

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

***ANTHEMIS TINCTORIA* (SARI PAPATYA) BİTKİSİNDEN
HAZIRLANAN ÖZÜTLERİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülşen SAĞLIKOĞLU

ÇANAKKALE-2004

***ANTHEMIS TINCTORIA* (SARI PAPATYA) BİTKİSİNDEN
HAZIRLANAN ÖZÜTLERİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

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

ANTHEMIS TINCTORIA (SARI PAPATYA) BİTKİSİNDEN
HAZIRLANAN ÖZÜTLERİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan: Gülşen SAĞLIKOĞLU
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Cahit AKGÜL

ÇANAKKALE-2004

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2001-b/14).

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu araştırma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:.....

Üye:.....

Üye:.....

Kod No:

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkilerde Bulunan ve Biyolojik Aktivite Gösteren Bileşiklerin Temel Yapıları	2
1.1.1. Basit Fenoller ve Fenolik Asitler.....	2
1.1.2. Kinonlar.....	3
1.1.3. Flavonoidler.....	3
1.1.4. Tanenler.....	5
1.1.5. Kumarinler.....	6
1.1.6. Uçucu Yağlar ve Terpenoidler.....	6
1.1.7. Alkaloidler	8
1.1.8. Glikozitler	8
1.1.9. Lektinler ve Polipeptitler	9
1.2. Antimikrobiyal Maddelerin Etki Mekanizmaları	10
1.2.1. Hücre duvarının sentezini önleyerek etkili olanlar	10
1.2.2. Hücre zarının işlevini bozarak etki edenler	12
1.2.3. Protein sentezini bozarak etki edenler	13
1.2.4. Mikroorganizmanın Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler	14
1.2.5. Antimetabolitler	14
1.3. Etkin Maddelerin Hastalıklara Etki Mekanizmaları	15
1.3.1. Enzim İnhibisyonu	15
1.3.2. Angiogenezin İnhibisyonu.....	16

1.3.3. Gen Ekspresyonu	16
1.3.4. Fitoöstrojenik Etki	17
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	20
2.1. Genel Bilgiler	20
2.1.1. <i>Anthemis tinctoria</i> 'nın Sistematığı	20
2.1.2. <i>Anthemis tinctoria</i> ve bazı <i>Anthemis</i> türlerinin kimyasal bileşimi.....	22
2.1.3. <i>Anthemis</i> Türlerinin Antimikrobiyel Özellikleri	25
2.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	26
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	27
2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Bitki Materyali	29
3.1.2. Mikroorganizmalar	29
3.1.3. Besiyerleri.....	29
3.1.4. Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.5. Gereçler	30
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Ekstrelerin Elde Edilmesi	30
3.2.2. Besiyeri ve Bakterilerin Hazırlanması	31
3.2.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	31
3.2.2.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	31
3.2.2.3. Bakterilerin Mc Farland Bulanıklık Standardına Ayarlanması.....	31
3.2.3. Antibakteriyel Aktivitelerin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler....	32
3.2.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	32
3.2.3.1.1. Disk Difüzyon Yönteminde Kullanılan Diskler Hazırlanması	32
3.2.3.1.2. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakteriyel Aktiviten	

Araştırılması.....	32
3.2.3.2. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) ve MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi	33
3.2.4. Bitkinin Kalitatif Analizi	34
3.2.4.1. Eter Ekstresinin İncelenmesi.....	34
3.2.4.1.1. Uçucu Yağlar ve Yağlı Madde Bileşenlerin Tanımlanması...	34
3.2.4.1.2. Sterol ve Triterpenlerin Tanımlanması	35
3.2.4.1.3. Karotenoidlerin Tanımlanması	35
3.2.4.1.4. Yüksek Yağ Asitlerinin Tanımlanması	35
3.2.4.1.5. Alkaloidlerin Tanımlanması	36
3.2.4.1.6. Flavon aglikonların Tanımlanması	36
3.2.4.1.7. Emodollerin Tanımlanması	36
3.2.4.1.8. Kumarinlerin Tanımlanması.....	36
3.2.4.2. Alkol Ekstresinin İncelenmesi.....	37
3.2.4.2.1. Tanenlerin Tanımlanması.....	37
3.2.4.2.2. İndirgeyici Bileşiklerin Tanımlanması	38
3.2.4.2.3. Alkaloid Tuzlarının Tanımlanması	38
3.2.4.2.4. Hidrolize Alkol Ekstresinin İncelenmesi	38
3.2.4.3. Su Ekstresinin İncelenmesi	40
3.2.4.3.1. Poliüronidlerin (Pektinler, gumlar) Tanımlanması	40
3.2.4.3.2. Glusitlerin (Ozlar ve Poliozlar) Tanımlanması	40
3.2.4.3.3. Saponinlerin Tanımlanması	41
3.2.4.3.4. Tanenlerin Tanımlanması	41
3.2.4.3.5. Alkaloid Tuzlarının Tanımlanması	41
4. BULGULAR	43
4.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları	43
4.1.1. Toplam Metanol ve Maserasyon Ekstrelerinin Antibakteriyel Etkileri ..	43
4.1.2. Fraksiyonların Antibakteriyel Etkileri	44

4.1.3. Ardı ardına Yapılan Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Hekzan v Diklormetan Ekstrelerinin Antibakteriyel Etkileri	50
4.2. MIC ve MBC Değerlerinin Belirlenmesi	52
4.2.1. Toplam Metanol Ekstresinin MIC ve MBC Değerleri	52
4.2.2. Diklormetan ekstresinin MIC ve MBC Değerleri	53
4.2.3. Ardı ardına Yapılan Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Diklormeta Ekstresinin MIC ve MBC Değerleri	55
4.3. <i>Anthemis tinctoria</i> Bitkisinin Kimyasal Bileşiminin Kalitatif Analizi	57
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
6. ÖZET	61
7. SUMMARY	63
8. KAYNAKLAR	64
TEŞEKKÜR	70
ÖZGEÇMİŞ	71

ÖZ

Anthemis tinctoria bitkisinin antibakteriyel aktivitesi incelendi. Bitkiden elde edilen maserasyon ekstresi, toplam metanol ekstresi ve fraksiyonların bakterilere karşı aktivitesi belirlendi. Metanol ekstresi n-hekzan, diklormetan, etilasetat ve n-bütanol ile fraksiyonlandırıldı. Antibakteriyel aktivite çalışması için disk difüzyon yöntemi kullanılarak inhibisyon zonları ve aktivite gösteren ekstrelerin MIC ve MBC değerleri belirlendi. En fazla aktiviteyi diklormetan fraksiyonu gösterdi. Ayrıca bitkinin kalitatif analizi yapıldı.

Anahtar Kelimeler: *Anthemis tinctoria*, Antibakteriyel aktivite, Kalitatif analiz, İnhibisyon zonu, MIC ve MBC.

ABSTRACT

Antibacterial activity of *Anthemis tinctoria* was investigated. Antibacterial activities of maceration extract, total methanol extract and fractions of *Anthemis tinctoria* against various bacteria were determined. Methanol extract was fractionated respectively with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol. Disc diffusion method was used for antibacterial activity study. Then zones of inhibition around the disc were measured and extracts which are active were tested for MIC and MBC. Also qualitative analysis was done.

Keywords: *Anthemis tinctoria*, Antibacterial activity, Qualitative analysis, Zones of inhibition, MIC and MBC.

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
NAG	Üridin difosfat N-asetil glikozamin
NAM	Üridin difosfat N-asetil muramik asit
6-APA	6-aminopenisilanik asit
tRNA	Taşıyıcı RNA
mRNA	Haberci RNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
Upa	Ürokinaz enzimi
VEGF	Vasküler endotelial hücre büyüme faktörü
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
GC/MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
Na	Sodyum
HCl	Hidroklorik asit
ZnCl ₂	Çinko klorür
Al(OH) ₃	Alüminyum hidroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
KOH	Potasyum hidroksit
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
McF	Mc Farland
BaCl ₂	Baryum klorür
NaCl	Sodyum klorür
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MBC	Minimum bakterisidal konsantrasyonu
HgCl ₂	Civa(II) klorür
KI	Potasyum iyodür

NH ₃	Amonyak
UV	Ultraviyole
NH ₄ OH	Amonyum hidroksit
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
EGCG	Epigallokateşin-3-gallat
EGC	Epigallokateşin
ECG	Epikateşin-3-gallat

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa No
Çizelge 2.1	Anthemis cotula'nın metanol ekstresinin antibakteriyel aktivitesi.....	26
Çizelge 4.1	Toplam metanol ekstresi ve fraksiyonların disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonları.....	50
Çizelge 4.2	Hekzan ve diklormetan ekstrelerinin disk difüzyon yöntemine göre elde edilen inhibisyon zonları.....	52
Çizelge 4.3	Toplam metanol ekstresinin MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi.....	53
Çizelge 4.4	Diklormetan ekstresinin MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi..	53
Çizelge 4.5	Ardı ardına yapılan ekstraksiyonla elde edilen diklormetan ekstresi için MIC ve MBC değerleri.....	56
Çizelge 4.6	Anthemis tinctoria bitkisinin kalitatif analiz sonuçları.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1.1	Kafeik asit ve kateşol'un yapıları.....	2
Şekil 1.2	Kinon, lavson ve juglon'un yapıları.....	3
Şekil 1.3	Flavon, flavan, flavonol ve izoflavon'un yapıları	4
Şekil 1.4	Ellagitanin'in yapısı.....	5
Şekil 1.5	Kumarin ve warfarin'in yapıları.....	6
Şekil 1.6	Mentol, timol ve karvakrol'un yapıları.....	7
Şekil 1.7	Harman'in yapısı.....	8
Şekil 1.8	Qubain glikozidinin yapısı.....	9
Şekil 1.9	6-APA (6-aminopenisilanikasit) ve penisilinG'nin yapıları.....	12
Şekil 1.10	Amfoterisin B'nin yapısı.....	12
Şekil 1.11	Bir tetrasiklin olan minosiklin'in yapısı.....	13
Şekil 1.12	Trimetoprim-sülfametoksazol'un (TMP-SMX) etki mekanizması.....	15
Şekil 1.13	EGCG (Epigallokateşin-3-gallat)'nin yapısı.....	15
Şekil 1.14	Östrojen ve Östrodiol'un yapıları.....	17
Şekil 1.15	Genistein ve daidzein'in yapıları.....	18
Şekil 1.16	Kolesterol'un yapısı.....	19
Şekil 2.1	<i>Anthemis tinctoria</i> 'nin genel bir görünüşü.....	20
Şekil 2.2	<i>Anthemis tinctoria</i> 'nin doğal ortamda görünüşü.....	21
Şekil 2.3	1:8 sineol, alfa-pinen, beta-pinen ve dekanolik asidin yapıları.....	23
Şekil 2.4	Bitkide bulunan quercetagenin 3,6,3'-trimetil eter ve quercetagenin 3,6,3',4'-tetrametil eter'in yapıları.....	23
Şekil 3.1	MIC ve MBC saptanması.....	34
Şekil 3.2	Eter ekstresinin incelenmesinde izlenen yol.....	37
Şekil 3.3	Alkol ekstresinin incelenmesinde izlenen yol.....	40
Şekil 3.4	Su ekstresinin incelenmesinde izlenen yol.....	42

Şekil 4.1	Toplam metanol ve maserasyon ekstralarının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.....	43
Şekil 4.2	Diklormetan ve hekzan ekstralarının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.....	44
Şekil 4.3	Diklormetan ve hekzan ekstralarının <i>E. coli</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	45
Şekil 4.4	Diklormetan ve hekzan ekstralarının <i>E. faecalis</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	45
Şekil 4.5	Diklormetan ve hekzan ekstralarının <i>P.aeruginosa</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.....	46
Şekil 4.6	Etilasetat ve bütanol ekstralarının <i>S. aureus</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	47
Şekil 4.7	Etilasetat ve bütanol ekstralarının <i>E. coli</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	47
Şekil 4.8	Etilasetat ve bütanol ekstralarının <i>E. faecalis</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	48
Şekil 4.9	Etilasetat ve bütanol ekstralarının <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.....	49
Şekil 4.10	Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen hekzan ve diklormetan ekstralarının <i>P. aeruginosa</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.....	51
Şekil 4.11	Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen hekzan ve diklormetan ekstralarının <i>S. aureus</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.....	51
Şekil 4.12	Diklormetan ekstresinin <i>S. aureus</i> üzerindeki MBC değerinin hesaplanmasında kullanılan ekimler.....	54
Şekil 4.13	Diklormetan ekstresinin <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki MBC değerinin hesaplanmasında kullanılan ekimler.....	55
Şekil 4.14	Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen diklormetan	

	ekstresinin <i>S. aureus</i> üzerindeki MBC değerinin belirlenmesinde kullanılan ekimler.....	56
Şekil 4.15	Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen diklormetan ekstresinin <i>P. aeruginosa</i> üzerindeki MBC değerinin belirlenmesinde kullanılan ekimler.....	57

GİRİŞ

İnsanlar yüzyıllardan beri bitkilerden gıda, baharat, ilaç ve boyarmadde olarak yararlanmışlardır. Dünyada 750.000-1.000.000 arasında bitki türü bulunduğu tahmin edilmektedir. Yapılan araştırmalarla yaklaşık 500.000 kadar tanımlanmıştır. Bu bitkilerin küçük bir yüzdesi insanlar ve hayvanlar tarafından besin olarak kullanılmaktadır. Her yıl 2000 kadar yeni tohumlu bitki türü tanımlanıp isimlendirilmektedir (Baytop, 1999).

Tedavi maksadıyla kullanılan bitkilerin miktarı, antik çağdan beri devamlı bir artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog miktarı 250 civarında idi. Grekler döneminde 600 kadar tıbbi bitki tanınıyordu. Arap-Fars uygarlığı döneminde bu miktar 4.000 civarına kadar yükselmiştir. XIX. asrın başlarında ise bilinen tıbbi bitki miktarı 13.000 sayısına erişmiştir. Dünya Sağlık Teşkilatı tarafından yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır (Baytop, 1999).

Son yıllarda tıbbi bitkiler üzerine yapılan araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bunda kalkınma yolundaki ülkelerin bitkilerden yararlanarak hastalıklara kolay ve ucuz çare bulma istekleri büyük rol oynamaktadır. Aynı zamanda tedavide kullanılan ilaçların yapısında fitokimyasalların bulunması, sentetik bileşiklerin yıllar sonra yan etkilerinin ortaya çıkması, insanların bitkilere daha kolay ve ucuz ulaşabilmeleri bitkilere olan ilgiyi artırmıştır.

Tamamlayıcı tedavi yöntemlerine ek olarak bitki ekstralarının kullanımı 1990'ların sonlarında büyük popülerite kazanmıştır. Geçen on yıl içinde A.B.D'de incelenen insanların yaklaşık 1/3'ü bir önceki yıl boyunca en az bir kez tamamlayıcı tedaviye başvurduğunu belirtmiştir. 1996 yılında bitkisel ilaçların satışında bir önceki yıla göre % 37'lik artış olmuştur. Bu insanların toksik ilaçlara bir tepkisi olabilir (Cowan, 1999).

Bitkiler hakkında derlenen bilgilerin bir kısmı tecrübeye dayalı; eski toplumların tedavi amacıyla kullandıkları ve hayvanların iyileşmek için içgüdüyle yedikleri bitkiler ve bir kısmı da bitkilerin etkili maddeleri bulunup ayıklanarak yapılan klinik çalışmalara dayalı bilgilerdir. Her şeye rağmen tüm dünya üzerine çok büyük miktarda yayılmış olan bitkilerin tıbbi açıdan araştırılması tamamlanamamıştır.

Bitkisel droglar ya doğrudan bitkiden hazırlanarak ekstre halinde yada yapılarında küçük değişiklikler yapılarak daha etkili biçime getirilip ilaç sektöründe kullanılmaktadır.

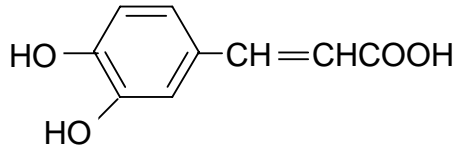
Bu çalışmada *Anthemis tinctoria* bitkisinden elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktivitesi Disk Difüzyon yöntemi ile incelenmiş ve etkin olan ekstrelerin MIC ve MBC değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca bitkinin kalitatif analizi yapılmıştır.

1.1. Bitkilerde Bulunan ve Biyolojik Aktivite Gösteren Bileşiklerin Temel Yapıları

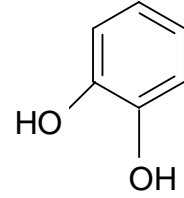
1.1.1. Basit Fenoller ve Fenolik Asitler

Tek fenol halkasından ibaret basit biyoaktif kimyasallardır. Sinnamik asit ve kafeik asitler fenilpropandan türemiş bileşiklere birer örnektir.

Yaygın olarak bulunan bitkilerden tarhun ve kekiğin ikisi de kafeik asit içerir. Bu bileşiğin virüs, bakteri ve funguslara karşı etkili olduğu bulunmuştur (Wild ve ark.,1994).



Kafeik asit



Katesol

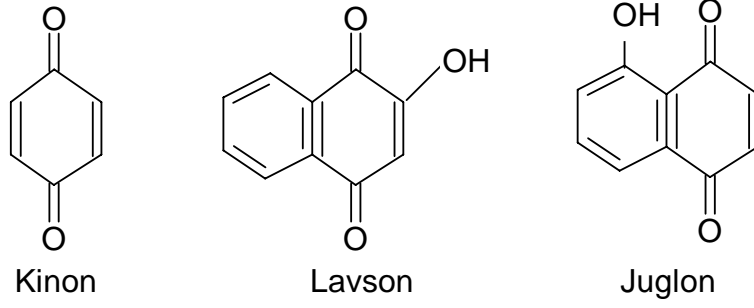
Şekil 1.1. Kafeik asit ve katesol'ün yapıları

Katesol ve pirogallol her ikisinde hidroksillenmiş fenollerdir ve mikroorganizmalara karşı toksik etki gösterirler. Katesol 2 -OH grubuna, pirogallol 3-OH grubuna sahiptir. Fenol halkasındaki -OH gruplarının sayısı ve konumu onların toksisiteleri ile ilgilidir. Bu etkinin okside bileşiklerin enzimleri inhibe etmesi ile büyük olasılıkla da sülfhidril grupları ya da proteinler ile etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir.

1.1.2. Kinonlar

Kinonlar, halkalı konjüge endionlardır. Doğada yaygın olarak bulunurlar ve yüksek reaktif özelliktedirler. Bu bileşikler, meyve ve sebzeler kesildiği zaman meydana gelen kararım reaksiyonundan sorumludurlar. Bitkilerde kinon yapısında pek çok doğal boyarmadde bulunmaktadır.

Lavson, genellikle Arap yarımadasında yetişen bir çalının yapraklarının öğütülmesiyle elde edilen kınada (*Lawsonia inermis*) ve juglon, ceviz (*Juglans regia*) meyvesinin dışını çevreleyen yeşil kabukta bulunur (Tüzün, 1999).



Şekil 1.2. Kinon, lavson ve juglon'un yapıları

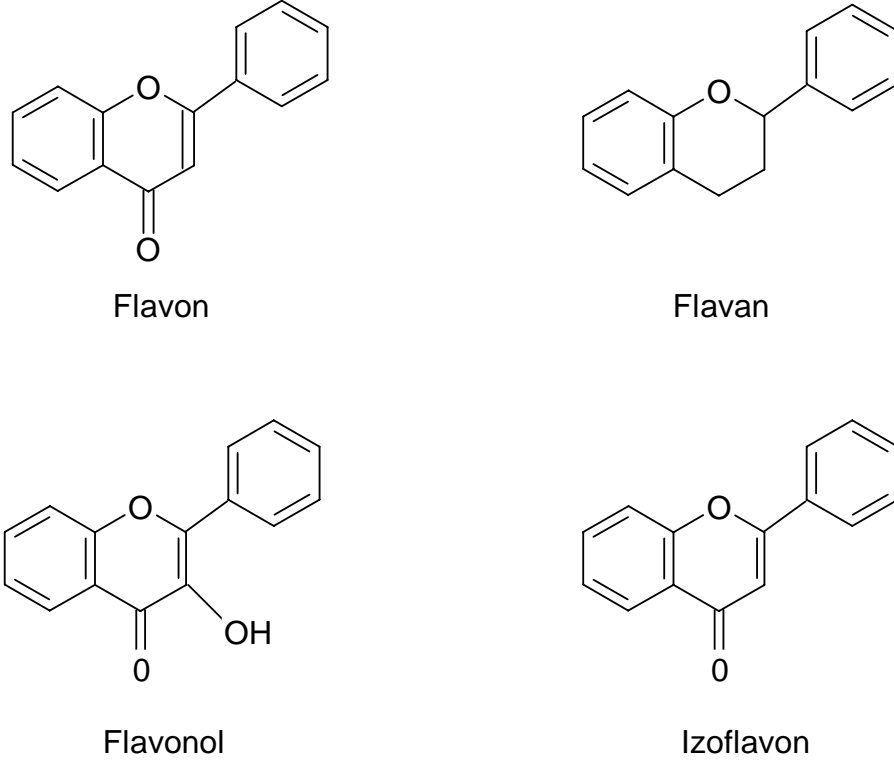
Kinonlar, proteinlerdeki nükleofilik aminoasitler ile tersinmez kompleks oluştururlar ve buda proteinlerin inaktive olmasına ve fonksiyonunu kaybetmesine yol açar. Bundan dolayı kinonların antimikrobiyal etkileri büyüktür. Mikrobiyal hücredeki olası hedefler, hücre duvarı polipeptitleri ve membrana bağlı enzimlerdir.

Kazmi ve arkadaşları bir Pakistan ağacı olan *Cassia italica*'dan hiperisin adında bir antrakinon tanımlamışlardır. *Pseudomonas pseudomalliae* için bakterisidal, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* ve *Bacillus anthracis* için bakteriyostatik etki gösteren bu bileşik sonraları antidepresant olarak popülerlik kazanmasıyla daha fazla dikkat çekmiştir (Duke, 1985).

1.1.3. Flavonoitler

Flavon yani 2-fenilkromonun özellikle benzen halkası üzerinde hidroksi türevleri doğada çok yaygın olarak bulunur. 2,3-Çift bağı indirgenmiş olanlara ise flavan ismi verilir. Bunlardan 3-yerine -OH grubu bağlanmış olanlar flavonol, fenil

grubu 3-yerine bağlanmış olanlar ise izoflavonlar olarak adlandırılır. Flavanonlar ve flavanonoller diğer yaygın iki gruptur.



Şekil 1.3. Flavon, flavan, flavonol ve izoflavon'un yapıları

Flavonoitlerin aktivitesi hücre dışındaki, çözümlü proteinler ve bakteriyel hücre duvarları ile kompleks yapmalarından ileri gelir.

Örneğin, alpinumisoflavon'un, schistosomal enfeksiyonlara (Perrett ve ark.,1995), phloretin'in çeşitli mikroorganizmalara (Hunter ve Hull.,1993), galangin'in (3,5,7-trihidroksiflavon) fungi ve virüslere olduğu kadar gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuştur (Meyer ve ark., 1997).

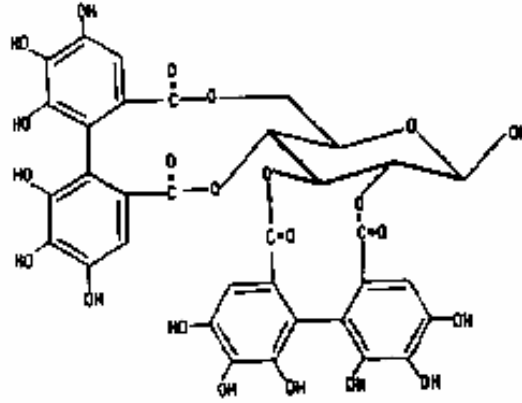
Flavonoitlerin olası mekanizmalarının net bir biçimde açıklanması çelişkili bulgular yüzünden yapılamamıştır. β -halkasında $-OH$ grubu olmayan flavonoitler, $-OH$ grubu olanlardan daha etkilidir. Bu bulgu onların mikrobiyal hedeflerinin membran olduğunu kanıtlar. Lipofilik bileşikler bu yapıya daha çok zarar verebilir. Bununla beraber bazı araştırmacılar karşı etki bulmuşlar ve daha fazla hidrosilasyonun

antimikrobiyel aktiviteyi arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Bu son bulgular basit fenolikler ile aynı sonuçları yansıtmaktadır (Sato ve ark., 1996).

1.1.4. Tanenler

Tanen kelimesi oldukça geniş kapsamlı bir terimdir ve değişik kimyasal kompozisyondaki bileşikleri kapsar. Fenilhidroksit grupları ağırlıklı oranda olan, belirli bir derecede yoğunlaşma ve polimerleşmeye uğramış olan bitkisel tanenler gerçek tanenler olarak bilinir. Molekül ağırlıkları 300'den 500'e kadar değişebilir.

Tanenler hidrolize uğrayabilen veya yoğunlaşmış tanenler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmıştır. Hidrolize uğrayabilen tanenler bir şekerin, özelliklede glikozun bir veya birkaç polifenolik karboksilik asitli esterleridir. Ester bağları asitlerin, bazların veya enzimlerin etkisiyle hidrolize olarak kırılırlar. Yoğunlaşmış tanenler ise asitlerin etkisi altında hidroliz yoluyla daha basit bileşiklere ayrılmak yerine polimerleşirler. Şekil 1.4'de tanen yapısına örnek Ellagitanin'in yapısı gösterilmektedir.



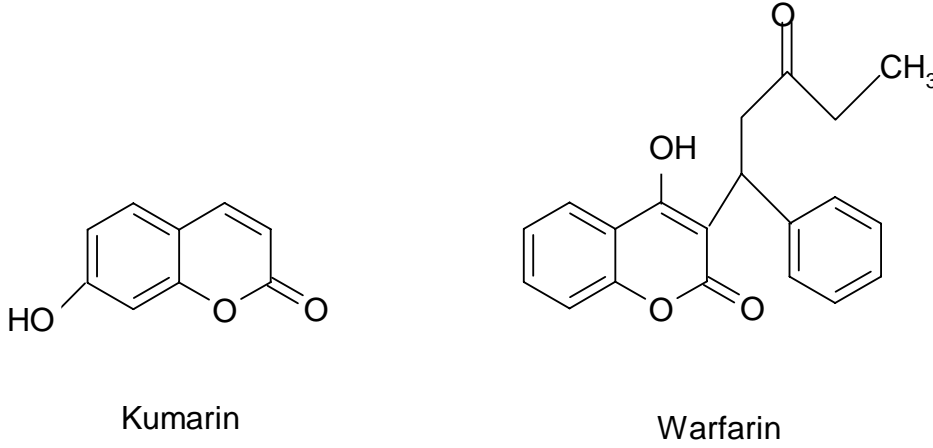
Şekil 1.4. Ellagitanin'in yapısı.

Fagositik hücrelerin uyarımı, host-mediated tümör aktivitesi ve anti-infektif aksiyonlar gibi birçok aktivite tanenlerle ilgilidir. Onların moleküler fonksiyonları proteinler ile kompleksleşmelerinden ileri gelir. Antimikrobiyal etkileri kinonlarda olduğu gibidir. Enzimler, polisakkaritler, proteinler ile kompleksleşerek onları inaktive ederler.

Tanenlerin antimikrobiyel özellikleri incelenmiş ve yapılan çalışmalarla bakteri, maya ve mantarlara karşı toksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Kondense tanenler bakterilerin hücre duvarına bağlanarak ayrıca büyümeyi ve proteaz aktivitesini engelleyerek etkili olurlar (Scalbert, 1991).

1.1.5. Kumarinler

Kumarinler, benzen ve α -piron halkalarından oluşmuş bileşiklerdir ve karakteristik ot kokusundan sorumludurlar. 1996'ya kadar 1300 kumarin türevi tanımlanmıştır. Onların asıl ünü anti-trombotik, anti-enflamatuar ve damar genişletici aktivitelerinden ileri gelir.



Şekil 1.5. Kumarin ve warfarin'in yapıları.

Warfarin, iyi bilinen bir kumarin türevidir ve antikoagulant olarak kullanılır. Ayrıca antiviral etkiye de sahiptir (Keating ve O'Kennedy, 1997). Kumarinlerin kemirgenlerde yüksek toksik etki gösterdiği bilinmektedir bu yüzden medikal olarak dikkatlice kullanılmalıdır. Bununla beraber son yapılan birçok *in vivo* hayvan denemesi, bu sonuçların insanlarla özdeşmeyeceğini göstermiştir ve toksik kumarin türevleri insanların idrarından güvenle atılmaktadır (Weinmann, 1997).

1.1.6. Uçucu Yağlar ve Terpenoidler

Uçucu yağlar bitkinin özelliğine göre çok değişik organlarında yoğunlaşma göstermektedirler. Bitkinin köklerinde (zencefil), gövde ve kabuk kısımlarında (tarçın), yapraklarda (nane, defne), meyve kısmında (portakal, limon) veya çiçeklerde (gül, yasemin) bulunabilirler.

Uçucu yağlar genellikle oda sıcaklığında sıvıdırlar, ancak sıvı olmayan uçucu yağlarda vardır. Buharlaştıklarında geride herhangi bir kalıntı bırakmazlar. Suda çok az (1/200 oranında) çözünürler. Ancak bu çözünme bile kokularının suya geçmesi için yeterlidir. Genel olarak renksiz veya açık sarı renklidirler.

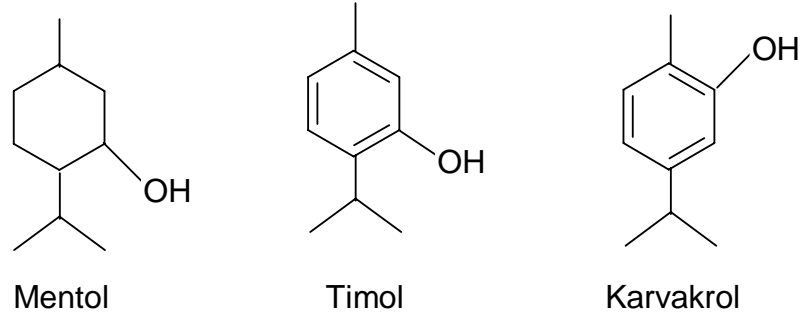
Uçucu yağlar kimyasal bileşimlerine, aromatik özelliklerine ve terapötik etkilerine göre sınıflandırılabilirler.

Kimyasal bileşimleri yönünden uçucu yağlardaki maddeler 4 grup altında toplanabilirler.

- 1- Terpenik maddeler
- 2- Aromatik maddeler
- 3- Düz zincirli hidrokarbonlar
- 4- Azot ve kükürt taşıyan bileşikler

Uçucu yağların büyük çoğunluğu (% 90 civarında) terpenik maddelerden oluşmuştur. Terpenler izopren (2-metil-1,3-bütadien) oligomeri olarak tanımlanabilirler. İzopren, C₅ bileşimidir doğada bulunmaz ama bunun 2,3,4...katları yani C₁₀, C₁₅, C₂₀, C₃₀, C₄₀'lar doğada bulunurlar ve bunlar sırasıyla monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler ve tetraterpenler olarak isimlendirilirler.

Terpenler doymuş veya doymamış, düz zincirli veya halkalı hidrokarbon olabileceği gibi, alkol, aldehit veya keton gruplarında içerebilirler. Bu bileşikler ilave olarak elementler (genellikle O₂) içerdiği zaman terpenoidler olarak adlandırılırlar. Örneğin halkalı ve oksijen içeren monoterpenlerden mentol nane yağında, timol ve karvakrol kekik yağında bulunur.



Şekil 1.6. Mentol, timol ve karvakrol'un yapıları

Terpenler ve terpenoidler bakteri, fungi, virüs ve protozalara karşı aktiftirler. 1977'de o tarihe kadar incelenen uçucu yağ türevlerinin % 30'u bakterileri inhibe ederken, % 60'ında mantarları inhibe ettiği belirtilmiştir (Chaurasia ve Vyas, 1997).

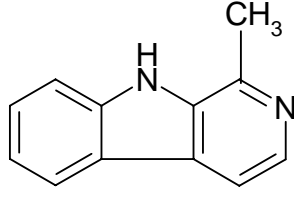
Terpenlerin etki mekanizması tamamen anlaşılmalı değildir fakat lipofilik bileşikler ile membranın zarar görmesi şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Mendoza yaptığı bir çalışmada kauren diterpenoidinin metil grupları eklenmesi ile hidrofilikliğinin artmasıyla, antimikrobiyal aktivitesinin azaldığını bulmuştur.

Yonca bitkisinin etanol-su fraksiyonundan ayrılan petalostemumol terpenoidi, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı mükemmel bir aktivite, gram-negatif bakterilere ise düşük aktivite göstermiştir (Hufford ve ark., 1993).

1.1.7. Alkaloitler

Heterosiklik azot bileşikleri alkaloitler olarak adlandırılır. Morfin 1805'de *Papaver somniferum* bitkisinden izole edilen ve medikal olarak kullanılan ilk alkaloittir. Diterpenoid alkaloitler genel olarak *Ranunculaceae* familyasının bitkilerinden izole edilmişlerdir ve antimikrobiyal özelliklere sahip oldukları bulunmuştur (Khan ve ark.,1997).

Berberin, alkaloitlerin dikkat çekici bir örneğidir. Plasmodia ve tripanozomlara karşı oldukça etkilidir. Berberin ve harman gibi kuaterner alkaloitlerin etki mekanizması onların DNA ile etkileşiminden kaynaklanır.

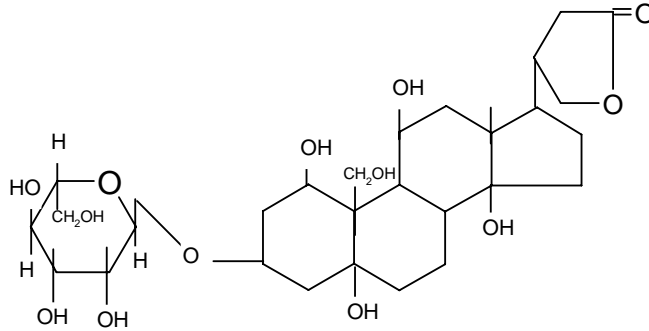


Şekil 1.7. Harman'ın yapısı

1.1.8. Glikozitler

Glikozitler, bir şekerin indirgeyici grubu ile şeker olmayan bir bileşikten (aglikon) su çıkışı ile birleşmeleriyle oluşurlar. Bu bağlantı, şekerin redüktör grubu ile aglikonun hidroksil, tiyol, amin veya doğrudan karbona bağlı bir hidrojeni arasından su çıkışı suretiyle olduğuna göre sırasıyla, O-glikozitleri, S-glikozitleri, N-glikozitleri ve C-glikozitleri oluşur. Bunlar arasında bitkilerde en fazla O-glikozitlerine rastlanmaktadır. Siyanogenetik glikozitler, kalp kuvvetlendirici glikozitler, saponin glikozitleri de önemli bir yer tutarlar (Çubukçu, 1992).

Örneğin bir kalp glikozidi olan qubain'in yapısı aşağıda gösterilmektedir. Qubain hücre zarlarındaki Na^+ / K^+ ATPaz'ın inhibitörüdür (Pamuk, 2000).



Qubain

Şekil 1.8. Qubain glikozidinin yapısı

Glikozitlerin bir grubu olan saponinler birkaç bitki türünde bulunmuş ve suda köpürme özellikleri ile karakterize edilmişlerdir. Saponin glikozitlerin hidrolizi bir triterpen veya steroid ve glikoz, galaktoz, ksiloz gibi şeker verir.

1.1.9. Lektinler ve Polipeptitler

Mikroorganizmalar için inhibitör olan peptidler ilk olarak 1942 yılında bulunmuştur. Bu peptitler genellikle disülfid bağları içerirler ve pozitif yükle yüklenmişlerdir. Etki mekanizmaları mikrobiyal membranda iyon kanallarının oluşumu veya polisakkarit reseptörlerine mikrobiyal proteinlerin adhezyonunun yarışmalı inhibisyonu olabilir. Son çalışmalar ani-HIV peptidler ve lektinler üzerinde yoğunlaşmıştır ama bu makromoleküllerin bakteriler ve mantarları inhibisyonu uzun zamandır bilinmektedir.

Thioninler arpa ve buğdayda bulunan ve 47 aminoasitten oluşan peptidlerdir. Bunlar gram-pozitif bakterilere, gram-negatif bakterilere ve mayalara karşı toksik etki gösterirler (Fernandes de Caleya, 1972). Şekerpancarından AX1 ve AX2 thioninler mantarlara karşı aktivite göstermişler fakat bakterilere göstermemişlerdir (Kragh ve ark., 1995). Fava fasülyesinden 47 aminoasitli bir peptid olan fabatin tanımlanmıştır ve *E.coli*, *P.aeruginosayı* inhibe ederken, *Candida* ve *Saccharomyces*'lere etki etmemiştir (Zhang ve Lewis, 1997).

Acı kavundan elde edilen MAP30, *Gelonium multiflorum*'dan elde edilen GAP31 ve jacalin mannoz-spesifik lektinlerdir. Bunlar tehlikeli hücre bileşenleri ile viral etkileşimi inhibe ederek viral üremeyi engellerler. Etki mekanizmasının adhezyon inhibisyonu olarak gerçekleştiği düşünülmektedir fakat bu etki genel bitki antimikrobiyal inceleme metodlarıyla belirlenmemektedir.

1.2. Antimikrobiyal Maddelerin Etki Mekanizmaları

Bitkilerden elde edilen etken maddeler başlıca 5 mekanizma ile antimikrobik etki gösterirler.

- 1- Hücre duvarı sentezini durdurarak
- 2- Hücre zarı işlevini bozarak
- 3- Mikroorganizmanın protein sentez mekanizmalarını engelleyerek
- 4- Mikroorganizmanın nükleik asit sentezini inhibe ederek
- 5- Antimetabolik etki göstererek

1.2.1. Hücre duvarının sentezini önleyerek etkili olanlar

β -Laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler), glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin), basitrasin, sikloserin gibi antimikrobik maddeler bu mekanizma ile etkili olurlar (Öztürk, 1997).

Hastalık yapan bakterilere karşı geliştirilen ilaçlar genellikle hücre duvarının sentezini veya yapısını bozmak için planlanır. Çünkü bu yapı bozulunca bakteri yaşamını sürdüremez (Pamuk, 2000).

Hücre duvarı bakterinin bütünlüğünü koruyan, bölünme ve çoğalmasını sağlayan kısımdır. Hücre duvarı murein denilen bir polimer bileşikten oluşmaktadır. Bu madde bir mukopolisakkarit olan lineer peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlarla birbirine bağlanmaları sonucu oluşur. Bakteri hücre duvarı, dış ortamdan aktif taşıma ile alınan suda çözülmüş pek çok maddenin yükselttiği hücre içi osmotik basınca karşı direnip bakterinin bütünlüğünü koruyarak parçalanmasına engel olur. Hücre duvarı sentezinde en az 30 enzim görev alır ve 4 basamakta gerçekleşir (Pamuk, 2000).

I- Heksozların öncü nükleotidlere dönüştürülerek aktive edilmesi sağlanır:

Bu basamakta sitoplazmik enzimler yardımıyla heksozlardan uridin difosfat N-asetil glikozamin (NAG) ve uridin difosfat N-asetil muramik asit (NAM) birimleri oluşur.

II- Pentapeptid yan zincirlerinin oluşup N-asetil muramik aside eklenmesi:

Muramik asidin karboksil grubuna bağlı olarak beş aminoasitten oluşan pentapeptid yan zincirinin ortaya çıkması sonucu N-asetil muramil pentapeptid yan dalı oluşur. Bu esnada yan dalın ucundaki D-alanil-D-alanin rezidüsü ayrı bir dipeptid olarak meydana geldikten sonra daha önce oluşmuş 3 aminoasitlik segmentin ucuna bir blok halinde oturtulur. Sonuçta UDP-N-asetil muramilpentapeptid oluşur.

III- Peptidoglikan zincirinin oluşması ve pentaglisin köprüsünün bağlanması:

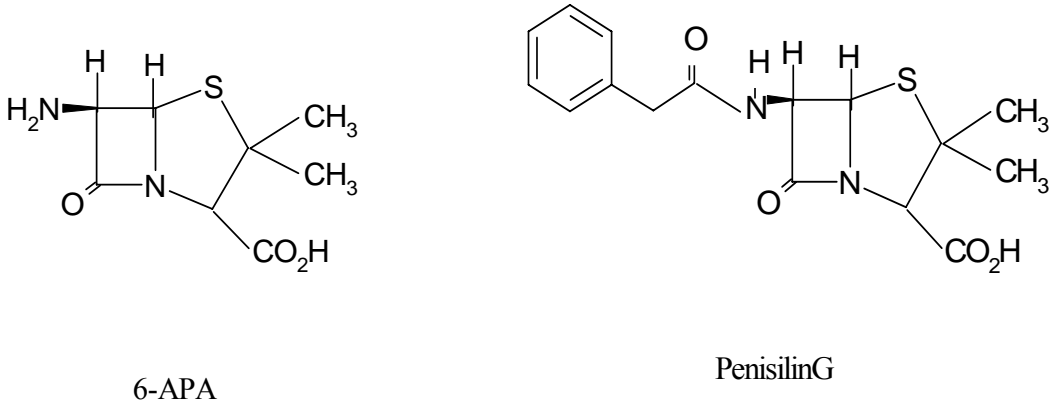
Öncü iki nükleotid, UDP gruplarını kaybederek birbirleri ile sitoplazma membranındaki bir fosfolipidin yardımıyla bağlanırlar. Bu şekilde disakkaritler polimerize olur ve uzun bir polimer olan lineer peptidoglikan zincirler ortaya çıkar.

Vankomisin, basitrasin, sikloserin gibi antibiyotikler bu aşamaya kadarki olaylarda inhibisyon yaparak etkili olurlar. Örneğin glikopeptidler hücre duvarı öncü maddeleri D-alanil-D-alanin ile kompleks yaparak peptidoglikan sentezini bozarlar.

IV- Çapraz bağlanma (transpeptidasyon):

Yapıca bir kafese benzeyen hücre duvarında peptidoglikan zincirlerin arasında da bağlar oluşacaktır, bunu da NAM birimleri arasında transpeptidasyon sonucu çapraz bağlanma sağlar. Bu aşamada karboksipeptidaz ve endopeptidazlar rol alır. Bu enzimlerin aktif bölgesi serin aminoasidinin bulunduğu bölgedir. Bu enzimler pentapeptid yan zinciri sonundaki D-alanil-D-alanin peptidine bağlanabildikleri gibi serin içeren aktif bölgeleri ile penisilinde bağlanabilirler. Bunun nedeni D-alanin ile penisilin arasındaki stereik benzerliktir. Bu nedenle transpeptidaz enziminin aktif serin bölgesi, alanin yerine onun anoluğu gibi davranan penisiline geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Sonuçta bir başka NAM'a bağlı pentapeptidle peptid bağı oluşamaz ve kafes benzeri duvar oluşumu durmuş olur.

Örneğin penisilinler güçlü bakterisidal etkili ve düşük toksisiteli β -laktam türevi bir antibiyotik grubudur. Kimyasal yapıda yapılan değişiklikler ile çok sayıda türevi geliştirilmiştir. Penisilinlerde temel yapıyı bir betalaktam halkası, bir tiazolidin halkası ve yan zincir oluşturur. Betalaktam ve tiazolidin halkasının oluşturduğu yapıya 6-aminopenisilanikasit (6-APA) denir. Halen kullanılan tüm penisilinler 6-APA türevidir. Yan zincirlerdeki değişiklikler ise antibakteriyel spektrumu ve farmakolojik özellikleri belirler (Newman ve ark., 2000).

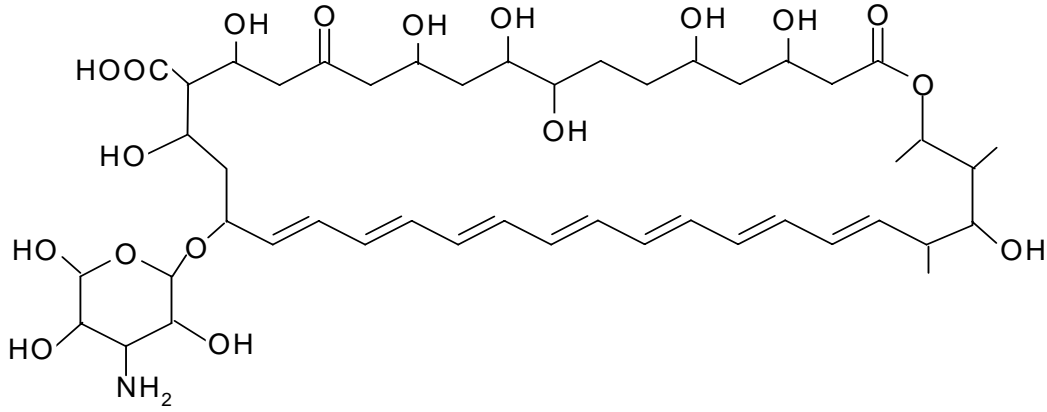


Şekil 1.9. 6-APA (6-aminopenisilanikasit) ve penisilinG'nin yapıları

1.2.2. Hücre Zarının İşlevini Bozarak Etki Edenler

Polimiksinler, nistatin, Amfoterisin B, imidazoller bu mekanizma ile etkili olurlar (Öztürk, 1997).

Stoplazma zarı mikroorganizma için gerekli maddelerin dış ortamdan difüzyon veya akif taşımayla alındığı osmotik bir engeldir. Bu aşamada etkili antimikrobik maddeler sitoplazma zarının geçirgenliğini arttırıp sitoplazma içindeki genellikle ufak moleküllu bileşiklerin (aminoasitler, nükleotitler) dışarı çıkmasına neden olup mikroorganizmanın ölümüne neden olurlar (Mıstık, 2000).



Şekil 1.10. Amfoterisin B'nin yapısı

Örneğin amfoterisin B, mantarların hücre zarına bağlanmakta ve zarın geçirgenliğini arttırmaktadır. Mikonazol ve ketokonazol gibi mantar ilaçları ise ergosterol sentezini inhibe ederek zarın yapısını ve geçirgenliğini bozmaktadır (Tanır ve Göl., 1999).

1.2.3. Protein Sentezini Bozarak Etki Edenler

Aminoglikozitler (kanamisin, gentamisin, neomisin), tetrasiklinler, makrolitler bu şekilde etki ederler (Öztürk, 1997).

Bu grup antimikrobikler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etkili olurlar. Bunlar ribozomda farklı etkilere neden olurlar (Mıstık, 2000).

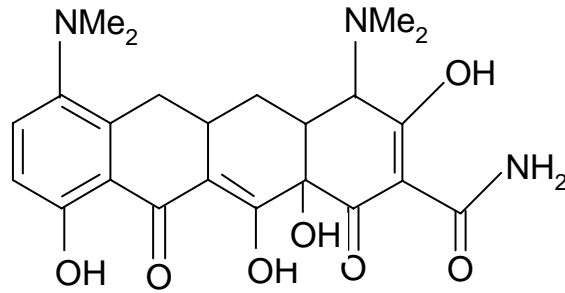
I- Aminoasitlerin aktivasyonunu yani tRNA'ya bağlanmasını inhibe etmek.

II- mRNA'nın ribozamlara bağlanmasını veya aminoasit tRNA bileşiğinin ribozom-mRNA bileşiğine katılmasını inhibe etmek.

III-Peptidil transferaz enziminin etkinliğini azaltarak peptid bağları oluşumunu inhibe etmek.

IV- mRNA üzerindeki kodonların, tRNA'lar tarafından yanlış okunmasına neden olmak.

Aminoglikozitler bakterilerin 30 S ribozomal alt birimlerine geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar ve bu şekilde mRNA'nın 30 S ribozoma bağlanmasını bozarak translasyonu engellerler. Aminoglikozitler ayrıca genetik kodun yanlış okunmasında sebep olurlar (Tüzün, 1997).



Şekil 1.11. Bir tetrasiklin olan minosiklin'in yapısı.

Tetrasiklinler 30 S ribozomal alt birimlerine geri dönüşümlü olarak bağlanırlar ve aminoasil tRNA'nın RNA-ribozom kompleksine bağlanmasını engelleyip polipeptid sentezini engellerler (Newman ve ark., 2000).

Makrolitler 50 S ribozomal alt birimlerine geri dönüşümlü olarak bağlanırlar ve buraya tRNA'nın bağlanmasını ve polipeptid sentezini engellerler (Newman ve ark., 2000).

1.2.4. Mikroorganizmanın Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler

Kinolonlar, nitrofuranlar, vidarabin, asiklovir, nitroimidazol türevleri bu şekilde etki ederler (Öztürk, 1997).

Bu antimikrobikler DNA sentezini veya DNA sentezi altında yapılan mRNA sentezini bozarlar (Nau ve Eiffert., 2002).

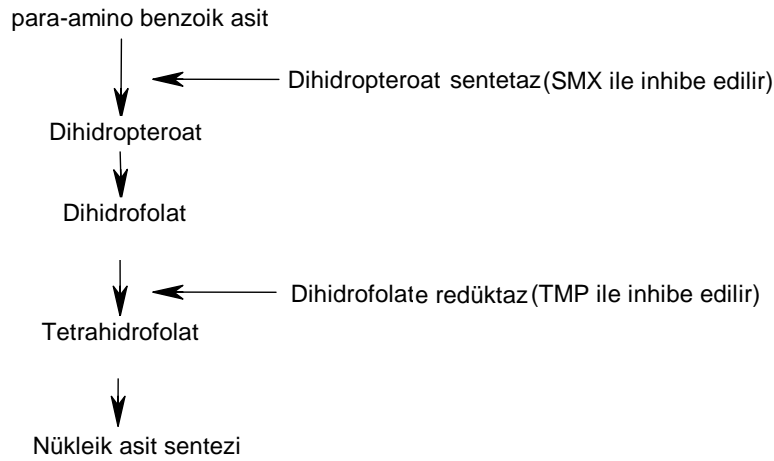
Kinolonlar, bakteri DNA'sını sarmal halde tutan ve DNA'nın transkripsiyonunda rol oynayan DNA giraz enzimini inhibe ederler. Sarmal yapının bozulmasıyla DNA fonksiyonları bozulur (Öztürk, 1997).

Metronidazol hücreye alındığı zaman yapısında bulunan nitro grubu sitoplazmadaki nitroredüktaz enzimiyle indirgenir ve oluşan sitotoksik bileşikler ve serbest radikaller bakterinin DNA'sına bağlanıp, yapının bozulmasına yol açarlar (Newman ve ark., 2000).

1.2.5. Antimetabolitler

Sülfonamidler, izoniazit, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, 5-florositozin bu grupta yer almaktadır (Öztürk, 1997).

Antimetabolitler yapıca substratlara benzer ve enzimlerin üzerindeki aktif bölgeler için onlarla yarışır. Bakterilerin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini engeller. Örneğin sülfonamidler dihidropteroat sentetazı inhibe edip pteridinden dihidropteroik asit sentezini bozarlar ve dihidrofolik asidin ve dihidrofolat redüktazla bundan oluşan tetrahidrofolik asidin sentezi azalır. Sonuçta pürin bazları ve timidinin yapımını sağlayan enzimlerin kofaktörü olan tetrahidrofolat türevleri yapılamaz ve bakterilerde DNA ve RNA sentezi bozulur (Newman ve ark., 2000).



Şekil 1.12. Trimetoprim-sülfametoksazol'ün (TMP-SMX) etki mekanizması.

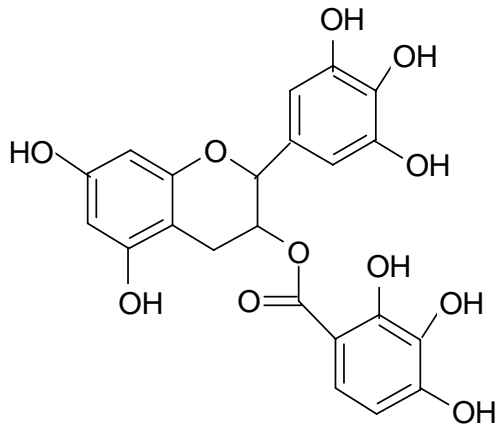
1.3. Etken Maddelerin Hastalıklara Etki Mekanizmaları

1.3.1. Enzim İnhibisyonu

Yapılan çalışmalarla bitkilerden kanser, AIDS, hepatit, diyabet, kalp-damar ve romatizmal hastalıkların tedavisinde yararlanılabilecek etkili bileşikler izole edilmiştir.

Ayrıca bitkilerde bulunan bileşiklerin yatıştırıcı, iltihap söktürücü, enzimleri inhibe edici özellikleri ve antioksidant, östrojenik, antibakteriyel, antifungal, antivirüs aktivitesi gösterdikleri yapılan çalışmalar ile bulunmuştur.

Örneğin özellikle Çin ve öteki Uzakdoğu ülkelerinde tüketilen yeşil çayın kanseri önlediğine inanılmaktadır. Yeşil çay pek çok polifenol bileşiği içerir. Kateşinler olarak adlandırılan bu bileşiklerin en önemlileri; epigallokateşin-3-gallat (EGCG), epigallokateşin (EGC) ve epikateşin-3-gallat (ECG)'dir.



EGCG (Epigallokatesin-3-gallat)

Şekil 1.13. EGCG (Epigallokateşin-3-gallat)'nin yapısı

Kanser yayılmak ve hücelere saldırmak için proteolitik enzime gereksinim duyar. Bu enzimlerden biri ürokinaz (uPA)'dır. uPA'nın inhibisyonu ile farelerde tümör boyutunun küçüldüğü veya tamamen ortadan kalktığı bulunmuştur. Kanser tedavisinde, bilinen uPA inhibitörlerini zayıf aktiviteleri ve yüksek toksik özelliklerinden dolayı kullanmak mümkün değildir. EGCG, ürokinaz enziminin katalitik bölgesinde olan His57, Ser195 ve Arg35'i bloke ederek enzimin etkinliğini ortadan kaldırır. EGCG, bir ürokinaz inhibitörü olan Amilorit'den daha zayıf bir inhibitördür ama yüksek dozda kullanılmasının hiçbir toksik etkisi yoktur. Amilorid günde maksimum 20 mg kullanılabilirken, bir fincan çay 150 mg EGCG içerir (Jankun ve ark., 1997).

1.3.2. Angiogenezin İnhibisyonu

Yapılan diğer bir çalışmada bitkilerden elde edilen maddelerin angiogenezi inhibe ettiği bulunmuştur. Oluşum aşamasında durdurulamayan kanser hücrelerinin

büyüme ve diğer dokulara yayılmasına metastaz denir. Büyüyen tümörler oksijen ve besin almak için kendi kan damarlarını oluştururlar. Bilim adamları angiogenez adı verilen bu damarlanmayı önlemek için yoğun araştırmalar yapmaktadırlar.

Tümör hücreleri, fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri üretme yeteneği elde ettikleri zaman, yeni kan damarlarının oluşumu uyarılır. Bu büyüme faktörleri, endotel hücrelerini çevredeki kapillerlerden tümöre doğru çeker ve çoğalmayı uyararak yeni kapiller oluşumunu sağlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmesi üzerinedir.

Yapılan çalışmada bir grup fareye içecek olarak yalnız su, diğerlerine yeşil çay katılmış su verilmiştir. Bunların vasküler endotel büyüme faktörü aşılınmış göz kornea tabakalarındaki değişim incelenmiştir. Farelere verilen sudaki çay oranı % 25'tir ve buda insanların içtiği günde 3 bardak çaya karşılık gelir. Sonunda sadece su verilen farelerin göz kornea tabakaları hızla damarlanırken, çay verilen farelerde damarlanmanın önlendiği görülmüştür (Cao ve Cao, 1999).

1.3.3. Gen Ekspresyonu

Kanserde gen tedavisinin amacı çalışmayarak kanserleşmeye engel olamayan genleri tekrar çalışır hale getirmektir. Kanser hastalığının başlangıcı genlerin mutasyon neticesinde bozulması esasına dayanmaktadır. Son araştırmalar ışığında p53 (tümör baskılayıcı gen) geninin, kanserin oluşmasında durdurucu role sahip olduğu bilinmektedir.

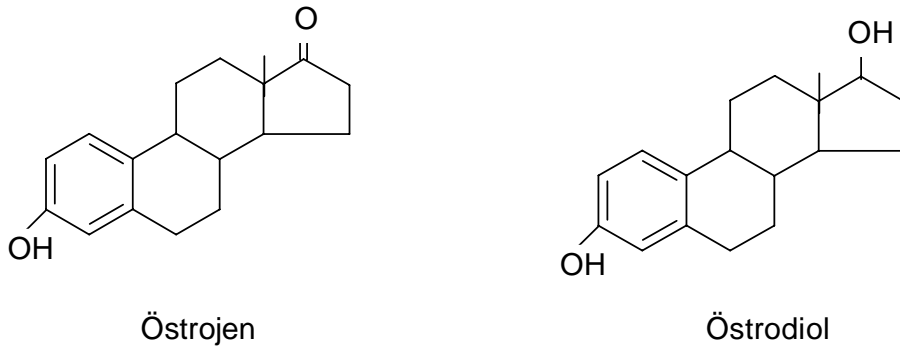
Selaginella tamariscina bitkisi Asya'da halk arasında çok yaygın kullanılan tıbbi bir bitkidir. Yapılan çalışmada *Selaginella tamariscina* ekstrelerinin p53 genine etkileri incelenmiştir. İnsan leukimia U937 hücreleri değişik konsantrasyonlarda *Selaginella tamariscina* ekstreleri ile denenmiş ve bu bitkinin p53 geninin ekspresyonunu teşvik ettiği bulunmuştur (Lee ve ark.; 1999).

1.3.4. Fitoöstrojenik Etki

Bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda östrojen etkisi gösterdikleri de bulunmuştur. Östrojen vücudun normal işlevleri için gerekli olmakla birlikte fazla

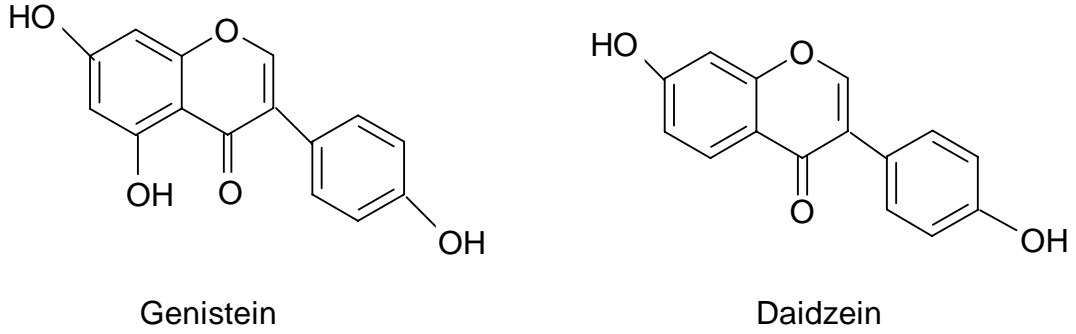
olduğu zaman hormonlarla ilgili kanserlere yol açmaktadır. Bitkilerde bulunan ve hafif östrojen etkisi gösteren maddeler ise östrojen metabolizmasını düzenlemektedirler. Bu maddeler fitoöstrojenler olarak adlandırılır.

Fitoöstrojenler bitkisel kaynaklı, difenolik moleküller olup yapı ve fonksiyon olarak östrodiol'e benzerlik göstermektedirler. Östrodiol, östrojenin metabolitidir.



Şekil 1.14. Östrojen ve Östrodiol'ün yapıları.

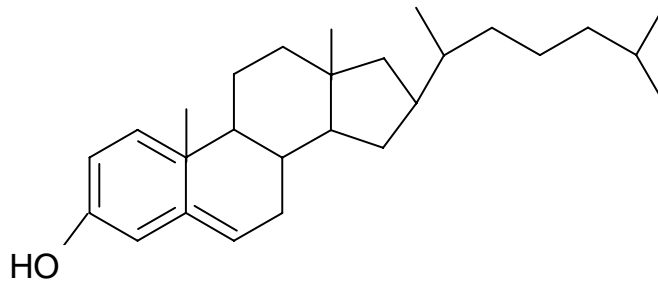
Soya fasulyesi isoflavon grubunun temel besin kaynağını oluşturmaktadır. İsoflavonların aktif maddeleri genistein ve daidzein olup bu moleküllerin hafif östrojenik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Östrojenik aktivitelerinin varlığı östrojen reseptörlerine bağlanmaları ile ilişkilidir. Bu bağlanmayı sağlayan molekülün yapısında bulunan aromatik halka üzerindeki hidroksil grubudur. Östradiol ile kıyaslandığında bu bağlanma genistein ve daidzein için sırasıyla 100 ve 1000 kat daha düşük olmakla birlikte diyetle tüketildiği miktar biyolojik olarak etki gösterebilmektedir (Miksicek, 1993).



Şekil 1.15. Genistein ve daidzein'in yapıları

İsoflavonlar Asya toplumunda, öncelikli olarak soya şeklinde yoğun olarak tüketilmektedir. Bitkisel kaynaklı proteinler ile hayvansal kaynaklı proteinlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda soya proteininin sıklıkla seçilmesinin temel sebebi kalite olarak hayvansal proteine en yakın bitkisel protein olmasıdır. Amerikan toplumunun günlük genistein tüketimi 1-3 mg iken, bu miktar Asya toplumlarında 20-80 mg'a ulaşmaktadır (Barnes ve ark., 1995).

Fitoöstrojenlerin lipid profili üzerine olumlu etkileri de bildirilmiştir. Yüksek oranda fitoöstrojen içeren diyetle beslenenlerde koroner arter hastalığı riskinin az olması fitoöstrojenlerin lipid profiline olan olumlu etkileri ile açıklanabilmektedir. Kalp hastalığı riskini artıran etmenler arasında kolesterolün rolü uzun zamandır bilinirken 1970'li yıllarda kolesterolün kanda taşınmasını sağlayan maddelerin rolü ortaya çıkmıştır. İnsan vücudunda 150-200 gr kolesterol bulunur. Bunun bir kısmı besinlerle dışardan alınır, büyük bir kısmı yağ asitleriyle esterleşmiş haldedir.



Şekil 1.16. Kolesterol'ün yapısı

Kolesterol kanda küçük yağ damlacıklarından ve proteinden oluşan lipoprotein adlı maddeler içinde dolaşır. Lipoproteinler çeşitli olmakla beraber özellikle ikisi kalp hastalıkları açısından önemlidir. Bunlardan yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) çok az kolesterol içerirler ve kolesterolü kandan karaciğere taşırlar. Vücuttaki fazla kolesterolü temizleme işini üstlenmiş olduklarından, kandaki miktarının yüksek olması kalp hastalığı riskini azaltır. O nedenle halk arasında iyi kolesterol olarak bilinirler. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) adlı başka bir lipoprotein ise, hemen hemen yarısını oluşturan kolesterolü karaciğerden vücudun diğer hücrelerine taşır ve damarların çeperlerine biriktirir. Bu nedenle kalp hastalığı riskini artıran bu lipoproteine kötü kolesterol denir.

İnsanlarda soya tüketiminin lipid profiline olan etkilerinin incelendiği 38 çalışmanın analizinde total kolesterol düzeyinde ortalama % 9,3, düşük yoğunluklu lipoprotein düzeyinde % 12,9 ve trigliserid düzeyinde % 10,5 azalma rapor edilmiştir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein düzeyinde ise % 2,4'lük artış olmuştur. Bu çalışmalarda tüketilen ortalama soya proteini miktarı ise 47 gr/gün olarak bildirilmiştir. Lipid profilindeki bu olumlu değişikliklerin soyanın isoflavon içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Anthony ve ark., 1997).

Fitoöstrojenlerin kolesterol düşürücü mekanizmaları üzerinde farklı teoriler ileri sürülmüştür. Fitoöstrojenler safra asidi atılımını artırmaktadır. Bu etki kolesterolün vücuttan atılımını sağlamakta, dolayısıyla karaciğerden safra asidi sentezi ve LDL-kolesterol reseptör aktivitesi artmaktadır (Potter, 1995).

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Genel Bilgiler

2.1.1. *Anthemis tinctoria*'nın Sistematığı

Anthemis tinctoria, *Compositae* (*Asteraceae*) familyasının *Anthemis* cinsine mensup bir bitkidir.

20-60 cm (nadiren 80 cm) boyunda 2 veya çok yıllık otsu bir bitkidir. Gövdesi basit veya üst kısımları az ve uzun dallıdır. Yapraklarının üst kısmı tüysüz veya çok seyrek tüylü, alt kısmı ise sık ve kısa tüylerle örtülüdür. Kapitulum radiat 2,5-4 cm genişliğinde, involukrum 1-2 cm genişliğindedir. Kapitulumda verimli tubulat çiçeklerle verimsiz ligulat çiçekler altınsarı rengindedir. Bitki Mayıs-eylül'de çiçeklenir. Kireçli ve killi-kumlu toprakları tercih eder. Dağınık olarak çalılık yerler, kurak çayırılık yamaçlar, dağ stepleri ve yol kenarlarında yetişir (Uysal, 1991).



Şekil 2.1. *Anthemis tinctoria*'nın genel bir görünüşü.

Türkiye’de Tekirdağ’dan Hakkari’ye kadar yayılış gösterir. Çanakkale’de ise Gökçeada; Zeytinli, Eskibademli, Ecebat; Kilitbahir, Abideler, Kabatepe, Arıburun, Gelibolu; Bolayır, Çan, Ezine;Yeniköy, Bozcaada; İğdelik, Ayvacık; Süleymanköy, Dibekli, Yenice; Davutköy, Merkez; Kumkale, Çınarlı, Çiftlikdere’de yayılış gösterir. Çiçekleri mordanlanarak sarı rengin tonları elde edilir (Uysal, 1991).



Şekil 2.2. *Anthemis tinctoria*'nın doğal ortamda görünüşü.

Anadolu’da 50 kadar *Anthemis* türü bulunmaktadır. Bunlardan aşağıdaki türlerin çiçek durumları, papatya çiçeği altında, tedavide veya boyarmadde olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999).

Anthemis arvensis (Yabani papatya, Öküzgözü, Sığırgözü, Sığır papatyası) 30-40 cm yükseklikte seyrek tüylü, bir yıllık otsu bir bitkidir. Yol kenarları ve boş tarlalarda yetişir. Trakya ve Kuzey Anadolu’da bulunur. Oldukça nadir bir türdür.

Anthemis auriculata (İzmir papatyası) 20-50 cm yükseklikte, yatık tüylü, bir yıllık otsu bir bitkidir. Kireçli sırtlar, boş tarlalar ve çam ormanı altlarında yetişir. Batı Anadolu’da oldukça yaygın bir türdür.

Anthemis chia (Beyaz papatya) 10-30 cm boyunda, seyrek tüylü, bir yıllık otsu bir bitkidir. Trakya, Ege ve Akdeniz bölgelerinde yaygın bir türdür. Bu türün çiçekleri aktarlarda adi papatya yerine satılmaktadır. Çiçekleri adi papatyadan daha büyük ve daha gösterişli ve kolayca dağılmaması nedeniyle halk tarafından tercih edilmekte ve adi papatya yerine kullanılmaktadır. Kurutulmuş çiçeklerinde % 0,35 uçucu yağ bulunduğu saptanmıştır. Kumaşları sarı renge boyamak içinde kullanılmaktadır. Diğer isimleri Margariti ve Eşek papatyasıdır.

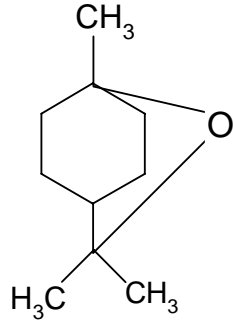
Anthemis cotula (Köpek papatyası) 20-50 cm yükseklikte, kötü kokulu, otsu ve bir yıllık bir bitkidir. Doğu Anadolu hariç Türkiye’de yaygın bir türdür. Az miktarda uçucu yağ, organik asitler, glikozitler, alkaloit taşımaktadır. Çiçekleri infüzyon halinde (%2) uyarıcı ve gaz söktürücü olarak kullanılmaktadır.

Anthemis tinctoria çiçeklerinde taşıdığı xanthorhamnetin ve quercetin boyarmaddeleri nedeniyle alüminyum şapı ile sarı, diğer mordanlarla tarçın rengi, zeytin yeşili, parlak turuncu ve metalik sarı renklerini vermektedir (Ölmez, 2002).

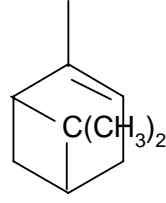
Çanakkale’de Ayvacık ilçesi Süleymanköy’de *Anthemis tinctoria*’nın boyamada kullanıldığı görülür. Yeterince bulunamadığından *Anthemis cotula*, *Anthemis pseudocotula*, *Anthemis cretica*, *Anthemis austriaca* çiçekleride toplanarak kullanılmaktadır. Beyaz papatyanın çiçeklerinde şap mordanı ile sarı renk veren apigenin boyar maddesi vardır (Uysal, 1991).

2.1.2. *Anthemis tinctoria* ve bazı *Anthemis* türlerinin kimyasal bileşimi

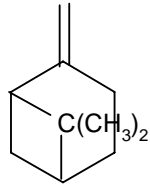
Anthemis tinctoria’nın çiçeklerinde bulunan esansiyel yağların kimyasal bileşimi kapiler GC/MS (Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi) ile analiz edilmiştir. Yoğun olarak bulunan bileşikler 1,8-sineol (% 7,9), beta-pinen (% 7,3), dekanolik asit (% 5,4) ve alfa-pinen (% 4,4) olarak bulunmuştur (Holla ve ark., 2000).



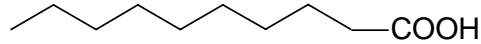
1:8 cineole



alfa-pinen



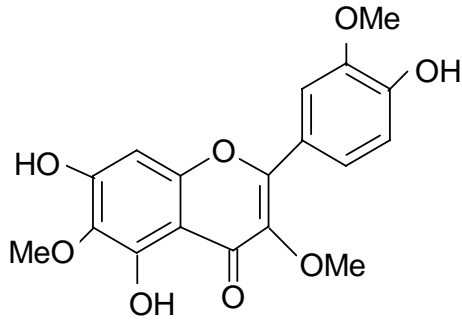
beta-pinen



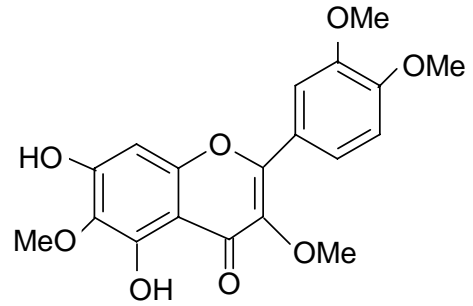
dekanoik asit

Şekil 2.3. 1:8 sineol, alfa-pinen, beta-pinen ve dekanoik asidin yapıları.

1991 yılında yapılan çalışmada *Anthemis tinctoria*'dan quercetagenin 3,6,3'-trimetil eter ve quercetagenin 3,6,3',4'-tetrametil eter ayrıca diğer bir *Anthemis* türü olan *Anthemis nobilis*'ten 6-hidroksiflavon yapıları aydınlatılmıştır (Wollenweber ve Mayer, 1991).



quercetagenin 3,6,3'- trimetil eter



quercetagenin 3,6,3',4'- tetrametil eter

Şekil 2.4. Bitkide bulunan quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter ve quercetağetin 3,6,3',4'-tetrametil eter'in yapıları.

Diğere bir çalışmada ise 4 adet *Anthemis* türü incelenmiştir. İncelenen bitkilerin yaprak ve iek kısımlarında başlıca olarak santin, quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter, scutellarein 6,4'-dimetil eter ve 6-hidroksiluteolin 6,3'-dimetil eter'in varlığı belirlenmiştir. Bitkilerde polar flavonoidler izole edilmiş ve tanımlanmiştir. *Anthemis* türleri yapraklarda genel olarak flavonol glikozitlere sahiptirler, diğere türlerde ise farklı olarak flavon *O*-glikozitler bulunur. *Anthemis tinctoria*'dan ilk kez patuletin 3-glukozit ve patuletin 3- rutinosid tanımlanmiştir (Williams ve ark., 2001).

5 *Anthemis* türünün flavonoidlerinin incelenmesinde; *Anthemis tinctoria*'da quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter ve quercetağetin 3,6,3',4'-tetrametil eter, *Anthemis chia*'da santin ve quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter, *Anthemis cretica*'da scutellarein 6-metil eter, 6-hidroksiluteolin 6-metileter, 6-hidroksiluteolin 6,3'-dimetil eter ve 6-hidroksiluteolin 6,7,4'-trimetileter, *Anthemis dumetorum*'da santin, quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter, apigenin, apigenin 7-metileter, chrysoeriol, scutellarein 6-metil eter ve 6-hidroksiluteolin 6,3'-dimetil eter, *Anthemis monantha*'da quercetağetin 3,6,3'-trimetil eter, quercetağetin 3,6,3',4'-tetrametil eter, scutellarein 6,4'-dimetil eter ve 6-hidroksiluteolin 6,7,4'-trimetileter'in varlığı belirlenmiştir (Williams ve ark., 2001).

Flavon glikozitlerin ve vacuolar flavonoidlerin incelenmesinde; *Anthemis chia*'da apigenin 7-glukozid, apigenin 7-glucuronid, luteolin 7-glukozid, apigenin 7-di glucuronid, quercetağetin 7-glukozid, patuletin 7-glukozid, *Anthemis cretica*'da apigenin 7-glukozit, apigenin 7-glucuronid ve luteolin 7-glukozit, *Anthemis dumetorum*'da apigenin 7-glucuronid, *Anthemis monantha*'da rutin, quercetağetin 7-glukozid, patuletin 7-glukozid belirlenmiştir (Williams ve ark., 2001).

Anthemis melampodina bitkisinin taze yapraklarından hidrodestilasyon ile uçucu fraksiyonlar elde edilmiş ve GC/MS tekniği ile analiz edilmiştir. *Anthemis melampodina*'nın uçucu yağ fraksiyonundan 38 bileşik tanımlanmiştir. Santolinatriene % 27 ile en yoğun bileşiktir. Yağ; % 49.94 monoterpen hidrokarbon, %7.41 sesquiterpen hidrokarbon ve %11.43 oksitlenmiş sesquiterpen içeriği ile tanımlanmiştir (Grace, 2002).

Anthemis carpatica bitkisinden sesquiterpen laktonlar tanımlandı. Yeni bir germakranolid; (E)-1 alfa-10 beta-epoksi -3 beta-asetoksi -6 alfa -hidroksigermakra-4-11(13)-dien-12,8 alfa-olid, ve bu türde ilk kez 2 beta-hidroksiepiligustrin ve cumambrin B bulundu (Vajs ve ark., 2000).

Anthemis aetnensis bitkisinde guaianolidler ve terpenler incelenmiştir. Guaianolides hydruntinolide A ve guaianolides hydruntinolide B ve ayrıca 2 yeni germakradienolid; 1-beta-hidroksiarbuskulin ve ether-7-asetoksipektanon tanımlanmıştır (Bruno ve ark., 1997).

2002 yılında yapılan bir çalışmada *Anthemideae* familyası üyelerinden *Artemisia tridentata*, *Artemisia cana* incelenmiş ve 26 monoterpen tanımlanmıştır. Bunların yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Bunlardan 20 tanesi *Anthemideae* familyasında daha önceden tanımlanan bileşikler olup, 4 tanesi daha önceden bilinen fakat bu familyada tanımlanmamış bileşiklerdir; 2,2-dimetil-6-isopropenil-2-H-piran, 2,3-dimetil-6-isopropil-4-H-piran ve 2-isopropenil-5-metilhekzatrans-3,5-dien-1-ol ve 2,2-dimetil-6-isopropenil-2H-piran her iki bitkide izole edilmiştir. Diğer iki monoterpen ise *Artemisia tridentata* bitkisinden chrysanthemal ve *Artemisia cana* bitkisinden izole edilen lavandulol'dur. Bu bileşik *Anthemideae* familyasında ilk kez tanımlanmıştır (Gunawerdana ve ark., 2002).

2.1.3. *Anthemis* Türlerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Yapılan literatür taraması sonucunda *Anthemis tinctoria* bitkisinin antibakteriyel aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat bu bitki ile ilgili 3 adet yapı aydınlatma çalışması bulunmuştur. Ayrıca familyanın diğer türleri ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur (Holla ve ark., 2000; Wollenwaber ve Mayer,1991; Williams ve ark., 2000).

2000 yılında yapılan bir çalışmada, *Anthemis cotula* bitkisinin çiçeklerinden elde edilen toplam metanol ekstresi konsantrasyonu 200 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış ve gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı agar-well difüzyon metodu ile test edilmiştir. Ayrıca metanol ekstresinden quercetagenin, quercetagenin 7-glikozit, quercetin, quercetin 7-glikozit, patuletin, patuletin 7-glikozit, kaemferol, kaemferol 7-glikozit, kaemferol 3-rutinosit tanımlanmıştır. Aktivite testi sonuçları

kloramfenikol ile karşılaştırılmıştır ve en fazla etkiyi *E.coli*'ye karşı gösterdiği çizelge 2.1'de görülmektedir (Quarengi ve ark., 2000).

Çizelge 2.1. Anthemis cotula'nın metanol ekstresinin antibakteriyel aktivitesi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon Zonları (mm)	
	Anthemis cotula (200µg/ml)	Kloramfenikol (100µg/ml)
S.aureus (ATCC6538)	7,5	9,1
S.epidermidis (43 IMV)	8,0	7,5
M.luteus (23 IMV)	6,0	8,2
S.pneumoniae	-	9,3
E.coli (ATCC 25922)	9,0	9,2
P.aeruginosa (ATCC 27853)	6,0	10,2
P.vulgaris (21 IMV)	7,0	11,4
Salmonella	-	12,3

2.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adı altında özellikle koagülaz olumlu, mannitolü aerop ve anaerop şartlarda asit oluşturarak parçalayan, alfatoksin yapan, novobiocin'e duyarlı, insan ve sıcak kanlı hayvanlarda geniş çapta piyojen toksik ve besin zehirlenmesi niteliğindeki enfeksiyonlara etken olan stafilokoklar toplanır. Doğada oldukça yaygın olarak toz, toprak, eşya, insan ve hayvan deri mukozası ve ağız floralarında bulunan *Staphylococcus aureus* bakterilerinin günümüz için en önemli özelliği kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin bir çoğuna hızla dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlara daha sık rastlanmasıdır (Akçelik ve ark., 2000).

Stafilokoklar yaklaşık olarak 1µm çapında ve yuvarlağa yakın bir şekildedirler. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirinden ayrılmazlar ve üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar.

Stafilokoklar çeşitli bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram (+)'dirler. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdürler. Bazı kökenlerinde belirgin bir kapsül

yada mukus katmanı olur. Hücre çeperleri özel yapıda olup peptidoglikan, teikoik asit ve türe özgü persipitinojen protein birimlerini içerir (Bilgehan, 2002).

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerlerinde ürerlerse de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalırlar. Fakültatif anaeropturlar. Oksijenli ortamda üremeyi tercih ederlerse de az miktarda oksijenle hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler. Optimal olarak 37 °C'de ve pH 7,4'te ürerler. Jeloz besiyerinde bolca ürer ve 1.2 mm çapında koloniler yaparlar. Uygun ortam bulurlarsa koloniler 6-8 mm çapına ulaşabilir. Buyyonda başlangıçta bir bulanıklık meydana getirerek ürerler. Sonra besiyeri durulur ve dipte ince bir çökelti oluşur (Bilgehan, 2002).

Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 °C'de 30 dakika bekletilmekle öldükleri halde stafilokoklar bir saat sonra bile canlılıklarını muhafaza edebilirler.

2.2.2. *Enterococcus faecalis*

1984 yılı öncesinde, *Streptococcus* cinsi içinde yer alan bu cins daha sonra yapılan çalışmalarla *Enterococcus* cinsi adı altında toplanmıştır. Enterokoklar gram pozitif, birkaç istisna dışında hareketsiz, aerobik veya fakültatif anaerob, oval kok formunda, genellikle diplokok veya kısa zincir görünümündedirler. Gram negatif bakterilere kıyasla, beslenme gereksinimleri daha seçicidir (Akçelik ve ark., 2000).

Endokardit, idrar yolları enfeksiyonları, intra abdominal abseler, yara ve dekübitus enfeksiyonları, nadiren menenjit, hastane kaynaklı pnömoni, septisemi yapabilirler. Süt ürünlerinde ve diğer gıdalarda da yüksek oranlarda bulunabilen bu bakterilerin, bakteriyosin üretimi, probiyotik karakteri, süt endüstrisinde kullanılabilirlikleri gibi önemli biyoteknolojik özellikleri olduğu halde, onların gıda kaynaklı patojenler olarak görülüp görülmeyeceği üzerine fikir birliği yoktur. Ancak son yayınlar *E. faecalis*'in ve diğer laktik asit bakterilerinden bazı türlerin klinik enfeksiyonlara katıldıkları belirtilmektedir (Bilgehan, 2002).

Kanlı jelozda enterokok kolonileri; büyükçe, gri, parlak, buğulu görünümündedirler. Sıvı besiyerinde yapılan kültürlerde dipteki çöküntü üzerinde ince gri bir tabaka oluşturarak ve genellikle besiyerinde bulanıklık yapmaksızın ürerler.

2.2.3. *Escherichia coli*

Enterobacter familyası içerisinde yer alan bu tür, hafif hareketli, genelde hareketsiz, gram (-), çomakçıklar biçimindeki bakterilerdir. Endospor oluşturmazlar, değişebilen anaeropturlar. Bu familya, insan ve hayvan gastrointestinal sisteminin normal florasında bulunan yada dışarıdan vücuda girerek hastalık yapan bakterileri içerir (Gürgün ve Halkman., 1990).

Escherichia coli yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1.0-1.5 µm eninde, düz uçları yuvarlak bakterilerdir. Genelde etraflarında bulunan kirpikleri ile yavaşta olsa hareketlidirler.

E.coli buyyon ve agar besiyerinde kolayca ürer. Değişebilen anaerob olup, optimal üreme sıcaklığı 37 °C'dir. 15-45 °C'lerde de üreyebilirler. Özellikle 44 °C'de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden ayırtedici bir özelliktir. Ortalama pH 7.2'de ürerler. Bunyonda homojen bulanıklık yaparlar (Gürgün ve Halkman., 1990).

E.coli oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C'de 30 dakika, oda ısısında uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilirler. Soğuğa dirençlidir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir.

İnsanlarda *E.coli*'nin yaptığı hastalıklar intestinal(bağırsak hastalıkları) ve ekstraintestinal (bağırsak dışı hastalıklar) olarak iki grupta incelenir.

2.2.4. *Pseudomonas auroginosa*

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan bu tür gram (-) aerobik çomakçıklar biçimindeki bakterilerdir.

Düz veya hafif kıvrık çubuklardır fakat heliks şeklinde değildir. 0.5-1.0 µm eninde, 1.5-5.0 µm uzunluğundadırlar. Polar flagellalar sayesinde hareketlidirler (Akçelik ve ark., 2000).

Bu bakteriler toprakta ve suda çok bol bulunurlar. Birkaç türü insan ve hayvanlar için patojendir. Bazıları et ve diğer ürünlerin bozulmasına sebep olur.

3. MATERYAL

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada *Compositae (Astereceae)* familyası üyelerinden olan *Anthemis tinctoria* bitkisi kullanılmıştır. *Anthemis tinctoria* bitkisi 2002 yılı Haziran ayında Çanakkale ve çevresinden (Eceabat) çiçeklenmiş durumda özellikle yol kenarlarından toplanmıştır. Çalışmada bitkinin çiçek kısımları kullanılmıştır.

Bitki kurutulup, değirmende toz haline getirildikten sonra kimyasal çözücüler ile ekstre edilmiştir. Bitkinin tanımlaması Yrd. Doç. Dr. İsmet UYSAL tarafından yapılmıştır ve bir örneği Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda bulunmaktadır (Herbaryum No: 00373).

3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan bakteriler İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden temin edilmiştir.

- 1- *S. aureus* (ATCC 25923)
- 2- *E. coli* (ATCC 25922)
- 3- *P. aeruginosa* (ATCC 27853)
- 4- *E. faecalis* (ATCC 29212)

3.1.3. Besiyerleri

1- Müeller-Hinton Agar, katı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanıldı. Merck firmasından temin edildi.

2- Müeller-Hinton Broth, sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında kullanıldı. Merck firmasından temin edildi.

3.1.4. Kimyasal Maddeler

Metanol, diklormetan, etilasetat, n-hekzan ve n-bütanol; ekstraksiyon ve fraksiyonlandırma işlemlerinde kullanıldı. Merck firmasından temin edildi.

Etanol, aseton, dietileter kalitatif analiz işleminde kullanıldı. Riedel-de Haen firmasından temin edildi.

Amonyak, NaOH, KOH, HCl, H₂SO₄, kloroform, metalik magnezyum, bakır sülfat, sodyum potasyum tartarat, sodyum sülfat, demir (II) klorür, civa (I) klorür, potasyum iyodür kalitatif analiz işleminde kullanıldı. Merck firmasından temin edildi.

3.1.5. Gereçler

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

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

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

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

Bitkinin öğütülmesi işlemi için Thomas Willey 4 markalı değirmen kullanıldı. İl Tarım Müdürlüğü Laboratuvarı, Çanakkale

Deney düzenekleri ve cam malzemeler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çanakkale

3.2. Metot

3.2.1. Ekstrelerin Elde Edilmesi

20 g bitki soxhlet cihazına yerleştirildikten sonra çözücü ile tüketildi. İlk olarak metanol ile ekstraksiyon yapıldı ve bu işlemde ortalama 3,3 g ekstre elde edildi. Metanol ekstresi daha sonra sırasıyla hekzan, diklormetan, etilasetat ve bütanol ile fraksiyonlandırıldı ve sırasıyla ortalama 36 mg, 42 mg, 207 mg ve 305 mg ekstre elde edildi. Yapılan aktivite testinde hekzan ve diklormetan fraksiyonlarının en fazla etkiyi gösterdiği belirlenmiş ve bitki önce hekzan ardından diklormetan ile ardı ardına ekstre

edildi. Ekstraksiyon sonucu ortalama 0,36 g hekzan, 0,18 g diklormetan ekstresi elde edilmiştir. Ayrıca maserasyon yöntemi ile de ortalama 2,3 g ekstre elde edildi. Ekstraksiyon işlemi 3 kez tekrar edilmiş olup değerler bu tartımların ortalamasıdır.

Elde edilen ekstratlar, konsantrasyonları 1mg/25µl ve 5mg/25µl olacak şekilde hazırlanıp steril disklerle emdirildi ve *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* şuşlarına karşı aktiflik testleri yapıldı.

3.2.2. Besiyeri ve Bakterilerin Hazırlanması

3.2.2.1. Besiyerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada bakterilerinin gelişmesi için genel amaçlı besiyerleri olan Müeller-Hinton Agar ve Müeller-Hinton Broth kullanıldı. Besiyerleri hazırlandıktan sonra 121 °C'de 1,5 atm'de sterilize edildi. Müeller-Hinton Agar'dan üretici firma tavsiyesi doğrultusunda 10,5 g alınıp 500 ml saf su içinde su banyosunda ısıtmak suretiyle çözülerek, Müeller-Hinton Broth 17 g alınıp 500 ml saf su içinde çözülerek hazırlandı. Agar besiyeri 90 mm'lik petri kaplarına, her birine 25 ml gelecek şekilde dökülüp oda sıcaklığında katılaştıktan sonra +4 °C'de kullanılacağı zamana kadar saklandı.

3.2.2.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

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

Çalışma sırasında sıcaklığı oda sıcaklığına getirilmiş bakteri kültürlerinden petri lenmiş agara pasajlanıp, 37 °C'de gecelik inkübasyona bırakıldı. Böylece taze bakteri kültürleri hazırlanmış oldu.

Her petri kabına aynı sayıda bakteri ekimi yapılabilmesi için McF (Mc Farland) standardı kullanıldı.

3.2.2.3. Bakterilerin Mc Farland Bulanıklık Standardına Ayarlanması

Baryum klorür ile sülfürik asit karıştırılınca meydana gelen baryum sülfat ortamda opak renkli bir bulanıklık oluşturmaktadır. Çok kompleks yapıda olmayan bir besiyerinde üretilen bakterilerde belli sayıya ulaştıklarında aynı renkte bir bulanıklık

meydana getirmektedirler. BaCl₂ ile H₂SO₄ oranlarının değiştirilmesiyle farklı bulanıklıkta çözeltiler oluşmakta olup, bunlara karşılık gelen bakteri sayısı da bulanıklığın artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

0,5 Mc Farland standardı %1'lik BaCl₂'den 0,5 ml ve % 1'lik H₂SO₄'den 9,5 ml alınarak hazırlandı. Bu standart yaklaşık 10⁸ mikroorganizma/ml konsantrasyona eşittir.

Antibakteriyel çalışmada kullanılacak olan bakteri süspansiyonlarını hazırlamak için ilk olarak bakteriler 3-4 koloni katı besiyerinden sıvı besiyerine pasajlandı. 37 °C'de 3-4 saat inkübasyondan sonra besiyerinin bulanıklığı Mc Farland tüpü ile karşılaştırıldı. Bakterilerin bulanıklığı standart tüpten daha açık ise inkübasyona bir süre daha devam edildi. Bakterilerin bulanıklığının fazla olduğu durumlarda ise ortama % 0,9'luk NaCl çözeltisi ilave edilerek bulanıklık ayarlandı.

Bu işlem her bir bakteri için tekrar edildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 20 µl alınarak petri kaplarına ekim yapıldı.

3.2.3. Antibakteriyel Aktivitelerin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

3.2.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi antibakteriyel aktivitenin araştırılmasında yararlanılan en yaygın yöntemlerden biridir.

Bu yöntem, standardize edilmiş besiyerlerinin yüzeylerine belli yoğunluktaki süspansiyonların ekilmeleri, sonra besiyerlerinin belirli noktalarına çeşitli yöntemlerle bırakılan etken madde (ekstre) emdirilmiş, disk etrafında üremenin önlendiği zonların çaplarının ölçülmesidir.

3.2.3.1.1. Disk Difüzyon Yönteminde Kullanılan Disklerin Hazırlanması

Bu çalışmada 6 mm çapında boş steril diskler kullanıldı. Konsantrasyonları 1mg/25µl ve 5mg/25µl olacak şekilde hazırlanan ekstreler mikropipet yardımıyla steril disklerle emdirildi.

3.2.3.1.2. Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakteriyel Aktivitenin Araştırılması

0,5 Mc Farland standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonları agar besiyeri bulunan petrilere ekildi.

Ekim steril pamuklu silgiçler ile yapıldı. Pamuklu silgiç, bakteri kültürüne batırıldıktan sonra, sıvının fazlası silgicin tüp yüzeyine bastırılması ile akıtıldı ve plak yüzeyine sürülerek tüm yüzeye ekim yapıldı. Bakteri ekimi yapıldıktan sonra hazırlanan diskler besiyerinin yüzeyine yerleştirildi. Oda sıcaklığında yarım saat bekledikten sonra 37 °C'deki inkübatöre yerleştirildi. Gecelik inkübasyondan sonra oluşan zonların çapları mm olarak ölçüldü.

Bu çalışma her bir ekstre için 3 kere tekrarlanıp, belirtilen değerler bu ölçümlerin ortalamalarıdır.

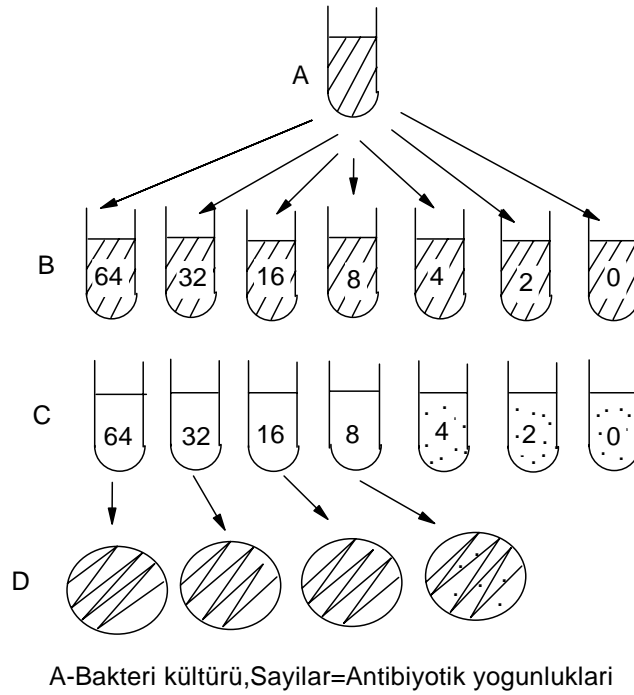
3.2.3.2. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) ve MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi

MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) ve MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu) değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemde 0,5 Mc Farland standardına ayarlanan bakteri süspansiyonları kullanıldı. Besiyeri olarak Müeller-Hinton Broth ve 20-200 µl sıvı çekme kapasiteli mikropipet kullanıldı.

Bu işlem için 8 adet steril deney tüpü hazırlandı. İlk tüpe konsantrasyonu 20mg/100µl olacak şekilde hazırlanan ekstre konuldu. Üzerine 900 µl besiyeri eklenerek hacim toplam 1000 µl'ye tamamlandı. Diğer tüplere ise 500 µl besiyeri konuldu. 1. tüpten 500 µl çekilip, 2. tüpe konuldu. 2. tüpten 500 µl çekilip, 3. tüpe konulmak üzere bu işlem bütün tüpler için uygulandı. Son tüpe ise besiyeri konulmadı, 7. tüpten dışarı atıldı. Daha sonra bütün tüplere 500 µl bakteri süspansiyonu eklendi. Bu işlem agar difüzyon testine göre etkin olduğu gözlenen ekstrele uygulandı.

Üremenin olup olmadığı tüplerdeki bulanıklığa bakarak anlaşılır. Baştaki tüplerde antimikrobikler yoğun olduğundan üreme görülmez. Üremenin önlenmiş olduğu son tüp, o mikrobiğin o mikroorganizma üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC)'dur. MIC saptanan tüpteki antimikrobiğin mg/ml'si bulunarak yazılır (Bilgehan, 2002).

Minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBC) saptanması için ise üreme göstermeyen tüplerden 10µl alınıp katı besiyerlerine pamuklu silgiçlerle yayıldı. Gecelik inkübasyondan sonra petri ler incelendi. Katı besiyerine ekimlerde üreme göstermeyen konsantrasyonlar belirlendi. Bu şekilde sonuç veren son tüpteki konsantrasyon, antimikrobiğin bakterisidal konsantrasyonudur. MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi için yapılan işlemler şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. MIC ve MBC saptanması. MIC=8µg/ml, MBC=16µg/ml

3.2.4. Bitkinin Kalitatif Analizi

Bitkide bulunan temel kimyasal bileşiklerin belirlenmesi amacıyla kalitatif analiz yapılmıştır. Bunun için bitki önce dietileter, daha sonra metanol ve en son su ile ekstre edilmiştir ve aşağıda açıklanan yol izlenmiştir.

3.2.4.1. Eter Ekstresinin İncelenmesi

20 g bitki soxhlet cihazında dietileter ile ekstre edildi. Eter ekstresi süzülükten sonra 50 mL'ye konsantre edildi. Elde edilen ekstre 20 mL ve 30 mL olmak üzere 2 kısma ayrılır. 20 mL'lik kısımdan uçucu yağlar, sterol ve triterpenler,

karotenoidler ve yağ asitleri, 30 mL'lik kısımdan ise alkaloidler, flavon aglikonlar, emodoller ve kumarinler tanımlanır. İzlenen yol Şekil 3.2'de özetlenmiştir (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.1. Uçucu Yağlar ve Yağlı Madde Bileşenlerin Tanımlanması

Eter ekstresinin 20 mL'lik kısmı alındı ve çözücü evaporatörde uçuruldu. Kalıntı güzel bir kokuya sahip ise az bir miktar alkolde çözülür. Çözelti ikiye ayrılır. Birincisi alınarak çözücü uçurulur. Kalıntı karakteristik hoş bir kokuya sahip ise uçucu yağları içerdiği söylenebilir.

Yağlı madde bileşenlerin tanımlanması için yukarıdaki alkolik çözeltinin 2. kısmı alınır ve çözücü uzaklaştırılır. Kalıntı üzerine, 0,5N 10 mL KOH çözeltisi (alkolde hazırlanan) eklenir ve 1-2 saat sıvı yüzeyinde yağ damlaları görünmeyinceye kadar su banyosunda reflüks edilir. Alkol destillenir ve kalıntı 15-20 mL sıcak suda çözülür. Ayırma hunisinde eter ile 2-3 defa çekme işlemi yapılır. Eter ekstresi toplanır ve bu ekstreden steroller, triterpenler, karotenoidler tanımlanır. Alkali sulu çözeltiden ise yüksek yağ asitleri tanımlanır (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.2. Sterol ve Triterpenlerin Tanımlanması

Sterol ve triterpenlerin tanımlanması için Liebermann- Burchard reaksiyonundan yararlanıldı. Bu yöntemle göre, alınan 10 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalıntı 0,5 mL asetikanhidrit'de çözüldü ve 0,5 mL kloroform eklendi. Çözelti kuru bir tübe alınarak, bir pipet yardımıyla 2 mL sülfürik asit tübün dibine eklendi. İki sıvı tabakasının kontak bölgesindeki kahverengi-kırmızı veya menekşe renkli halka oluşumu sterol ve triterpenlerin varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.3. Karotenoidlerin Tanımlanması

Karotenoidlerin tanımlanması için Carr Price reaksiyonu kullanıldı. 10 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalıntı üzerine antimon triklorit'in kloroformdaki doymuş çözeltisinden 2-3 damla eklendi. İlk olarak mavi ve sonra kırmızıya dönen pigmentlerin oluşumu karotenoidlerin varlığını göstermektedir.

Carr Price reaktifi, 25 g antimon triklorit'in 75 g kloroform veya karbontetra klorürde çözülmesiyle hazırlanır (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.4. Yüksek Yağ Asitlerinin Tanımlanması

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen alkali sulu çözelti, konsantre HCl ile asitlendirilir. Bu durumda yağ asitleri onların bazik tuzlarından kurtulduğu için çözelti matlaşır. Yağ asitleri bir ayırma hunisinde dietileter ile ekstre edilir. Eter çözeltisi evaporatörde uçurular. Kalıntı yağlı ise yağ asitlerinin varlığını gösterir

Eter ekstresinin 30 mL'lik kısmından ise alkaloidler, flavon aglikonlar, emodoller, kumarinler tanımlanır (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.5. Alkaloidlerin Tanımlanması

Bunun için 10 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalıntı % 2'lik 1,5 mL HCl'de çözüldü. 0,5 mL asidik sulu çözeltiye 2-3 damla Bertrand reaktifi veya 2-3 damla Mayer reaktifinin ilavesiyle oluşan matlık yada beyaz-sarı çökelek alkaloidlerin varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

Mayer reaktifi, 36 g HgCl₂ ve 25 g KI'nin 100 mL suda çözülmesiyle hazırlanmaktadır.

Bertrand reaktifi, 5 g silikotungstik asidin 80 mL suda çözülmesi ve %10'luk 0,1 mL HCl asidin eklenerek 100 mL'ye seyreltilmesiyle hazırlanır.

3.2.4.1.6. Flavon aglikonların Tanımlanması

Flavon aglikonların tanımlanması için 3 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalıntı sıcakta % 50'lik 2 mL metanol'de çözüldü. Metalik magnezyum ve 4-5 damla konsantre HCl eklendi. Kırmızı yada turuncu çökelti flavon aglikonların varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

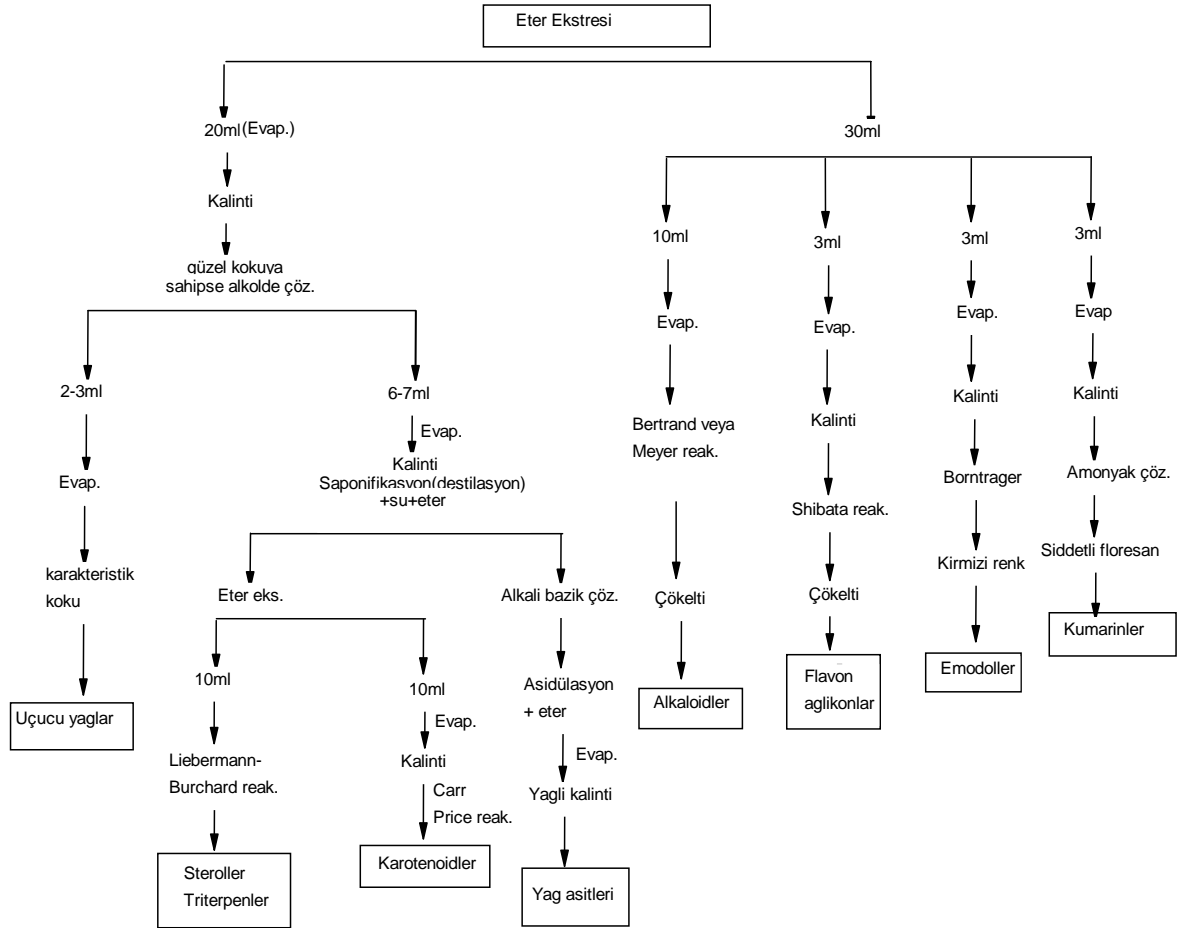
3.2.4.1.7. Emodollerin Tanımlanması

Emodollerin tanımlanması için Bortrager reaksiyonu kullanıldı. 3 mL eter ekstresi bir test tüpüne alınır ve 1 mL % 25'lik amonyak çözeltisi yada %10'luk NaOH

çözeltisi ilave edilir ve çalkalanır. Kırmızı renk oluşumu emodollerin varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

3.2.4.1.8. Kumarinlerin Tanımlanması

Bunun için 3 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı. Kalıntı sıcak suda çözüldü. Soğuduktan sonra çözelti 2 tüpe ayrılır. Birinci tüp referans olarak kullanılır. 2. tüpe % 10'luk 0,5 mL NH₃ çözeltisi eklenir. Kumarin ve türevlerinin varlığı UV ışığı altında şiddetli floresan vermektedir (Ciulei, 1982).



Şekil 3.2. Eter ekstresinin incelenmesinde izlenen yol (Çubukçu, 1992).

3.2.4.2. Alkol Ekstresinin İncelenmesi

Dietileter ile ekstraksiyondan sonra kurutulan bitki etilalkol veya metanol ile 2-3 kez 20-40 dakika ekstre edilir. Süzölen ekstre 50 mL'ye konsantre edilerek alkol ekstresi hazırlanır. Alkol ekstresinden; tanenler, indirgeyici bileşikler, alkaloid tuzları, polifenolik glikozitler, sterol glikozitler, triterpen glikozitler tanımlanabilir. İzlenen yol Şekil 3.3'te özetlenmiştir (Ciulei, 1982).

3.2.4.2.1. Tanenlerin Tanımlanması

0,5-1 mL alkol ekstresine demir (II) klorürün sudaki çözeltisinden 2-3 damla eklenir. Siyah-mavi renk oluşumu gallik tanenlerin, yeşil-mavi renk oluşumu kateşol tanenlerin varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

3.2.4.2.2. İndirgeyici Bileşiklerin Tanımlanması

İndirgeyici bileşiklerin tanımlanması için 1 mL alkol ekstresine, 2 mL su ve 1 mL Fehling (I+II) çözeltileri eklenir ve ısıtılır. Tuğla kırmızısı renk oluşumu indirgeyici bileşiklerin varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

Fehling I reaktifi, 35 g bakır sülfatın bir miktar suda çözüldükten sonra 5 mL der. H₂SO₄ ilavesi ve su ile 100 mL'ye tamamlayarak hazırlanır.

Fehling II reaktifi, 150 g sodyum potasyum tartarat ve 150 g sodyum hidroksidin bir miktar suda çözölüp 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.

3.2.4.2.3. Alkaloid Tuzlarının Tanımlanması

Bunun için 20 mL alkol ekstresi bir kapsüle konur ve su banyosunda çözücü uzaklaştırılır. Kalıntı üzerine 10 mL %10'luk HCl, 10 mL %10'luk NH₄OH ve apolar bir çözücü ile ekstre edilir. Ekstrenin çözücüsü uçurulur. Kalıntı 1,5 mL %2'lik HCl içinde çözölür. Asidik çözelti 3 deney tübüne ayrılır. Bir tüp referans olarak kullanılır, diğeri iki tüpe Mayer veya Bertrand reaktifi eklenir. Bir matlaşma veya beyaz-sarı çökelti alkaloid tuzlarının varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

3.2.4.2.4. Hidrolize Alkol Ekstresinin İncelenmesi

25 mL alkol ekstresine 15 mL %10'luk HCl eklenir ve 30 dakika refluks edilir. Hidroliz sırasında glikozitlerin parçalanmasından dolayı aglikonlar oluştuğundan çözelti matlaşır.

Çözelti soğuduktan sonra 10-12 mL dietileter ile 3 kez ayırma hunisinde çekilir. Eter ekstreleri bir yerde toplanır ve susuz Na₂SO₄ ile suyundan kurtarılır. Eter ekstresinde emodoller, kumarinler, glikozitler aranır (Ciulei, 1982).

- Emodollerin Tanımlanması

4 mL eter ekstresi 2 mL'ye konsantre edilir ve üzerine 1-2 mL %25'lik NH₃ çözeltisi eklenir ve çalkalanır. Emodollerin varlığında kırmızı renk oluşur(Ciulei, 1982).

- Kumarin Türevlerinin Tanımlanması

5 mL eter ekstresi alınır ve çözücüsü uçurulur. Kalıntı 1-2 mL suda ısıtarak çözülür. Sulu çözelti 2 tübe ayrılır.

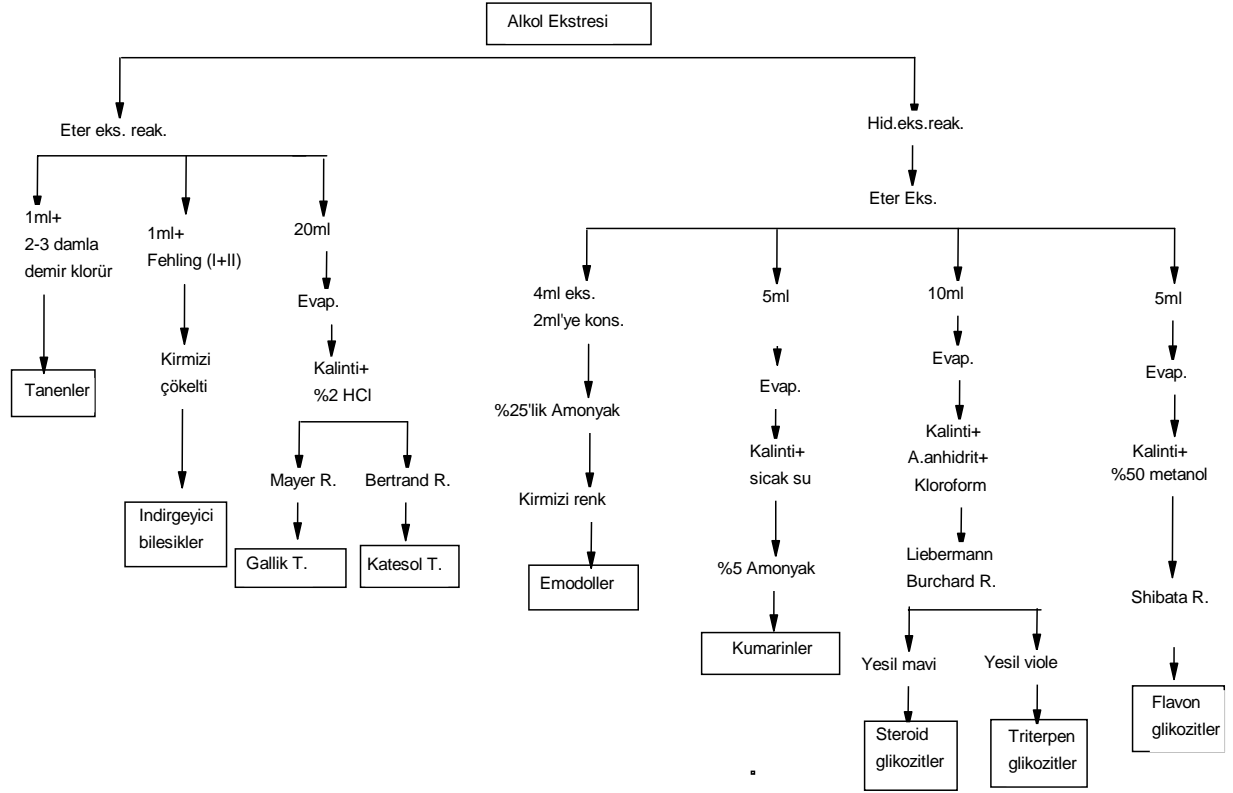
Tüpün birine 0,5 mL %10'luk NH₃ çözeltisi eklenir, diğer tüp referans olarak kullanılır. UV ışığı altında mavi yada yeşil renk varlığı kumarinlerin varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

- Steroid glikozitlerin (kardiotonik glikozitler, saponinler) Tanımlanması

10 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uçurulur. Kalıntı 0,5 mL asetik anhidrit ve 0,5 mL kloroformda çözülür ve kuru bir test tüpüne alınır. Bir pipet ile 1-2 mL konsantre H₂SO₄ tüpün dibine eklenir. İki sıvının birleşme bölgesinde kahverengi-yeşil veya kahverengi-mor halkanın oluşumu sterol ve triterpenlerin varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

- Flavon glikozitlerin Tanımlanması

5 mL eter ekstresinin çözücüsü evaporatörde uçurulur. Kalıntı 1-2 mL %50'lik metanolde ısıtılarak çözülür ve magnezyum metali ve 5-6 damla konsantre HCl eklenir. Flavonollerin varlığında kırmızı, flavanonların varlığında turuncu renk oluşur (Ciulei, 1982).



Şekil 3.3. Alkol estresinin incelenmesinde izlenen yol (Çubukçu, 1992).

3.2.4.3. Su Ekstresinin İncelenmesi

Alkol ile ekstraksiyondan sonra kurutulan bitki 20 dakika su ile ekstre edilir. Süzüldükten sonra 50 mL'ye tamamlanır. İzlenen yöntem Şekil 3.4'te özetlenmiştir.

3.2.4.3.1. Poliüronidlerin (Pektinler, gımlar) Tanımlanması

2 mL su ekstresi bir tüpe alınır ve üzerine 10 mL alkol veya aseton eklenir. Mavi yada mor çökelti oluşumu poliüronitlerin varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

3.2.4.3.2. Glusitlerin (Ozlar ve Poliozlar) Tanımlanması

2 mL sulu ekstrenin kuruluğa kadar çözücüsü uçurulur. 2-3 damla konsantre sülfürik asit eklenir ve 3-5 dakika beklenir. Dehidrasyon ile furfural ve hidroksimetil

furfural oluşur. O zaman 3-4 damla Molisch reaktifi eklenir. Kırmızı renk oluşumu glusitlerin varlığını gösterir (Ciulei, 1982).

3.2.4.3.3. Saponinlerin Tanımlanması

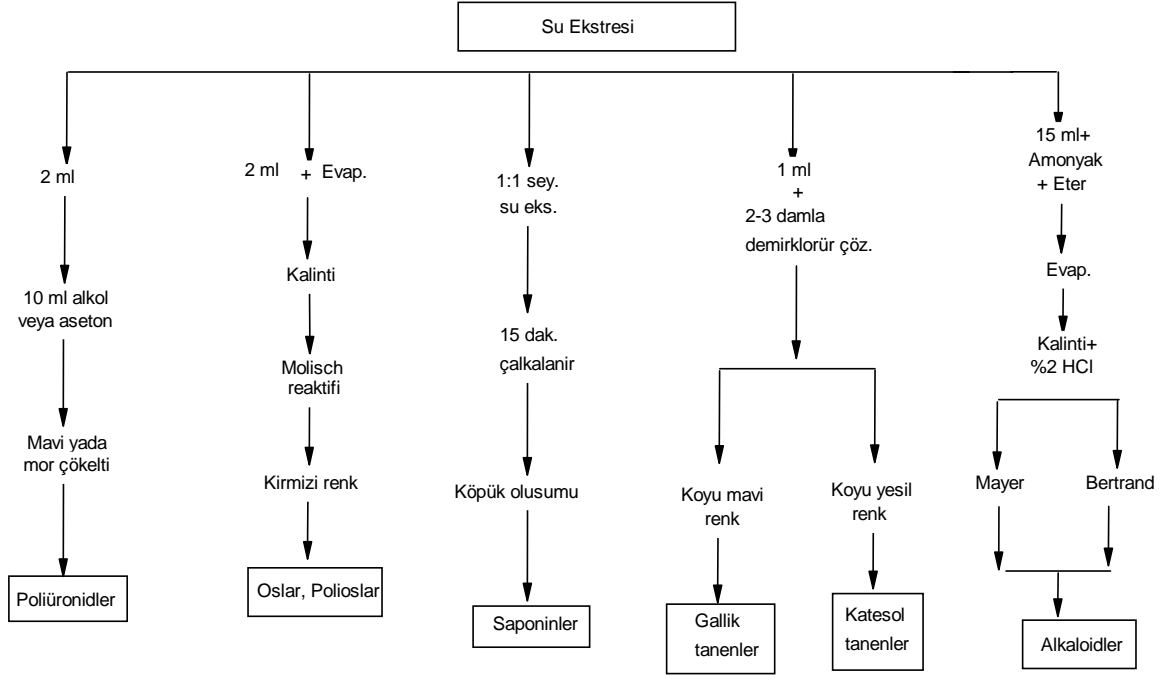
1:1 oranında seyreltilen su ekstresi bir test tüpüne konulur ve 15 dakika çalkalanır. Köpük oluşumunun gözlenmesi saponinlerin varlığını göstermektedir (Ciulei, 1982).

3.2.4.3.4. Tanenlerin Tanımlanması

1 mL su ekstresine demir (II) klorürün sudaki çözeltisinden 2-3 damla eklenir. Siyah-mavi renk oluşumu gallik tanenlerin, yeşil-mavi renk oluşumu kateşol tanenlerin varlığını gösterir. Eğer ekstre tanenlerin her iki türünü de içeriyorsa hidroklorik formaldehit çözeltisi ile reflüks edilir. Bu koşullarda kateşol tanenler kırmızı çökelti halinde çökerler. Çökelti süzülerek ayrılır ve çözelti sodyum asetat ile nötralize edilir. 2-3 damla demir (II) klorür çözeltisi damlatılır, gallik tanenlerin varlığında koyu mavi renk gözlenir (Ciulei, 1982).

3.2.4.3.5. Alkaloid Tuzlarının Tanımlanması

15 mL su ekstresi %10'luk NH_3 çözeltisi ile bazikleştirilir (pH=8-9) ve bir apolar çözücü ile ekstre edilir. Ekstrenin çözücüsü uçurulur. Kalıntı 1,5 mL %2'lik HCl içinde çözülür. Asidik çözelti 3 deney tübüne ayrılır. Bir tüp referans olarak kullanılır, diğer iki tüpe Mayer veya Bertrand reaktifi eklenir. Bir matlaşma veya beyaz-sarı çökelti alkaloid tuzlarının varlığını gösterir (Ciulei, 1982).



Şekil 3.4. Su Ekstresinin incelenmesinde izlenen yöntem (Çubukçu, 1992).

4. BULGULAR

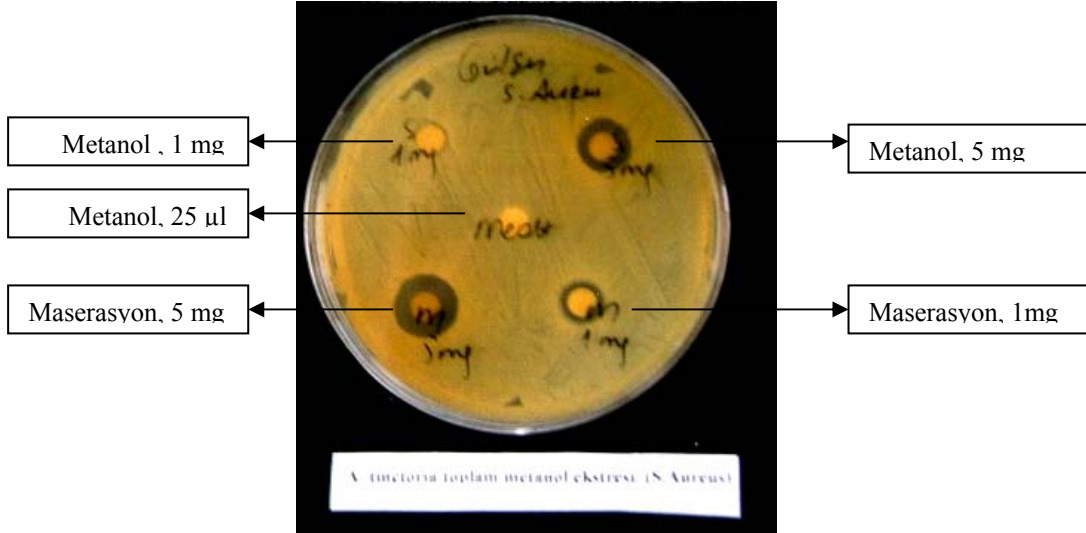
4.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

4.1.1. Toplam Metanol ve Maserasyon Ekstrelerinin Antibakteriyel Etkileri

İlk olarak konsantrasyonları 1mg/25µl ve 5mg/25µl olarak hazırlanan toplam metanol ve maserasyon ekstralarının *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine etkileri Disk Difüzyon Testi ile incelenmiştir.

Ekstreler, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde etkili olmazken sadece *S. aureus* üzerinde inhibisyon zonu oluşturdu (Şekil 4.1). Zon çapları sırasıyla metanol ekstresi için ortalama 8 mm ve 13 mm, maserasyon ekstresi için 9 mm ve 14 mm olarak ölçülmüştür.

Testler en az üç kere tekrar edilmiş ve ölçülen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Pozitif kontrol olarak Gentamisin (10µg/disk) , negatif kontrol olarak 25µl metanol emdirilmiş disk kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Toplam metanol ve maserasyon ekstralarının *S. aureus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.

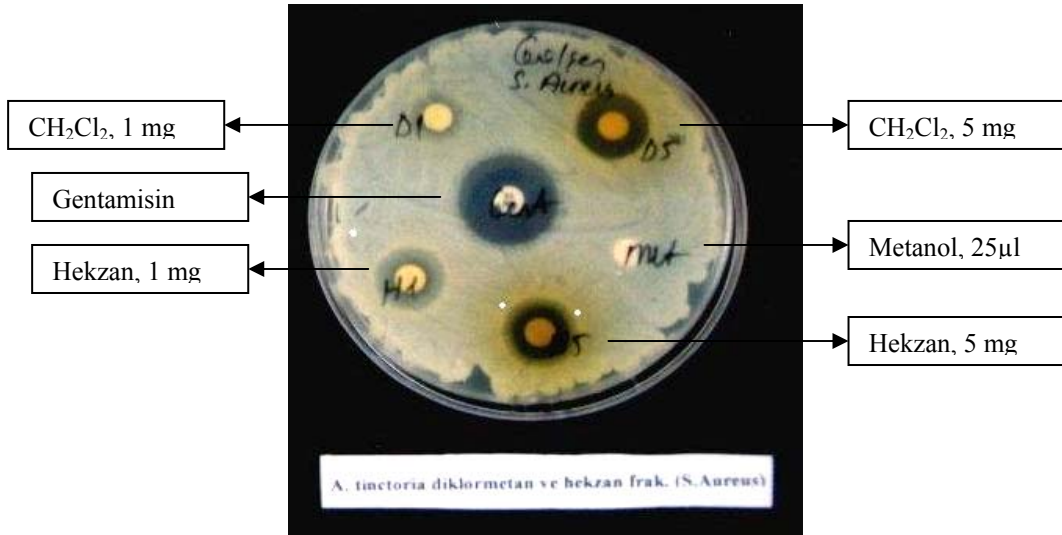
Daha sonra toplam metanol ekstresi sırasıyla hekzan, diklormetan, etilasetat ve bütanol ile fraksiyonlandırıldı ve her fraksiyonun antibakteriyel aktivitesi Disk Difüzyon Testi ile tekrar incelendi.

Ayrıca toplam metanol ekstresi için MIC ve MBC değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

4.1.2. Fraksiyonların Antibakteriyel Etkileri

Fraksiyonların konsantrasyonları 1 mg/25µl ve 5 mg/25µl olarak ayarlandı ve *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine etkileri Disk Difüzyon Testi ile incelendi.

Hekzan ekstresi, *S. aureus* bakterisi üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 14 mm (Şekil 4.2), *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde ise 5 mg/disk konsantrasyonda 12 mm zon çapı oluştururken (Şekil 4.5), *E. coli* (Şekil 4.3) ve *E. faecalis* (Şekil 4.4) bakterileri üzerinde etki göstermedi.



Şekil 4.2. Diklormetan ve hekzan ekstraktlarının *S. aureus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.



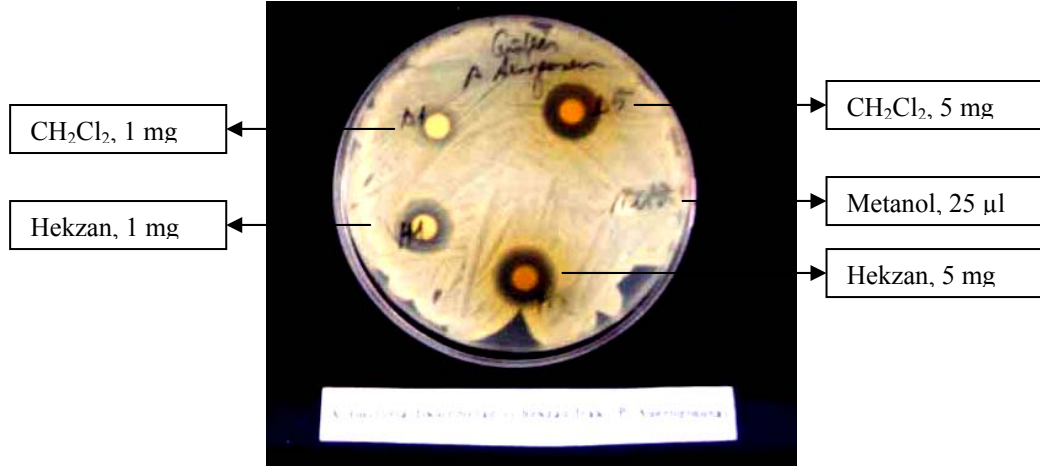
Şekil 4.3. Diklormetan ve hekzan ekstrlerinin *E. coli* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.



Şekil 4.4. Diklormetan ve hekzan ekstrlerinin *E. faecalis* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.

Diklormetan ekstresi, *S. aureus* bakterisi üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 16 mm (Şekil 4.2), *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde ise 5 mg/disk konsantrasyonda 15 mm zon çapı oluştururken (Şekil 4.5), *E. coli* (Şekil 4.3) ve *E. faecalis* (Şekil 4.4) bakterileri üzerinde etki göstermedi.

Ayrıca en etkin fraksiyon olan diklormetan için MIC ve MBC değerleri hesaplandı (Çizelge 4.4).



Şekil 4.5. Diklormetan ve hekzan ekstralarının *P. aeruginosa* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.

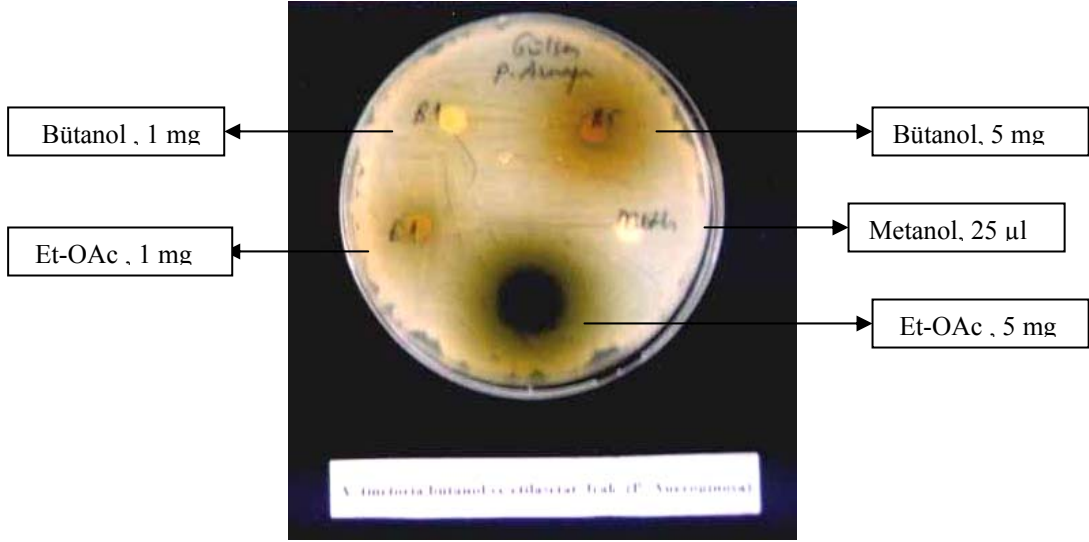
Etilasetat ekstresi, *S. aureus* bakterisi üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 11 mm (Şekil 4.6) ve *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde ise 5 mg/disk konsantrasyonda 12 mm zon çapı oluştururken (Şekil 4.9), *E. coli* (Şekil 4.7) ve *E. faecalis* (Şekil 4.8) bakterileri üzerinde etki göstermedi.



Şekil 4.6. Etilasetat ve bütanol ekstrelerinin *S. aureus* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları



Şekil 4.7. Etilasetat ve bütanol ekstrelerinin *E. coli* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.



Şekil 4.8. Etilasetat ve bütanol ekstrelerinin *E. faecalis* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.

Bütanol ekstresinin, *S. aureus* (Şekil 4.6) , *E. coli* (Şekil 4.7) , *E. faecalis* (Şekil 4.8) ve *P. aeruginosa* (Şekil 4.9) bakterileri üzerine etkisi disk difüzyon testiyle incelendi fakat bütanol ekstresi hiçbir bakteri üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadı.



Şekil 4.9. Etilasetat ve bütanol ekstralarının *P. aeruginosa* üzerindeki Disk Difüzyon Testi sonuçları.

Yapılan ölçümler sonucu, toplam metanol, hekzan, diklormetan, etilasetat ve bütanol ekstralarının disk difüzyon testiyle elde edilen inhibisyon zon çapları çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Yapılan aktivite testlerinde pozitif kontrol olarak gentamisin (10µg) diskler kullanılmıştır. Gentamisin çizelge 4.1’de gösterildiği üzere *S. aureus* üzerinde ortalama 21mm zon çapı oluşturmuştur.

Çizelge 4.1. Toplam metanol ekstresi ve fraksiyonların disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonları.

		İnhibisyon Çapları (mm)			
		S.aureus	E.coli	P.aeruginosa	E.faecalis
Toplam metanol	1 mg	8	-	-	-
	5 mg	13	-	-	-
Hekzan	1 mg	9	-	-	-
	5 mg	14	-	12	-
Diklormetan	1 mg	-	-	-	-
	5 mg	16	-	15	-
Etilasetat	1 mg	-	-	-	-
	5 mg	11	-	12	-
Bütanol	1 mg	-	-	-	-
	5 mg	-	-	-	-
Maserasyon	1 mg	9	-	-	-
	5 mg	14	-	-	-
Gentamisin	10 µg	21			
Metanol	25 µl	-	-	-	-

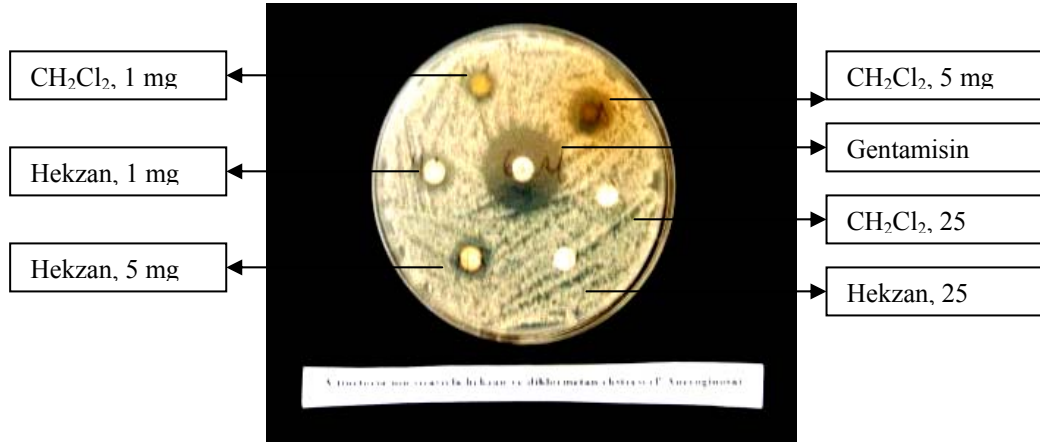
Çizelge 4.1’de özetlendiği üzere metanol ekstresinin antibakteriyel aktivitesinin hekzan ve diklormetan fraksiyonlarında yoğunlaştığı görüldü. Bunun üzerine bitki önce hekzan ardından diklormetan ile ekstre edildi ve bu ekstrelerin aktivitesi tekrar disk difüzyon testiyle incelendi.

4.1.3. Ardı ardına Yapılan Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Hekzan ve Diklormetan Ekstrelerinin Antibakteriyel Etkileri

Konsantrasyonları 1mg/25µl ve 5mg/25µl olarak hazırlanan hekzan ve diklormetan ekstrelerinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Hekzan ekstresi *S. aureus* bakterisi üzerindeki incelemede 1 mg/disk konsantrasyonda 11 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda ise 13 mm zon çapı oluşturdu (Şekil 4.11).

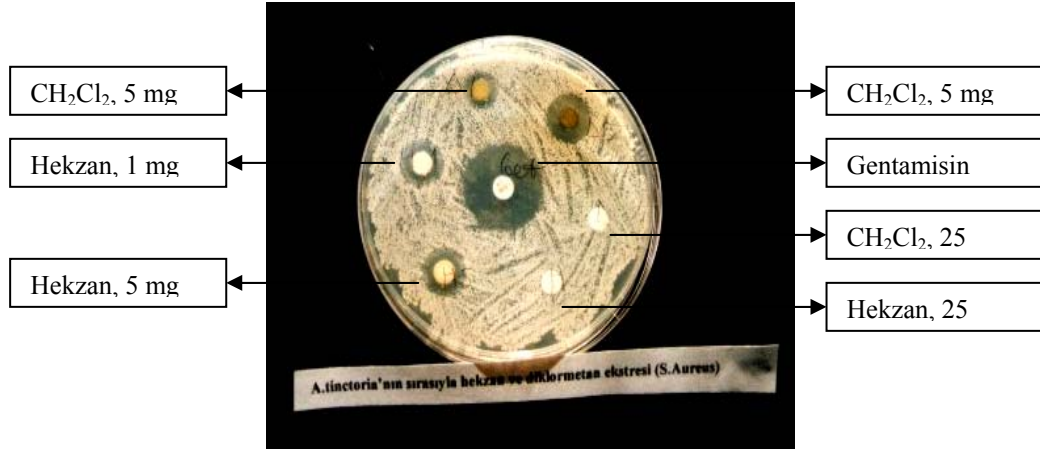
Hekzan ekstresi *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki incelemede 1 mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda 13 mm zon çapı oluşturdu (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen hekzan ve diklormetan eksrelerinin *P. aeruginosa* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.

Diklormetan ekstresi *S. aureus* bakterisi üzerindeki incelemede 1mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda ise 14 mm zon çapı oluşturdu (Şekil 4.11).

Diklormetan ekstresi *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki incelemede 1 mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda 15 mm zon çapı oluşturdu (Şekil 4.10).



Şekil 4.11. Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen hekzan ve diklormetan eksrelerinin *S. aureus* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonları.

Hekzan ve diklormetan ekstreleri için disk difüzyon yöntemi sonuçları çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Ayrıca çizelge 4.5’de diklormetan ekstresinin MIC ve MBC değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Hekzan ve diklormetan ekstrelerinin disk difüzyon testine göre elde edilen inhibisyon zonları

		İnhibisyon Çapları (mm)	
		S.aureus	P.aeruginosa
Hekzan	1mg	11	10
	5mg	13	13
Diklormetan	1mg	10	10
	5mg	14	15

Ayrıca diklormetan ekstresi için MIC ve MBC değeri hesaplanmış ve bu değerler çizelge 4.4’te gösterilmiştir. Fotoğraflar ise Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’te gösterilmiştir.

4.2. MIC ve MBC Değerlerinin Belirlenmesi

4.2.1. Toplam Metanol Ekstresinin MIC ve MBC Değerleri

Toplam metanol ekstresinin MIC ve MBC değerleri çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Toplam metanol ekstresinin MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi.

		MIC ve MBC değerleri (mg/ml)							
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
S.aureus	MIC	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
	MBC	-	-	- MBC	+	+	+	+	+

Toplam metanol ekstresi için MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri ise 2,5 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Daha sonra toplam metanol ekstresi sırasıyla hekzan, diklormetan, etilasetat ve bütanol ile fraksiyonlandırıldı ve disk difüzyon testine göre en etkin fraksiyon olduğu belirlenen diklormetan ekstresinin MIC ve MBC değerleri belirlendi.

4.2.2. Diklormetan ekstresinin MIC ve MBC Değerleri

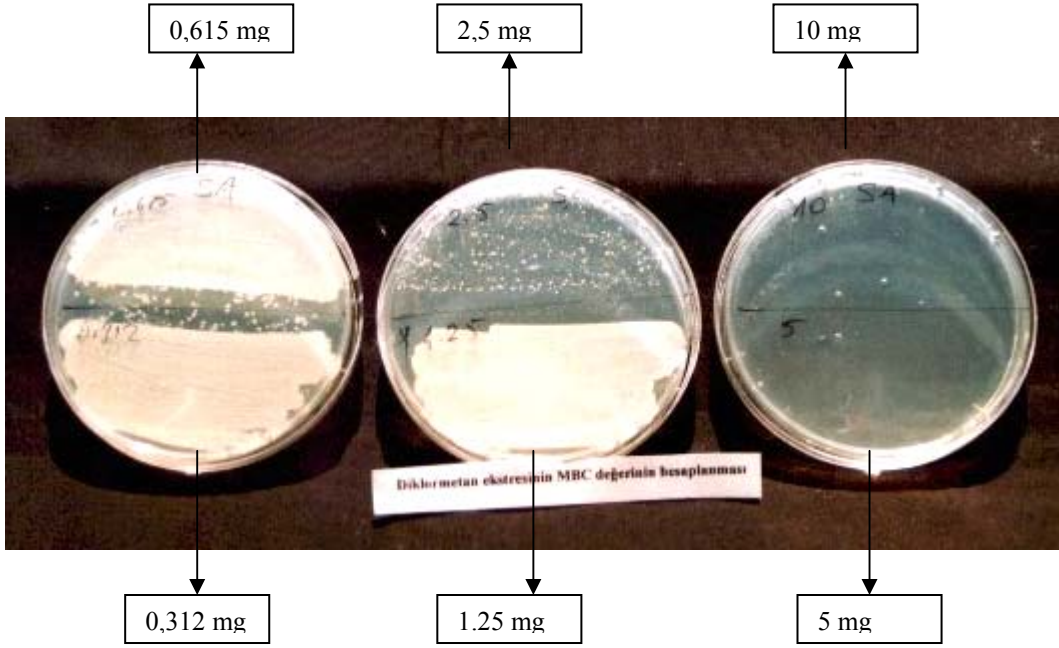
Diklormetan ekstresinin *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarına karşı MIC ve MBC değerleri belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Diklormetan ekstresinin MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesi

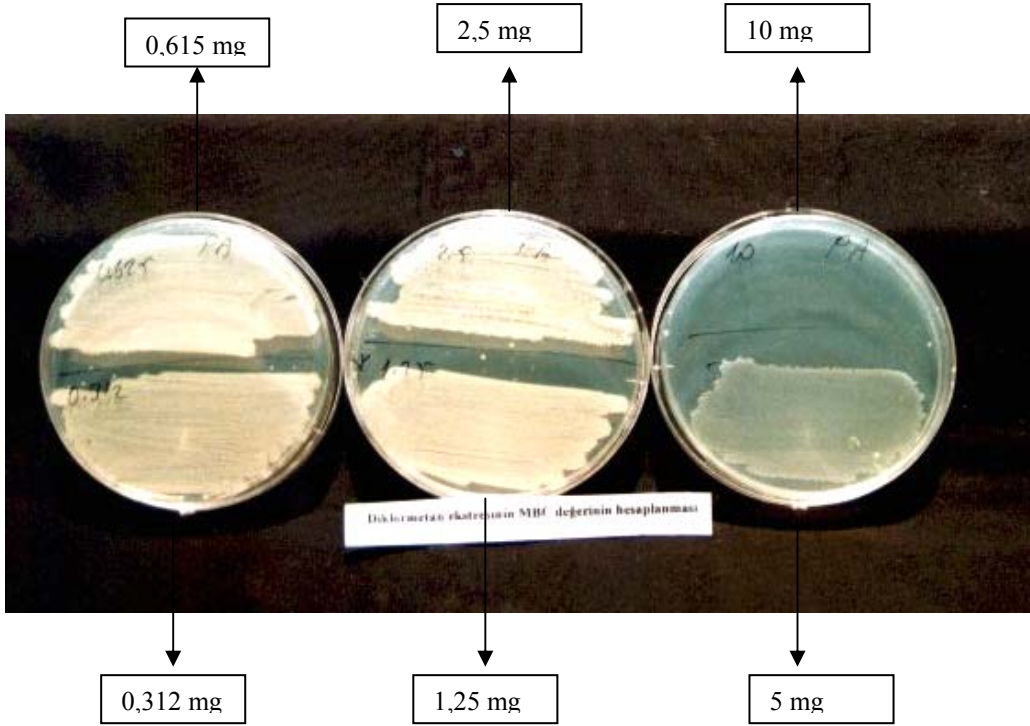
		MIC ve MBC değerleri (mg/ml)							
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078
S.aureus	MIC	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
	MBC	-	- MBC	+	+	+	+	+	+
P.aeruginosa	MIC	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
	MBC	- MBC	+	+	+	+	+	+	+

Diklormetan ekstresi için *S. aureus* üzerindeki MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri 5 mg/ml olarak hesaplanmıştır. *P. aeruginosa* için ise MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri 10 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Diklormetan ekstresinin MBC değerinin belirlenmesine ait fotoğraflar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Diklormetan ekstresinin *S. aureus* üzerindeki MBC değerinin hesaplanmasında kullanılan ekimler.



Şeşek		MIC ve MBC değerleri (mg/ml)								
		10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	
i	S.aureus	MIC	-	-	- MIC	+	+	+	+	+
		MBC	-	- MBC	+	+	+	+	+	+
a	P.aeruginosa	MIC	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
		MBC	- MBC	+	+	+	+	+	+	+

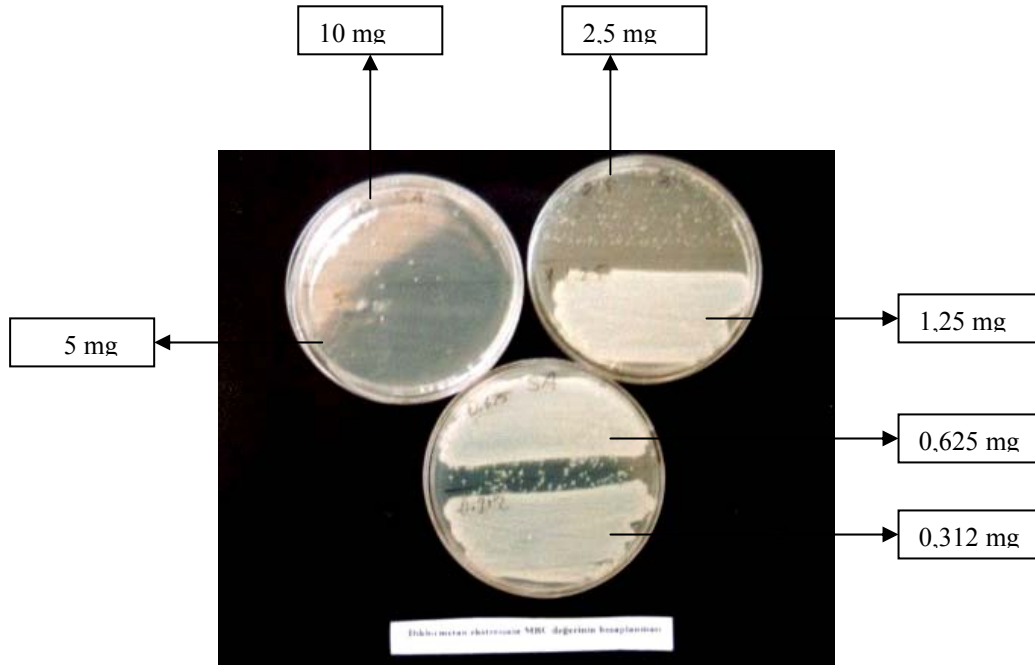
13. Diklormetan ekstresinin *P. aeruginosa* üzerindeki MBC değerinin hesaplanmasında kullanılan ekimler.

4.2.3. Ardı ardına Yapılan Ekstraksiyon Sonucu Elde Edilen Diklormetan Ekstresinin MIC ve MBC Değerleri

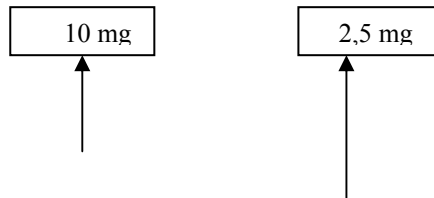
Ardı ardına yapılan ekstraksiyon sonucu elde edilen diklormetan ekstresinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı MIC ve MBC değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Ardı ardına yapılan ekstraksiyonla elde edilen diklormetan ekstresi için MIC ve MBC değerleri.

Çizelge 4.5'te belirtildiği gibi diklormetan ekstresinin *S. aureus* için MIC değeri 2,5 mg/ml, MBC değeri 5 mg/ml olarak belirlendi. *P. aeruginosa* için ise MIC değeri 5 mg/ml, MBC değeri 10 mg/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.14. Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen diklormetan eksresinin *S. aureus* üzerinde MBC değerinin belirlenmesinde kullanılan ekimler.





Şekil 4.15. Ardı ardına yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen diklorometan ekstrelerinin *P. aeruginosa* üzerinde MBC değerinin belirlenmesinde kullanılan ekimler.

4.3. *Anthemis tinctoria* Bitkisinin Kimyasal Bileşiminin Kalitatif Analizi

Bitkinin kimyasal bileşimi materyal metot bölümünde verilen testler yardımıyla incelendi ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Eter ekstresi üzerinde yapılan incelemede; uçucu yağlar, sterol ve triterpenler karetonoidler, yüksek yağ asitleri ve kumarinler için pozitif sonuç alınırken, alkaloidler, flavon aglikonlar ve emodoller için olumlu sonuç alınmadı.

Alkol ekstresi üzerinde yapılan incelemede; tanenler, indirgeyici bileşikler, steroid glikozitler için pozitif sonuç alınırken, alkaloid tuzları, emodoller, flavon glikozitler için olumlu sonuç alınmadı.

Su ekstresi üzerinde yapılan incelemede; poliüronidler, indirgeyici bileşikler, saponinler, tanenler için pozitif sonuç alındı.

Çizelge 4.6. Anthemis tinctoria bitkisinin kalitatif analiz sonuçları.

	Eter ekstresi	Alkol ekstresi	Su ekstresi
Uçucu yağlar	+		
Sterol ve triterpenler	+		
Karotenoidler	+		
Yağ asitleri	+		
Alkaloidler	-	-	-
Flavon aglikonlar	-		
Emodoller	-	-	
Kumarinler	+		
Tanenler		+	+
İndirgeyici bileşikler		+	+
Antrasen glikozitler		-	
Steroid glikozitler		+	
Flavon glikozitler		-	
Poliüronidler			+
Saponinler			+

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan literatür taraması sonucunda *Anthemis tinctoria* bitkisiyle ilgili antibakteriyel aktivite çalışmasına rastlanmamıştır fakat 3 adet yapı aydınlatma çalışması bulunmuştur (Holla ve ark., 2000; Wollenwaber ve Mayer, 1991; Williams ve ark., 2000).

Holla ve arkadaşları (2000), *Anthemis tinctoria* bitkisindeki esansiyel yağları GC/MS yöntemi ile analiz etmişler; 1,8-sineol, beta-pinen, dekanolik asit ve alfa-pinen'in varlığı tespit etmişlerdir.

Anthemis tinctoria bitkisindeki flavonoidlerin incelendiği çalışmada Wollenwaber ve Mayer (1991) tarafından quercetagenin 3,6,3'-trimetileter ve quercetagenin 3,6,3',4'-tetrametil eter'in varlığı, Williams ve arkadaşları tarafından (2001) ise patuletin 3-glukozit ve patuletin 3-rutinosid flavon glikozitlerinin varlığı belirlenmiştir.

Anthemis tinctoria, *Compositae* (papatyagiller) familyasına ait bir bitkidir. Baytop (1999)'a göre, Anadolu'da 50 kadar *Anthemis* türü bulunmaktadır ve bunlar papatya çiçeği adı altında yıllardır tedavide ve boyarmadde olarak kullanılmaktadır. Uysal (1991)'a göre Çanakkale'de *Anthemis tinctoria* bitkisinin boyamada kullanıldığı belirtilmiştir.

Çalışmada maserasyon ekstresi, toplam metanol ekstresi ve fraksiyonların antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemine göre incelenmiş, etkin olduğu belirlenen ekstreler için MIC ve MBC değerleri hesaplanmıştır.

Ekim bulguları değerlendirildiğinde aktivitenin konsantrasyona ve bakteri cinsine bağlı olarak değiştiği görüldü. *Anthemis tinctoria* bitkisinin kullanılan 4 adet bakteriden sadece *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde etkili olduğu ve aktivitenin konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlendi. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi özellikle diklormetan fraksiyonunun 5 mg/25 µl konsantrasyonda *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde orta derece etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu fraksiyonun etkili olduğu *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterileri üzerinde MIC ve MBC değerleri Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

Bitkinin kalitatif incelemesinde eter ekstresinde; uçucu yağlar, sterol ve triterpenler, karetonoidler, yüksek yağ asitleri, kumarinlerin, alkol ekstresinde; tanenler, indirgeyici bileşikler, steroid glikozitlerin, su ekstresinde ise; tanenler, indirgeyici bileşikler, steroid glikozitler, poliüronidler ve saponinlerin varlığı belirlendi. Kalitatif analiz sonuçları Çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında *Anthemis tinctoria* bitkisinden hazırlanan ekstrelerin antibakteriyel etki gösteren moleküller içerdiği belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre antibakteriyel aktivitenin özellikle diklormetan fraksiyonu üzerinde yoğunlaşması bize etken moleküllerin bu çözücü ile geldiğini göstermektedir. Yine yaptığımız kalitatif analiz sonuçlarına dayanarak bu etkinin uçucu yağlar ve yağ asitleri, terpenler, karetonoidler, kumarinler ve steroid glikozitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu aktivitelerin hangi moleküllerden veya molekül gruplarından kaynaklandığı yönelik yapı aydınlatma çalışmaları ayrıca bakteri hücreleri üzerinde hangi mekanizmalara göre etki ettiklerine yönelik daha ileri çalışmalar yapılabilir.

6. ÖZET

Bu çalışmada *Anthemis tinctoria* bitkisinden elde edilen ekstrelerin antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemine göre incelenmiş, etkin olan ekstrelerin MIC ve MBC değerleri hesaplanmış ayrıca bitkinin kalitatif analizi yapılmıştır.

Antibakteriyel aktivite çalışmasında kullanılan *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* bakterileri üzerine maserasyon ekstresi, toplam metanol ekstresi ve fraksiyonların disk difüzyon yöntemiyle elde edilen antibakteriyel etki oranları Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Çizelgede belirtildiği üzere metanol ekstresinin hekzan ve diklormetan fraksiyonlarının en fazla aktiflik gösterdiği belirlenmiştir. Hekzan fraksiyonu *S. aureus* üzerinde 1 mg/disk konsantrasyonda 9 mm, 5 mg/disk konsantrasyonda 14 mm inhibisyon zonu oluştururken, *P. aeruginosa* üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 12 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Diklormetan fraksiyonu *S. aureus* üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 16 mm inhibisyon zonu oluştururken, *P. aeruginosa* üzerinde 5 mg/disk konsantrasyonda 15 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Ayrıca toplam metanol ekstresinin ve en etkin fraksiyon olan diklormetan ekstresinin MIC ve MBC değerleri belirlenerek sırasıyla çizelge 4.3 ve çizelge 4.4’de gösterilmiştir. Toplam metanol ekstresi için MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri 2,5 mg/ml olarak bulunmuştur. Diklormetan ekstresi için *S. aureus* üzerinde MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri 5 mg/ml olarak hesaplanmıştır. *P. aeruginosa* için ise MIC değeri 1,25 mg/ml, MBC değeri 10 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Bunun üzerine bitki önce hekzan ardından diklormetan ile ekstre edilmiştir ve bu ekstrelerin aktivitesi belirlenmiştir. Hekzan ve diklormetan ekstrelerinin ekim bulguları çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Hekzan ekstresi *S. aureus* bakterisi üzerindeki incelemede 1 mg/disk konsantrasyonda 11 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda ise 13 mm zon çapı oluşturmuştur, *P. aeruginosa*

bakterisi üzerinde ise 1 mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda 13 mm zon çapı oluşturmuştur. Diklormetan ekstresi *S. aureus* bakterisi üzerindeki incelemede 1 mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda ise 14 mm zon çapı oluşturmuştur, *P. aeruginosa* bakterisi üzerinde ise 1 mg/disk konsantrasyonda 10 mm zon çapı oluştururken, 5 mg/disk konsantrasyonda 15 mm zon çapı oluşturmuştur.

Ayrıca diklormetan ekstresi için MIC ve MBC değeri hesaplanmış ve bu değerler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. Çizelge 4.5'te belirtildiği gibi diklormetan ekstresi için *S. aureus* üzerindeki MIC değeri 2,5 mg/ml, MBC değeri 5 mg/ml olarak hesaplanmıştır. *P. aeruginosa* için ise MIC değeri 5 mg/ml, MBC değeri 10 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Yapılan kalitatif analiz sonuçları Çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

7. SUMMARY

In this study, antibacterial activity of extracts of *Anthemis tinctoria* was investigated by disc diffusion method and extracts which are active were tested to determine MIC and MBC values. Also, qualitative analysis was done.

Antibacterial activities of maceration extract, total methanol extract and fractions of *Anthemis tinctoria* against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* were determined using discs diffusion method. The results of discs diffusion method are shown in Table 4.3. Hexane and dichloromethane fractions of methanol extract displayed the highest antibacterial activity. With hexane 9 mm and 14 mm zones of inhibition were observed against *S. aureus* for 1 mg/disc and 5 mg/disc concentration respectively. and 12 mm zones of inhibition were observed against *P. aeruginosa* for 5 mg/disc. With dichloromethane, 16 mm and 15 mm zones of inhibition were observed against *S. aureus* and *P. aeruginosa* for 5 mg/disc respectively.

Also MIC and MBC values of total methanol extract and dichloromethane fraction were determined. The results are shown in Table 4.1. and Table 4.2. respectively. With total methanol extract MIC: 1,25 mg/ml and MBC: 2,5 mg/ml was calculated against *S. aureus*. With dichloromethane extract MIC: 1,25 mg/ml and MBC: 5 mg/ml was calculated against *S. aureus*. MIC: 1,25 mg/ml and MBC: 10 mg/ml was calculated against *P. aeruginosa*.

Therefore, plant material was extracted with hexane and dichloromethane respectively. The results are shown in Table 4.4. With hexane 11 mm and 13 mm zones of inhibition were observed against *S. aureus* for 1 mg/disc and 5 mg/disc concentration and 10 mm and 13 mm zones of inhibition were observed against *P. aeruginosa* for 1 mg/disc and 5 mg/disc respectively. With dichloromethane 10 mm and 14 mm zones of inhibition were observed against *S. aureus* for 1 mg/disc

and 5 mg/disc concentration and 10 mm and 15 mm zones of inhibition were observed against *P. aeruginosa* for 1 mg/disc and 5 mg/disc respectively.

Also MIC and MBC values of dichloromethane extract was determined. The results are shown in Table 4.5. With dichloromethane extract MIC: 2,5 mg/ml and MBC: 5 mg/ml was calculated against *S. aureus* and MIC: 5 mg/ml and MBC: 10 mg/ml was calculated against *P. aeruginosa*. The results of qualitative analysis was done.

8. KAYNAKLAR

Akçelik, M., Gürgün,V., Halkman, A.K. ve Tunail, N., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Sim Matbaacılık, Ankara, 258 s.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. ve Iwatsuki, K., 2001. Antibacterial Action of Several Tannins Against Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 487-491.

Alan, L. ve Miller, N.D., 1996. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. Alternative Medicine Review., 1:2, 103-111.

Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Bullock, B.C. ve Wagner, J.D.,1997. Soy Proteins Versus Soy Phytoestrogens in the Prevention of Diet Induced Coronary Artery Atherosclerosis of Male Cynomolgus Monkeys. Thromb. Vasc. Biol., 17, 2524-2531.

Barnes, S., Peterson, T.G. ve Coward, L., 1995. Rationale For Use of Genistein Containing of Soy Protein Intake on Serum Lipids. N. Engl. J. Med., 332, 276-282.

Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi. Fatih Yayınevi, İstanbul, 3-311 s.

Bilgehan, H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 753 s.

- Bruno, M., Bondi, M.L., Vassallo, N., Gedris, T.E. ve Herz, W., 1997. Guaianolides and Other Terpenoids From *Anthemis aetnensis*. *Phytochemistry*, 45:2, 375-377.
- Caleya, F., Gonzalez-Pascual, B., Garcia-Olmedo, F. ve Carbonero, P., 1972. Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. *Appl. Microbiol.* 23, 998-1000.
- Cao, Y. ve Cao, R., 1999. Angiogenesis Inhibited by Drinking Green Tea Could Prevent Cancer. *Nature*, 398, 381.
- Chaurasia, S.C. ve Vyas, K.K., 1997. In vitro Effect of Some Volatile Oil Against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath.*, 24, 26.
- Ciulei, I., 1982. Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Practical Manuals on the Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants. Edited by the Ministry of Chemical Industry, Bucharest, 73 p.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Çubukcu, B., 1992. Analitik Farmakognozi. İstanbul Üniversitesi Yayınevi, İstanbul, 24, 87 s.
- Dahanukar, S.A., Kulkarni, R.A. ve Rege, N.N., 2000. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian Journal of Pharmacology*, 32, 81-118.

Duke, J. A., 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Grace, M.H., 2002. Chemical Composition And Biological Activity of The Volatiles of *Anthemis melampodina* and *Pluchea dioscoridis*. *Phytotherapy Research.*, 16:2, 183-185.

Gunawerdana, K., Rivera, S.B. ve Epstein, W.W., 2002. The Monoterpenes of *Artemisia tridentata* and *Artemisia cana*. *Phytochemistry*, 59:2, 197-203.

Gürğün, V. ve Halkman, A.K., 1990., Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri., Basım&Grafik, Ankara, 356 s.

Holla, M., Svajdlenka, E., Vaverkova, S., Zibrunova, B., Teke, J. ve Havranek, E., 2000. Composition of the Oil From The Flowerheads of *Anthemis tinctoria* L. Cultivated In Slovak Republic. *Journal of Essential Oil Research.*, 12:6, 714-716.

Hufford, C.D., Jia, Y., Muhammed, I., Okunade, A.L., Clark, A.M. ve Rogers, R.D., 1993. Antimicrobial Compounds From *Petalostemum purpureum*. *J. Nat. Prod.* 56,1878-1889.

Hunter, M.D. ve Hull, L.A., 1993. Variation in Concentrations of Phloridzin And Phloretin in Apple Foliage. *Phytochemistry*, 34, 1251-1254.

Ikeda, I., Imesato, Y., Sasaki, E., Nakayama, M. ve Nagao, H., 1992. Tea Catechins Decrease Micellar Solubility and Intestinal Absorption of Cholesterol In Rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 141:6, 1127.

- Jankun, J., Selman, S. ve Swiercz, R., 1997. Why Drinking Green Tea Could Prevent Cancer. *Nature*, 387, 561.
- Keating, G.J. ve O'Kennedy, R., 1997. The Chemistry and Occurrence of Coumarins. *Coumarins*. John Wiley & Sons. New York.
- Kragh, K.M., Nielsen, J.E., Nielsen, K.K., Dreboldt, S. ve Mikkelsen, J.D., 1995. Characterization and Localization of New Antifungal Cysteine Rich Proteins From *Vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8, 424-434.
- Lee, I., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K. ve Kim, S., 1999. Effects of *S.tamariscina* on in vitro Tumor Cell Growth. *Cancer Letters*, 144, 93-99.
- Lee, S., Chung, H., Lee, K. ve Yoo, D., 2000. Structure Activity Relationship of Dietary Flavonoids for Inhibitory Activity of Mouse Brain Monoamine Oxidase in vitro. *Food Science Biotechnology*, 9:5, 304-307.
- Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P. ve Legoy, D.M., 2001. Identification of An Indigo Precursor From Leaves of *Isatis tinctoria*. *Phytochemistry*, 58, 897-904.
- Meyer, J. M., Afolayan, A. J., Taylor, M.B. ve Erasmus, D., 1997. Antiviral Activity of Galangin From The Aerial Parts of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.*, 56, 165-169.
- Mıstık, R., 2000. Aminoglikozid Antibiyotikler. *Klimik Dergisi*, 13:2, 43-45.

- Miksicek, R., 1993. Commonly Occuring Plant Flavonoids Have Estrogenic Activity. *Phytochemistry*, 44, 37-43.
- Nau, R. ve Eiffert, H., 2002. Modulation of Release of Proinflammatory Bacterial Compounds by Antibacterials: Potential Impact on Course of Inflammation And Outcome in Sepsis And Meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15:1, 95-110.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. ve Snader, K.M., 2000. The Influence of Natural Products Upon Drog Discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234.
- Ölmez, F.N., 2002. Yün Halı İpliklerinin Double-dyeing Metoduyla Boyanmasından Elde Edilen Renkler Ve Bazı Haslık Özellikleri. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6:3, 113-129.
- Öztürk, R., 1997. İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, s. 27-51.
- Pamuk, F., 2000. *Biyokimya*. Gazi Kitabevi, Ankara, 10,65 s.
- Perrett, S., Whitfield, P.J., Sanderson, L. ve Barlett, A., 1995. The Plant Molluscicide *Millettia thonningii* as Topical Antischistosomal Agents. *J. Ethnopharmacol*, 47, 49-54.
- Potter, S.M., 1995. Overview of Proposed Mechanisms for the Hypocholesterolemic Effects of Soy. *J. Nutr.*, 125, 606-611.

- Quarenghi, M.V., Tereschuk, M.L., Baigori, M.D. ve Abdala, L.R., 2000. Antimicrobial Activity of Flowers From *Anthemis cotula*. *Fitoterapia*, 71:6, 710-712
- Sato, M., Fujiwara, S., Tsuchiya, H., Fujii, T., Inuma, M., Tosa, H. ve Ohkawa, Y., 1996. Flavones With Antibacterial Activity Against Cariogenic Bacteria. *J. Ethnopharmacol*, 54, 171-176
- Scalbert, A. Antimicrobial Properties of Tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Tanır, G. ve Göl, N., 1999. Antibiyotik Direnci. *Klimik*, 12:2, 47-54.
- Tüzün, C., 1997. *Biyokimya*. Palme Yayın Dağıtım, Ankara, 97, 314-315 s.
- Tüzün, C., 1999. *Organik Kimya*. Palme Yayın Dağıtım, Ankara, 459 s.
- Uysal, İ., 1991. Ç.kale İlindeki Bazı Boya Bitkilerinin Morfolojisi, Korolojisi Ve Boyacılıkta Kullanılması. *Çanakkale Eğitim Yüksekokulu Araştırma Dergisi*, 2, 1, 65-104.
- Vajs, V., Todoroviç, N., Bulatoviç, V., Menkoviç, N., Macura, S., Juranic, N. ve Milosavljevic, S., 2000. Further Sesquiterpene Lactones From *Anthemis carpatica*. *Phytochemistry*, 54:6, 625-633.
- Weinmann, I., 1997. *History of The Development And Applications of Coumarins and Coumarin-related Compounds*. John Wiley & Sons., New York.

- Wild, R., 1994. The Complete Book of Natural and Medicinal Cures. Rodale Press, Inc.
- Williams, C.A., Greenham, J. ve Harborne, J.B., 2001. The Role of Lipophilic and Polar Flavonoids in the Classification of Temperate Members of the Anthemideae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 929-945.
- Williams, C.A. ve Harborne, J.B., 1992. Advances in Flavonoid Research Since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Wollenweber, E. ve Mayer, K., 1991. Exudate Flavonoids of *Anthemis nobilis* and *Anthemis tinctoria*. *Fitoterapia*, 62, 365-366.
- Wollenweber, E. ve Mann, K., 1989. External Flavonoid Aglycones in *Artemisia* and Some Further Anthemideae. *Fitoterapia*, 60, 460-463.
- Yam, T.S., Shah, S. ve Miller, J.M., 1997. Microbiological Activity of Whole and Fractionated Crude Extracts of Tea And Tea Components. *FEMS Microbiology Letters*, 152, 159-167.
- Zhang, Y. ve Lewis, K., 1997. Fabatins: New Antimicrobial Plant Peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 149, 59-64.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bana yardımcı olan danışmanım Yrd. Doç. Dr. Cahit AKGÜL' e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam boyunca ilgi ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet AY hocama ve çalışmamım deneysel aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan arkadaşım Fatemah BAHADORI' ye teşekkür ederim.

Bitkinin tanımlanması ve toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmet UYSAL ve Arş. Gör. Ersin KARABACAK'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan aileme çok teşekkür ediyorum.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülşen SAĞLIKOĞLU

Doğum Yeri ve Yılı: Gelibolu, 1979

Adres: Cevatpaşa Mah. Kaya Sokak No: 46/3

Eğitim Durumu

1984-1989: Gelibolu Namık Kemal İlkokulu

1989-1992: Gelibolu Lisesi Ortaokulu

1992-1995: Gelibolu Lisesi

1996-2000: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Mesleki Deneyim

2001- : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Kimya Bölümü; Araştırma Görevlisi

Çalışma ve İlgi Alanları

Biyokimya , Bitki Kimyası, Mikrobiyoloji

