBC değerlerinin belirlenmesi.

Euphorbia seguieriana bitkisinin;

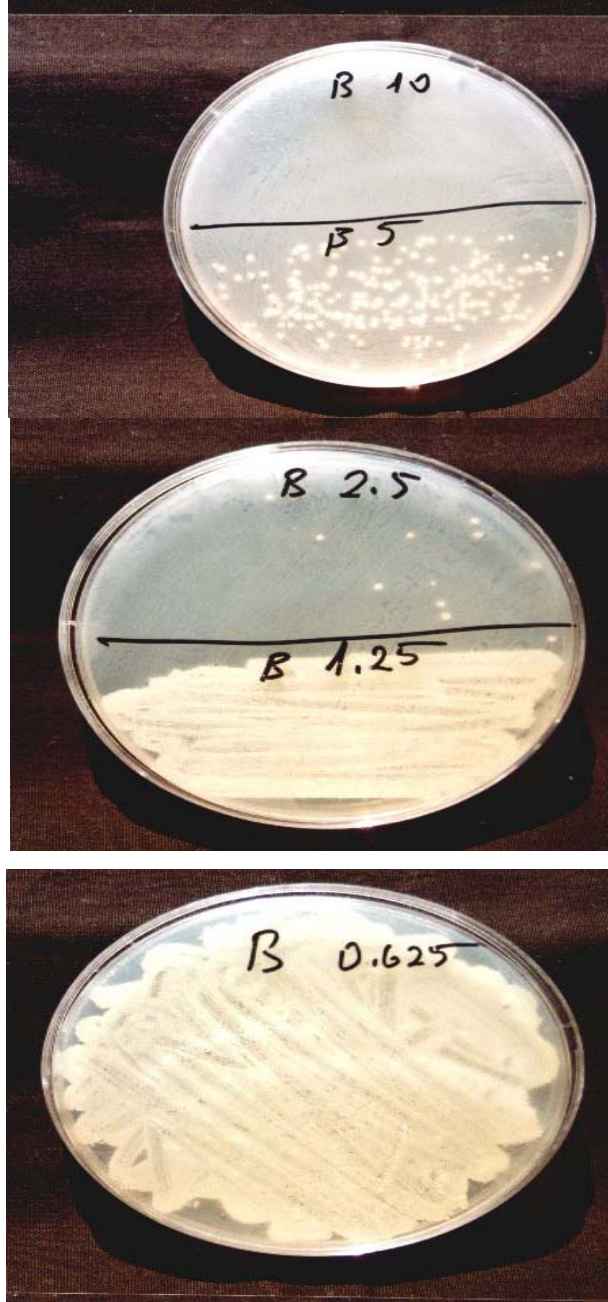
| | |
|--------------------|---|
| M ₁₀ | Metanol özütünün 10 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| M ₅ | Metanol özütünün 5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| M _{2,5} | Metanol özütünün 2,5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| M _{1,25} | Metanol özütünün 1,25 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| M _{0,625} | Metanol özütünün 0,625 mg / mL'lik konsantrasyonu |



Şekil 5. 6. Diklormetan fraksiyonun MBC değerlerinin belirlenmesi

Euphorbia seguieriana bitkisinin;

| | |
|--------------------|--|
| D ₁₀ | Diklormetan fraksiyonun 10 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| D ₅ | Diklormetan fraksiyonun 5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| D _{2,5} | Diklormetan fraksiyonun 2,5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| D _{1,25} | Diklormetan fraksiyonun 1,25 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| D _{0,625} | Diklormetan fraksiyonun 0,625 mg / mL'lik konsantrasyonu |



Şekil 5. 7. Butanol fraksiyonun MBC değerlerinin belirlenmesi.

Euphorbia seguieriana bitkisinin;

| | |
|--------------------|--|
| B ₁₀ | Butanol fraksiyonun 10 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| B ₅ | Butanol fraksiyonun 5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| B _{2,5} | Butanol fraksiyonun 2,5 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| B _{1,25} | Butanol fraksiyonun 1,25 mg / mL'lik konsantrasyonu |
| B _{0,625} | Butanol fraksiyonun 0,625 mg / mL'lik konsantrasyonu |

Euphorbia seguieriana bitkisinin metanol özütü, n-butanol, diklormetan fraksiyonlarının belirlenen MBC değerleri Çizelge 5. 3’de gösterilmiştir.

Çizelge 5. 3. *Euphorbia seguieriana* bitkisinin metanol özütü, butanol, diklormetan fraksiyonlarının MBC değerleri

| | MBC (mg/ mL) |
|-------------|---------------|
| Metanol | 10 |
| n-Butanol | 10 |
| Diklormetan | 5 |

5. 3. Nitel analiz ve renk reaksiyonlarında elde edilen bulgular

DeneySEL bölüm 4. 2. 7.’de anlatılan, nitel analiz işlemleri sonucu *Euphorbia seguieriana* bitkisinin; triterpenler, yağ asitleri, karetenoid, kateşol tanenleri, alkaloidler, antosiyan pigmenti, poliüronidler, indirgeyici bileşikler, saponinler içerdiği saptanmıştır.

Yapılan renk testleri sonucu, *Euphorbia seguieriana* bitkisinin metanol özütünün etilasetat fraksiyonunun alkaloid, terpen, tanen ve flavonoidleri; butanol fraksiyonunun terpen ve tanenleri içerdiği bulunmuştur. Diklormetan fraksiyonu kullanılan renk reaksiyonlarına yanıt vermemiştir. Ayrıca metanol özütünün iridoitleri içerdiği de saptanmıştır.

6. SONUÇ

Çanakkale, İntepe yöresinden toplanan *Euphorbia seguieriana* bitkisinin toprak üstü kısımları, gölgede kurutulduktan sonra toz haline getirilip, Soxhlet düzeneğinde metanol ile özütlendi. Metanol özütü, dört farklı çözücü ile fraksiyonlandı.

Toplam metanol ve üç fraksiyonun farklı konsantrasyonları için Disk Difüzyon Yöntemi uygulanabilirken, hekzan fraksiyonu çözülemediği için işlemler uygulanamadı. Disk Difüzyon Yöntemi sonuçlarına göre bitkinin metanol özütü ve üç fraksiyonun, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* bakterilerine karşı önemli bir etki göstermediği gözlenmiştir.

Euphorbia seguieriana bitkisinin metanol özütünün ve butanol fraksiyonunun 5 mg / 25 µL'lik konsantrasyonların *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu zon çapının 18 mm olarak ölçülmesiyle tespit edildi. Diklormetan fraksiyonunun 5 mg / 25 µL'lik konsantrasyonunun *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etki gözlemlendi.

Disk difüzyon testine göre etkin olduğu gözlenen *S. aureus* bakterisi için MIC ve MBC değerleri saptandı. Etilasetat fraksiyonunun etkisi çok az olduğu için MIC ve MBC değerleri araştırılmamıştır.

Sonuç olarak;

E. seguieriana'nın kullanılan dört bakteri türünden yalnız birine (*S.aureus*) karşı etkili olduğu gözlemlenen inhibisyon zonları, MBC ve MIC sonuçlarına dayanılarak karar verildi. Bitkinin antibakteriyel özelliği bakteri türlerine göre değişmektedir.

Yapılan literatür taraması sonucunda, *Euphorbia* türlerinin kimyasal yapılarını aydınlatmaya yönelik çalışmalar bulunmuştur. Öksüz ve arkadaşları *E. seguieriana* bitkisinin Me₂CO özütünden yedi tane diterpen poliesteri izole etmişlerdir. İlk beş bileşik myrsinol ile ilişkili yapı iken, kalan ikisi de siklomyrsinol ve lathyrane diterpenlerinin türevidir (Öksüz ve ark., 1998)

Euphorbia türleri tiglian ingenan ve dafnan diterpenlerinden dolayı deriyi tahriş edici ve tümör oluşumunu önleyici özellik gösterir (Hofmann ve ark., 1999).Upadhyay ve arkadaşları *E. seguieriana* bitkisinde diterpen ingenol esterleri bularak, tahriş edici etkinin bu bileşikten kaynaklandığını belirlemiştir (Upadhyay ve ark., 1980). Upadhyay ve arkadaşlarının *E. esula* bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada,

tahriş edici ve tümör oluşumunu önleyici etkiye neden olan ingenol türevleri belirlenmiştir (Upadhyay ve ark., 1978).

E. seguieriana bitkisi için yapılan nitel analiz işlemi sonucunda, metanol özütünün etilasetat fraksiyonunun alkaloid, terpen, tanen ve flavonoidleri; butanol fraksiyonunun terpen ve tanenleri içerdiği bulunmuştur. Yapılan literatür taraması sonuçları ve bitkinin kimyasal içeriğide göz önüne alınarak, gözlenen antibakteriyel etkinin diterpenlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Bundan sonra çalışmalarda daha fazla sayıda bakteri suşu kullanılabilir. Elde edilen özütler çeşitli ayırma teknikleriyle ayrılarak molekül içerikleri daha detaylı incelenebilir. Ayrıca etkili bulunan fraksiyondaki etken maddelerin bakterilere etki mekanizmaları araştırılabilir.

ÖZET

Çalışmaya konu olan *Euphorbia sequieriana* bitkisi sütleğen familyasının bir üyesidir ve en belirgin özelliği çok tahriş edici süt bulundurmasıdır. Bu bitki toksik ve kanser önleyicidir. Yapısında diterpenlerin var olduğu, tahriş edici etkinin diterpen ingenol'den kaynaklandığı bulunmuştur.

Çanakkale, İntepe yöresinden Nisan 2001'de toplanan *Euphorbia sequieriana* bitkisinin toprak üstü kısımları, gölgede kurutulduktan sonra değirmende öğütüldü. 50 g bitki Soxhlet düzeneğinde metanol ile özütlendi. Metanol özütü, polarlıklarına göre n-hekzan, diklormetan, etilasetat, n-butanol ile fraksiyonlandı.

Elde edilen özüt ve fraksiyonların antibakteriyel etkilerini araştırmak için Disk Difüzyon Yöntemi uygulandı. Disk Difüzyon Yönteminde *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* bakterileri kullanıldı. n-Hekzan fraksiyonu çözülemediği için işlemler bu fraksiyona uygulanamadı. *E.sequieriana* bitkisinin metanol özütünün, n-butanol fraksiyonunun, *S. aureus*'a karşı etkili olduğu belirlendi. Diklormetan fraksiyonunun zayıf bir etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Disk Difüzyon Yöntemine göre etkin olduğu gözlenen *S. aureus* bakterisi için MIC ve MBC değerleri saptandı.

Ayrıca, metanol özütü ve dört fraksiyonu için nitel analiz işlemleri de uygulanarak, bitkideki molekül grupları belirlendi. Nitel analiz işlemleri sonucu *Euphorbia sequieriana* bitkisinin; triterpenler, yağ asitleri, karetenoid, kateşol tanenleri, alkaloidler, antosiyan pigmenti, poliüronidler, indirgeyici bileşikler, saponinler içerdiği saptanmıştır.

SUMMARY

The plant *E. seguieriana*, the subject of this study, is a member of spurge family and the main characteristic of this plant is its irritant latex. This plant is toxic and cancer inhibitor. It has been found that the plant has diterpenoids and the irritant properties are due to diterpen ingenol.

Euphorbia seguieriana was collected in April 2001 and air-dried material grinded in mill. 50 gr of *Euphorbia seguieriana* was extracted in Soxhlet apparatus with methanol. The methanol extract was fractioned with the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol.

Antibacterial effect of the methanol extract and fractions was investigated with Disc Diffusion Assay. *E. coli*, *E. faecalis*, *P.auroginosa*, *S. aureus* were used in this assays. Antibacterial activity of n-hexane fraction could not be determined since it could not be redissolved. It was determined that methanol extract, n-butanol and dichloromethane fractions of *E. seguieriana* have antibacterial effect on *S. aureus* according to Disc Diffusion Assay. MIC and MBC values were also determined.

Methanol extract and four fractions were analysed qualitatively to find molecule groups in the plant. According to qualitative analysis, *E. seguieriana* was determined to contain triterpenoids, fatty acids, carotenoids, cothecol tannins, alkaloids, antocyanidin, reducing compounds and saponins.

KAYNAKLAR

- Akın, S., Bingöl, F., Şener, B. ve Şahinkaya, H., 1986. Antibacterial Effects of Some Higher Plants. J. Fac. Pharm. Gazi., 3 (1): 65-80.
- Akman, M. ve Gülmezoğlu, E., 1976. Tıbbi Mikrobiyoloji, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-15, Ankara, 908 s.
- Asımgil, A., 1997. Şifalı Bitkiler, Timaş Yayınları-176, İstanbul, 352 s.
- Baytop, T., 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yay., Ankara, 253 s.
- Beyhan, E., 1999. *Viscum Album* Ekstrakt'ının Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması. Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans Tezi).
- Bilgehan, H., 1995. Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 629 s.
- Bittner, M., Alarcon, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernandez, V., ve Hoeneisen, M., 2001. Chemical Study of Euphobiaceae Family Species of Chile. Boletin De Sociedad Chilena De Quimica, 46 (4): 419-431.
- Brooks, F., Butel, J., ve Morse, S., 1998. Medical Microbiolgy, Appleton & Lange, Connecticut, 740 p.
- Ceylan, A., 1995. Tıbbi Bitkiler I, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 256 s.
- Cıvlei, I., 1982. Methodology for Analysis of Vegetable Drugs, Bucharest-Romania
- Cowan M. M., 1999. Plant Products As Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12 (4): 564-582.

- Çubukçu, B., 1992. Analitik Farmakognazi (Bitkisel Droğların Kalitatif-Fizikokimyasal Analizleri), İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 90 s.
- Dortunç, T., 1990. Bazı uçucu Yağların Antibakteriyel ve Antifungal Etkileri Üzerinde Çalışmalar. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, (Yüksek Lisans Tezi).
- Engin, A., 1991. Tohumlu Bitkiler Sistematiğı, Ondokuz Mayıs Üniv. Yayınları, Samsun, 191 s.
- Hanson, J. R., 2003. Diterpenoids. Nat. Prod. Rep., 20: 70-78.
- Hoffman, J., Vasas, A., Günter, G., Dombi, Gy., Blazso, G., Falkay, Gy., Mathe, I., ve Jerkovich, Gy., 1999. Jatrophone Diterpenoids from *E. peplus*. Phytochemistry, 51: 673- 677.
- Jeske, F., Jakupovic, J., ve Berendsohn, W., 1995. Diterpenoids from *Euphorbia seguieriana*. Phytochemistry, 40 (6): 1743-1750.
- Kocabeyoğlu, Ö., Aktan, H., Sonuvar, S., Emekdaş, G., Koşan, E., ve Öztürkeri, H., 1992. Sarmısağın Su Alkol ve Eter Ekstrelerinin Antimikrobik Etkisinin Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması. ANKEM Derg, 6 (3): 425-429.
- Rizk, A.M., Hammuda, MM., El- Mıssıry, HM., Radwan, M. ve Evans, FJ., 1985. Biologically Active Diterpene Esters from *Euphorbia peplus*. Phytochemistry, 24(7): 1605-1606.
- Öksüz, S., Gürek, F., Qiu, S. ve Cordell, G., 1998. Diterpene Polyesters from *E.seguieriana*. J. Nat. Prod., 61: 1198-1201.
- Serter, F. ve Bilgehan, H., 1968. Klinik Mikrobiyoloji. Ege Üniversitesi Tıp Fak. Yayınları, No: 71, İzmir, 259 s.

- Shi, YP. ve Jia, ZJ., 1997. Triterpenoids and Other Coumpounds from *E. esula* and *E. Petiolata*. Chemical Journal of Chinese Universities- Chinese, 18 (7): 1107-1112.
- Sökmen, A., Jones, M. B. ve Ertürk, M., 1999. The In Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacolgy, 67: 79-86.
- Şenel, Ü., 1999. *Pinus Syl Vestris*'in Gövdesinden Elde Edilen Ekstraktın Antibakteriyel Özelliğinin Araştırılması, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans Tezi).
- Tanker, M. ve Sakar, M. K., 1991. Fitokimyasal Analizler, Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayınları No: 67, Ankara, 224 s.
- Unat, E., 1982. Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi, Dergah Tıp Yayınları, İstanbul, 1182 s.
- Upadhyay, R.R., Bakhtavar, F., Ghaisarzadeh, M., ve Tilabi, J., 1978. Cocarcinogenic and Irritant Factors of *E. esula*. Tumori, 64 (1): 99-102.
- Upadhyay, R.R., İslampanah, S., Davoodi, A., 1980. Presence of a Tumor Promoting Factor in Honey. Gann., 71 (4): 557-559.
- Upadhyay, R.R., 1996. Tumor promoting Diterpene Esters of the Family *Euphorbiaceae*. Current Science, 71 (1): 32-36.
- Uysal, İ., 1991. Çanakkale İlindeki Bazı Boya Bitkilerinin Morfolojisi, Korolojisi Ve Boyacılıkta Kullanılması. Çanakkale Eğitim Yüksekokulu Araştırma Dergisi, 2 (1): 65-104.
- Zeybek, N. ve Zeybek, U., 1994. Farmasötik Botanik, Ege Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayınları No: 2, İzmir, 550 s.

Watt, J. ve Brandwijk, M., 1962. Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, E & S Livingstone Ltd., London, 401-417 p.

Wildman, E., 2001. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Boca Raton FL: CRC Pres's, 542 s.

www.mikrobiyoloji.org

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana yol gösteren danışman hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Cahit Akgül'e, bitkilerin teşhisinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. İsmet Uysal ve Arş. Gör. Ersin Karabacak'a, nitel analiz, özütlerin hazırlanması ve incelenmesi işlemlerinde her zaman yardımlarına başvurduğum Doç. Dr. Mehmet Ay'a, laboratuvarında birlikte çalıştığım ve her konuda bana yardımcı olan arkadaşım Fatemeh Bahadori ve Arş. Gör. Gülşen Sağlıkoğlu'na, bitkilerin bulunup toplanmasında benimle birlikte olan arkadaşım Ayşe Çınar'a teşekkür ediyorum.

Ayrıca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bu çalışmanın her aşamasını benimle paylaşan anneannem Fatma Kostak'a, annem Saadet Kostak'a, eşim Onur Tiryakioğlu'na sonsuz teşekkürler.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Bahar TİRYAKİOĞLU

Doğum Yeri ve Yılı: Turgutlu/ Manisa- 03/03/1978

Adres: Cumhuriyet Mahallesi 1. Yeşil Sokak No: 59/A Turgutlu / Manisa

Eğitim Durumu

1985-1987 : Kurtuluş İlkokulu

1987-1989 : Cumhuriyet İlkokulu

1989-1996 : Turgutlu Anadolu Lisesi

1996-2000 : Çanakkale Onsekiz Mart Üniv. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

2000-2004 : Çanakkale Onsekiz Mart Üniv. Fen Bilimleri Ens. Kimya A. B. D

Staj ve Kurslar

1998 yılı yaz dönemi ÇOMU' de formasyon eğitimi

Mesleki Deneyim

2002- : Sınıf Öğretmeni, Demirci/ Manisa

Çalışma ve İlgi Alanları

Bitki Kimyası,

