

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SALVIA CRYPTHANTA MONTBRET & AUCHR EX BENTHAM VE *SALVIA*
POMIFERA L. TÜRLERİNİN METANOL, ETANOL EKSTRELERİNİN VE UÇUCU
YAĞLARININ ANTİBAKTERİYAL, ANTİFUNGAL VE ANTİTÜBERKÜLOZ
AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem KIZILKEÇİLİ

Balıkesir, Temmuz-2007

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SALVIA CRYPTHANTA MONTBRET & AUCHR EX BENTHAM VE *SALVIA POMIFERA* L. TÜRLERİNİN METANOL, ETANOL EKSTRELERİNİN VE UÇUCU YAĞLARININ ANTİBAKTERİYAL, ANTİFUNGAL VE ANTİTÜBERKÜLOZ AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem KIZILKEÇİLİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Sınav Tarihi: 19.07.2007

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ (EÜ)

Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN (BAÜ)

Balıkesir, Temmuz-2007

ÖZET

SALVIA CRYPTHANTA MONTBRET & AUCHR EX BENTHAM VE SALVIA POMIFERA L. TÜRLERİNİN METANOL, ETANOL EKSTRELERİNİN VE UÇUCU YAĞLARININ ANTİBAKTERİYAL, ANTİFUNGAL VE ANTİTÜBERKÜLOZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Özlem KIZILKEÇİLİ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi/ Tez Danışmanı: Yard.Doç.Dr.Tülin Aşkun

Balıkesir/Türkiye,2007

Türkiye *Lamiaceae* (*Labiatae*) familyası ile ilgili çok önemli bir gen merkezidir. Türkiye de 45 cins, 546 tür ve 730 taksa ile temsil edilir. *Salvia* cinsi *Mentheae* takımının *Nepetoideae* alt familyasına aittir. *Salvia* Türkiye de %50 si endemik olan 89 türe ait 94 takson ile temsil edilir.

Salvia cryptantha Kuşadası Aydın, *Salvia pomifera* Ankara Bilkent mevkinden toplanarak metanol, etanol ve uçucu yağlarının antimikrobiyal antitüberküloz aktivitelerine bakıldı. Aynı zamanda hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağlarında antimikrobiyal ve antitüberküloz aktivitelerine bakıldı. *Salvia* türleri için karakteristik olan 1,8-cineol *Salvia cryptantha* için %16.7, *Salvia pomifera* da ise %40 ile en fazla bulunan bileşiktir. Bununla birlikte *Salvia cryptantha* da %21.4 viridiflorol tespit edilmiştir.

Her iki bitkinin uçucu yağları metanol ve etanol ekstresine göre daha fazla antifungal aktivite göstermiştir. Özellikle *S.cryptantha*'nın uçucu yağları gram negatif bakteriler olan *K.pneumonia* ve *E.coli* üzerinde dikkate değer aktivite göstermiştir. *S.pomifera* ve *S.cryptantha*'nın metanol ekstreleri *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia* üzerinde aktivite göstermiş ve MİK değerleri 5mg/ml'dir.

Salvia pomifera'nın metanol ekstresi antitüberküloz aktivitesi göstermiştir. Aktivite tayini Bactec-MGIT yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Salvia pomifera*, *Salvia*, *Lamiaceae*, *mycobacterium tuberculosis*, uçucu yağ, geleneksel tıp

ABSTRACT

DETERMINING ANTIFUNGAL, ANTIBACTERIAL AND ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF METHANOL, ETHANOL EXTRACTS AND VOLATILE OILS OF *SALVIA CRYPTHANTA* MONTBRET & AUCHR EX BENTHAM VE *SALVIA POMIFERA* L. SPECIES

Özlem KIZILKEÇİLİ

Balıkesir Üniöersity, İnstituteof Science,
Department of Biology

Msc.Thesis / Supervisor:Dr. Tülin Aşkun

Balıkesir-Turkey, 2007

Turkey is a very important gene source for Lamiaceae (Labiatae) family. *Lamiaceae* is represented with 45 genus and 546 species in Turkey. The genus *Salvia* belongs to subfamily *Nepetoideae* of *Menthaeae* ordo. It is represented with 94 taxa belong to 89 species %50 of which are endemic.

Antimicrobial and antituberculosis activities of the volatile oils, methanol and ethanol extracts of *Salvia cryptantha* from Kuşadası/Aydın and *Salvia pomifera* Bilkent/ Ankara was studied. At the same time, antimicrobial and antituberculosis activities of the volatile oils obtained by hydrodistillation was studied.% 1,8cineol which is typical for *Salvia* species %16,7 in *Salvia cryptantha*,*Salvia pomifera* gave %40 which more than the other compounds Meanwhile *Salvia cryptantha* gave 21.4% viridflorol

The volatile oils of both plants were found to have moderate high antifundal activity in comparison with methanol and ethanol extracts. Especially, the volatile oils of *Salvia cryptantha* show noteworthy activity on gram negative bacteries such as *K.pnemonia* and *E.coli*. Methanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia pomifera* show activity on *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pnemonia* and their MIK value is 5mg/ml.

Methanol extract of *Salvia pomifera* has shown antituberculosis activity. Activity indication was done by using Bactec-MGIT method.

Key Words: *Salvia pomifera*, *Salvia*, *Lamiceae*, *Mycobacterium tuberculosis*, volatile oil, traditional medicine

İÇİNDEKİLER

ÖZET, Anahtar Sözcükler	ii
ABSTRACT, Key Words	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Şifalı Bitkilerin Dünyadaki Yeri	2
1.1.1 Şifalı Bitkilerin Tarihçesi	4
1.1.2 Şifalı Bitkilerin Kullanım Biçimleri	5
1.2 <i>Lamiceae (Labiatae)</i> Familyasının Alternatif Tıptaki Yeri	5
1.2.1 <i>Salvia</i> Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi	6
1.2.2 <i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia cryptantha</i> Türlerinin Genel Özellikleri	8
1.3 Bitkisel İlaçlarda Kalite, Güvenirlik ve Etkinlik	9
1.4 Uçucu Yağların Genel Özellikleri	12
1.4.1 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	13
1.4.1.1 Su Distilasyonu	13
1.4.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu	13
1.4.1.3 Buhar Distilasyonu	13
1.4.1.4 Kuru Distilasyon	14
1.4.1.5 Hidrodifüzyon	14
1.4.1.6 Mekanik Yöntem	15
1.4.2. Uçucu Yağların Farmakolojik Etkisi ve Kullanım Alanları	15
1.5. Bitkilerden Elde Edilen Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Temel Bileşenler	18
1.5.1. Fenolikler ve Polifenoller:	18
1.5.1.1 Basit Fenoller ve Fenolik Asitler	18
1.5.1.2 Kinonlar	20
1.5.1.3. Flovonlar, Flavonoidler ve Flavonoller	21
1.5.2. Taninler	22
1.5.3. Kumarinler	22
1.5.4. Uçucu Yağlar ve Terpenoidler	22
1.8 Şifalı Bitkilerin Antifungal Aktivitesi	24
1.9. Şifalı Bitkilerin Antibakteriyal Aktivitesi	27
1.10 Şifalı Bitkilerin Tüberküloz Tedavisindeki Yeri	29
2. MATERYAL ve METOT	32

2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanışı	32
2.1.1 Gölgede Kurutma	32
2.1.2 Saklama	32
2.2 Ekstrelerinin Hazırlanışı	33
2.2.1 Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı	33
2.2.2 Etanol Ekstresinin Hazırlanışı	33
2.2.3 Farklı Konsantrasyondaki Ekstre Çözeltilerin Hazırlanışı	34
2.3 Uçucu Yağın Hazırlanışı	34
2.3.1 Hidrodistilasyon	34
2.4 Kullanılan Mikroorganizmalar	35
2.5 İnokulum Hazırlanışı	36
2.5.1 Fungal İzolatlar	36
2.5.2 Bakteri ve Maya İzolatları	36
2.6 Methanol ve Etanol Ekstrelerinin Antibakterial Aktivitelerinin Tayini	36
2.6.1 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakterial Aktivitenin Belirlenmesi	37
2.6.2 Tüp Dilüsyon Yöntemi İle Bakteri ve Mayada MIK Belirlenmesi	37
2.6.3 MBK'nin Belirlenmesi	38
2.7 Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi	38
2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Aktivite Tayini	38
2.7.2 Broth Mikrodilüsyon Yöntemiyle Funguslarda MIK Belirlenmesi	39
2.7.3 MFK'nin Belirlenmesi	39
2.8 HPLC Analizi ve Koşulları	39
2.8.1 Numune Hazırlama	40
2.9 Uçucu Yağların Antibakterial Aktivite Tayini	40
2.9.1 Mikrodilüsyon Yöntemi ile MIK Belirlenmesi	40
2.9.2 MBK'nin Belirlenmesi	41
2.10 Uçucu Yağların Antifungal Aktivite Tayini	41
2.10.1 Mikrodilüsyon yöntemi ile MIK Belirlenmesi	41
2.10.2. MFK'nin Belirlenmesi	41
2.11 Uçucu Yağların Kalitatif ve Kantitatif Tayini	42
2.12 GC/GC-MS	42
2.13 Metanol ve Etanol Ekstrelerinin ve Uçucu Yağların Antimikobakterial Aktivite Tayinleri	43
2.14 İn vitro Oksijen Üretimine Bağlı Floresans Tayini Tekniği	44
2.15 Besiyerinde Kullanılan Maddelerin Özellikleri	44
2.15.1 BBL MGIT Mycobacteria Büyüme İşaretleyicisinin İçeriği	44
2.15.2 BBL MGIT OADC Zenginleştirici İçeriği	45
2.15.3 BBL MGIT PANTA Antibiyotik İçeriği	45
2.15.4 Kullanılan Reaktiflerin Saklama Koşulları	45
2.16. Antimikobakteriyal Aktivite Tayini	46
3. SONUÇ	47
3.1 Metanol ve Etanol Ekstresinin Antibakterial Aktivitesi	47
3.2. Metanol ve Etanol Ekstresinin Bakteriler İçin MIK Tayini	49
3.3. Methanol ve Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivitesi	51
3.3.1. Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Funguslar İçin MIK ve MFK Tayini	52
3.4 HPLC Analiz Sonuçları	53
3.5 Uçucu Yağların Antibakterial Aktivitesi	55
3.5.1 Uçucu Yağların MIK ve MBK Tayini	56
3.6 Uçucu Yağların Antifungal Aktivitesi	56

3.6.1.Uçucu Yağların MIK ve MFK Tayini	57
3.6.2. Uçucu Yağların GC-MS Analizi	57
3.7 Metanol,Etanol ve Uçucu Yağlarının Antimycobacterial Aktivitesi	62
4. TARTIŞMA	63
5. KAYNAKÇA	69

KISALTMALAR

WHO	World Human Organization
FDA	Food and Drug Administration
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyon
MHA	Müller Hinton Agar
MHB	Müller Hinton Broth
SDA	Sabaroud Dekstrozu Agar
SDB	Sabaroud Dekstrozu Broth
DMSO	Dimetilsülfoksit
MBK	Minimal Bakterisidal Konsantrasyonu
MFK	Minimal Fungusidal Konsantrasyon
MGIT	Mycobacterium Growth İndicator
Tube	
HIV	Human immunodeficiency Virus

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Antimikrobiai Özellik Taşıyan Temel Bileşenler	24
Şekil 2.1	Klevenger Aparatı	35
Şekil 3.1	<i>Salvia cryptantha</i> Metanol Ekstresinin Kromotogramı	54
Şekil 3.2	<i>Salvia pomifera</i> Metanol Ekstresinin Kromotogramı	54

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Amerikan Marketlerindeki Perakende Satış Tutarı ve Yıllık Artış	3
Çizelge 1.2	Türkiye’de Bulunan <i>Salvia</i> Cinslerinin İçerdiği Ana Bileşenler	13
Çizelge 2.1	GC/MS Analiz Koşulları	43
Çizelge 3.1.	<i>Salvia pomifera</i> Metanol Ekstresinin Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibakterial Aktivitesi	47
Çizelge 3.2.	<i>Salvia cryptantha</i> Metanol Ekstresinin Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibakterial Aktivitesi	48
Çizelge 3.3.	<i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia crypthanta</i> Etanol Ekstrelerinin Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibakterial Aktivitesi	48
Çizelge 3.4	<i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia crypthanta</i> Metanol Ekstresinin Tüp Dilusyon Yöntemi İle MIK Tayini	49
Çizelge 3.5	<i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia crypthanta</i> Etanol Ekstrelerinin Tüp Dilusyon Yöntemi İle MIK Tayini	50
Çizelge 3.6	<i>Salvia cryptantha</i> ve <i>Salvia pomifera</i> Metanol Ve Etanol Ekstrelerinin MIK ve MBK Değerleri	51
Çizelge 3.7.	<i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia crypthanta</i> Etanol ve Metanol Ekstrelerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Aktivitesi.	52
Çizelge 3.8	Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Funguslar İçin MIK ve MFK Tayini	53
Çizelge 3.9	HPLC Analiz sonuçları	55
Çizelge 3.10	Uçucu Yağların MIK ve MBK Değerleri	56
Çizelge 3.11	Uçucu Yağların MIK ve MFK Değerleri	57
Çizelge 3.12	<i>Salvia cryptantha</i> Uçucu Yağının Bileşenleri	58
Çizelge 3.13	<i>Salvia pomifera</i> Uçucu Yağının Bileşenleri	59
Çizelge 3.14	<i>Salvia cryptantha</i> ve <i>Salvia pomifera</i> Uçucu Yağlarının Ortak Bileşenleri	61
Çizelge 3.15	Metanol, Etanol ve Uçucu Yağlarının Antimycobacterial Aktivitesi	62

ÖNSÖZ

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek gelişmeme ve yetişmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yard.Doç.Dr. Tulin AŞKUN'a;

Bitkilerin temin ve teşhisinde yardımını esirgemeyen hocam Sayın Prof.Dr. Gülendam TÜMEN'e;

Analizlerimin yapılmasında bilgi ve birikimlerini paylaşan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden Sayın Prof.Dr. Hüsnü Can BAŞER ve Yard.Doç. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na;

2007/45 nolu projeye tezime maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bana bütün yaşamını adayan canım anneme ve maddi manevi desteğini esirgemeyen babama;

Laboratuar çalışmalarımda ve tezimin hazırlanmasında destek ve yardımları ile yanımda olan arkadaşlarım Sabiha PARLAK'a, ve Görkem DENİZ'e;

Çalışmamı tamamlamam konusunda her zaman beni destekleyen iş arkadaşlarıma;

Sevincimi ve hüznümü paylaştıkları için Sema ŞEN'e, Turan BAYRAM'a ve Zafer BAL'a hayatımda oldukları için teşekkür ederim.

Balıkesir, 2007

Özlem KIZILKEÇİLİ

1. GİRİŞ

Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Yüksek oranda tür endemizmi söz konusudur. Bu zenginliğin nedeni, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede yer alması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşım merkezinin Anadolu oluşu ile ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucudur

Bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan sekonder metabolitler yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilir. Bitkilerdeki sekonder metobolitlerin işlevleri tam olarak açıklanamamakla birlikte herbivorlardan, patojenlerden, UV ışığı gibi abiyotik çevresel streslerden korunmak için üretildiği düşünülmektedir. Kahve ağacının kafeinin güçlü bir böcek kovucu olduğu, epidermel hücrelerde buluna flavonoidlerinde UV koruyucu olduğu rapor edilmiştir [2]. Birçoğu güçlü biyolojik aktivite gösterir [3]. Bu bitkilerin DNA ve protein sentezi inhibisyonu, sinir sisteminin inhibisyonu ve kardiyak aktivitesi gibi aktiviteler göstermesi doğal ilaç ve aktif biomolekülleri günümüzdeki birçok ilacın ham maddesi haline getirmiştir [4]. Bu moleküller bitkinin birçok kısmında bulunabilirler ve miktarları dönem bağlı olarak değişmektedir [5, 6]. Tıbbi bitkilerin geniş yapısal bölümleri ve bunların farmakolojik aktiviteleri ilaç endüstrisi tarafından geniş çapta fark edilmiştir. WHO (World Health Organization) tarafından 1991 yılında Cenevre toplantısında yapılan tanıma göre; bitkisel ilaç, bitkisel drog veya karışımların değişik preparatlar halinde hazırlanarak etiketlenmiş tıbbi ürünleridir [7].

Türkiye bitki türleri açısından dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerden biri olmasının yanı sıra köklü bir kültüre de sahiptir. Bu durum bitkisel ilaçların daha etkili, daha toksik ve daha pahalı olan sentetik ilaçlarla birlikte kullanımlarında tamamlayıcı rol oynamalarına olanak sağlamakta, tek başlarına ise alternatif terapi aracı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistemlerin enfeksiyonlarında iyileştirici amaçlı olarak kullanımlarını gündeme getirmektedir. Bu yönüyle antibakterial aktiviteye sahip bitkilerin bakteri orijinli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği bildirilmektedir [8].

1.1 Şifalı Bitkilerin Dünyadaki Yeri

WHO kayıtlarına göre halen günümüzde dünya popülasyonunun % 80'ni doğal olmasından ve yan etkilerin olmayacağından düşünülmesinden dolayı ilk tedavide geleneksel tıpa yönelmektedir [9-11]. Son yıllarda sentetik ilaçlarla meydana gelebilen ciddi yan etkilerin yol açtığı medikal ve ekonomik sorunların yanı sıra, "yaratıcıları" arasında uluslar arası ilaç sanayisinin de yer aldığı, endüstrileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliği ayrıca küratif tedavileri henüz mümkün olmayan bir çok kronik hastalığın oluşturduğu tehdit ve doğallığın her zaman etkili ve yan etkiden arınmış olduğu düşüncesi bitkisel tedavinin popülaritesini artırmıştır [12].

19.-20. yüzyıllarda kimya ve biyokimya bilimlerindeki gelişmeler ilaç sanayisine büyük bir ivme kazandırmış, bu sayede etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek analitik, toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar sonucu, laboratuarlarda tıbbın gereksinimlerine yanıt veren pek çok ilaç geliştirilmiştir. Mevcut ilaçların 1/4'i bitkisel kökenlidir ve bunların birçoğunda bitkiden elde edilmek istenen etken madde, laboratuvar ortamında kopya edilmektedir [13]. Birçok endüstrisi gelişmiş ülkede bitkisel ürünlerin tıbbi olarak üretilmesi popüler bir hale gelmiştir. Kayıtlı olan bilgilere göre 1990 dan 1997 arasında Avrupa ülkelerinde bitkiler yaklaşık % 400 oranında iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Bilim adamlarının bitkisel ürünlerle ilgili

yaptıkları çalışmalar hastaların bitkisel ilaç tüketimini artırmış ve bu alandaki pazar payını 1997 de 350 milyon dolara yılında ulaştırmıştır [14].

1997 yılında ABD'nde bitkisel ilaçların satışının bir önceki yıla göre % 59'luk bir artış göstermiş olması, hastaların % 3-5'lik bir bölümünün temel tedavi olarak yalnızca bitkisel tedavi alıyor olması, bu tedaviler için yalnız Amerika'da yılda 3,24 milyar dolar, İngiltere'de 40 milyon sterlin harcanması, popülaritenin günden güne arttığını göstermektedir.[9].

Bitkisel ürünler genellikle meme kanseri (% 12), karaciğer hastalıkları (% 21), HIV (% 22), astım (% 24) ve romatolojik bozuklukları (%26) da içeren kronik tıbbi durumları olan hastalar tarafından kullanılmaktadır. Sentetik ilaç üretimi kalitesinde ve standartlar temelinde bitkisel ilaç üreten firmaların sayısı da giderek artmaktadır. 1998'de en çok satan yedi bitkisel ilaç 'gingko', 'John's wort' (hypericum perforatum=sarı kantaron), 'ginseng', 'garlic', 'echinacea', 'saw palmetto' ve 'kava' dır. Market perakende satış tutarları ve bir önceki yıla göre meydana gelen artış çizelge 1.1'de verilmiştir [15].

Çizelge 1.1 Amerikan Marketlerindeki Perakende Satış Tutarı Ve Yıllık Artış.

Bitkinin Adı	Satış Tutarı (\$)	Artış(%)
Gingko (mabed ağacı)	150 milyon	67
<i>Hypericum perforatum</i> (sarı kantron)	140 milyon	190
Ginseng	96 milyon	11
Garlic(Sarımsak)	84 milyon	17
Echinacea(Kirpi otu)	70 milyon	42
Saw palmetto	32 milyon	74
Kava	17 milyon	46

Son günlerde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etki alanı tam tanımlanmamış geniş spektrumlu ilaçların kullanılması mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç göstermesine neden olmaktadır. Bu problemlerin

yanı sıra antibiyotikler yan etki olarak tansiyon yükselmesine, alerjik reaksiyonlara ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına yol açmaktadır. Tüm bu nedenler bilim adamların yeni antibiyotik kaynakları bulmaya itmiştir. Antibiyotiğe direnç oranının tekrar edip bunun dikkat çekici bir boyuta ulaşmadan yeni antibiyotik kaynaklarının bulunması tıbbi bir önem taşımaktadır [16].

1.1.1 Şifalı Bitkilerin Tarihçesi

Bitkileri kullanarak hastaları tedavi etme yaklaşımı olarak açıklanabilen "fitoterapi" teriminin ilk kez 1870–1953 yılların arasında yaşamış Fransız hekimi Henri Lenclerc tarafından 'La Presse Medical' adlı dergide kullanıldığı iddia edilmiştir. Oysa bu tarihten çok önceleri bitkilerin sağlığı korumak ya da geri kazanmak için tarihin her döneminde, her toplum tarafından kullanıldığını görmekteyiz [17].

Bu konuda ilk yazılı belge olan M.Ö. 3000 yıllarına ait Ninova tabletleri, Mezopotamya'da kurulan Sümer, Akat, Asur medeniyetlerinde bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavilerin mevcut olduğunu kanıtlamaktadır [18]. M.Ö. 2500 yıllarında Çin tıbbıyla paralel bir gelişme içinde olan Hint tıbbının önemli temsilcilerinden Rig Veda, eserlerinde bine yakın şifalı bitkiden bahsetmiştir. Yunan tıbbının önemli adlarından Eskulap ve modern tıbbın temeli olarak kabul edilen Hipokrat kitaplarında 400'e yakın bitkisel ürünü anlatmıştır. İslam uygarlığı döneminde, yirmiye yakın şifalı bitkiden bahseden, bir kopyası Orhan Gazi kütüphanesi'nde bulunan Kitab-al Saydalafi al Tıp adlı kitabın yazarı Ebu Reyhan, 1650li yıllara kadar referans kitap olarak kabul edilen 800 hayvansal ve bitkisel tedaviden bahseden "Tıp Kanunu" adlı eseri yazan İbn-i Sina ve Al Gafini bitkisel tıp konusunda önemli eserlere imza atmışlardır [17, 19].

1.1.2 Şifalı Bitkilerin Kullanım Biçimleri

Halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin, toprak altı ve toprak üstü kısımlarının hatta tüm bitkinin doğrudan doğruya, suyla kaynatılarak veya suya daldırılarak (dekoksasyon, infüzyon, çay halinde) ya da pişirilerek, lapa halinde dahilen ve/veya haricen kullanılışları bulunmaktadır [20].

Ayrıca klinikte, koruyucu tedavide tavsiye edilen oturma banyoları ve ılık suyla yıkama, halk arasında da “buhar banyosu” olarak haricen uygulanmaktadır. Bitkiler dahilen kullanılışları sırasında genellikle balla tatlandırılmaktadır. Bazı yörelerde bitki karışımlarının kullanıldığı da tespit edilmiştir *Malva sylvestris* veya *Malva neglecta* bitkisinin yapraklarının, *Platanus orientalis*, *Quercus cerris var. cerris* ve *Salix alba* bitkilerinin kök kabuklarının, *Verbascum cheiranthifolium* veya *Verbascum chrysochaete* bitkisinin çiçek ve yapraklarının karışımından hazırlanan dekoksasyon, haricen lokal banyo halinde, Isparta yöresinde kullanılmaktadır [20].

1.2 Lamiceae (Labiatae) Familyasının Alternatif Tıptaki Yeri

Bitki orijinli antimikrobiyal ajanlar çok büyük iyileştirici özeliğine sahiptir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bileşik antimikrobiyal etkiden dolayı birçok efekte bölge eş zamanlı olarak hafifler. Tüm bitkiler önemli, aktif moleküller içerirler. Tıbbi açıdan etkili bileşikler genel olarak bitkide bulunan sekonder ürünlerdir. Bir kısmı bir arada depolanmış olarak bitkinin spesifik bir bölgesinde yada tüm bitkide bulunan bu bileşenler alkaloidler, steroidler, taninler ve fenol bileşenleridir. Bu bileşenler kompleks ve spesifiklerdir. Genel olarak familya, cins ve tür açısından belli taksada bulunurken sekonder metabolitlerin farklı oluşumu yabancı türlerde bulunur [21]. Rastgele halk arasında kullanılan bitkiler etnobotanik açıdan araştırmalı ve aktif bileşenleri tespit edilip daha yararlı biçimde tedavi amaçlı kullanılmalıdır [22, 23].

Türkiye Lamiaceae (Labiatae) familyası ile ilgili çok önemli bir gen merkezidir. Bu familya genellikle glandular ve aromatik olup bir yıllık veya çok yıllık otsular nadiren çalı ve ağaç formunda bulunurlar [24]. Türkiye de 45 cins, 546 tür ve 730 taksa ile temsil edilir. Familyanın endemizm oranının %44,2 olduğu belirtilmiştir [25].

Lamiaceae familyasının üyeleri Türkiye de Akdeniz bölgesinde daha çok dağlık bölgelerinde bulunur ve bunların uçucu yağ oranları üzerine detaylı bir çalışma Başer (1994) tarafından yapılmıştır [26]. Aromatik bitki bakımından en zengin familyalardan biri olan Labiatae familyasına ait bitkilerin çoğu antik çağlardan bu yana halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [10]. Bu yönüyle antibakterial aktiviteye sahip bitkilerin bakterial orijinli insan, hayvan, bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği bildirilmektedir[27]. Labiatae familyasına ait cinsler özellikle içerdikleri terpenik, (mono,di, triterpenler) flavonoid, iridoit ve tanen içerikleri nedeniyle önemli fizyolojik aktivitelere sahip bitkileri içermektedir [28]

1.2.1 *Salvia* Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Angiospermae subdivisio'sunun altıncı büyük familyası olan Lamiaceae üyeleri içerdiği uçucu ve aromatik yağlardan dolayı parfümeri ve farmakolojide kullandıklarından dolayı ekonomik ve tıbbi öneme sahiptir [29].

Labiatae familyasında yer alan *Salvia* cinsi *Menthae* takımının *Nepetoideae* alt familyasına aittir. *Salvia* Türkiye de %50 si endemik olan 89 türe ait 94 takson ile temsil edilir [25]. Bir çok *Salvia* türü uçucu yağ bakımından az yada çok etkindir (0,1-1,0%). *Salvia* cinsi çok uzun yıllardan beri halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır [30].

Latince de *Salvia* kelimesi sağlık anlamına gelir ve 10. yüzyılda arap hekimler adaçayının dünyada meydana gelen ölümlere karşı bir çözüm oluşturacağına inanmışlardır. Bir çok hastalığın tedavisinde örneğin yılan

ısırmada, göz problemlerinde, kısırlık da menstrual dönem dışı kanamalarda, enfeksiyon hastalıklarında, epilepside, zehirlenmede, Alzheimer hastalarındaki unutkanlık sorunlarına, bağırsak problemlerine eski zamanlardan beri halk arasında adaçayı ile çözüm aranmaktadır. Eski zamanlardan beri yerli Amerikalılar tarafından adaçayı kutsal bitki olarak kabul edilmektedir. Günümüzdeki tıbbi kullanımına baktığımızda ise çay formunda, ve bazı ilaç firmalarının ürettiği kapsül formunda tıbbi amaçlı olarak kullanıldığını görmekteyiz [31].

Biyolojik aktif bileşenlerini belirlemek üzerine yapılan birçok sayıda farmakolojik çalışma mevcuttur. İncelenen türler biyolojik aktivite olarak antimikrobial, antiviral, antitümör, antioksidant, antihidrotik aktivite içermekte ve özellikle zihinsel, sinirsel ve gastrointestinal koşulların tedavisinde kullanılmaktadır [23, 32]. Bitki orijinli antimikrobial ajanlar çok büyük iyileştirici özeliğine sahiptir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bileşik antimikrobiyal etkiden dolayı birçok efekte bölge eş zamanlı olarak hafifler [27].

Antibiyotikler keşfedilene kadar *Salvia*, bitki çayı içinde sıkça yer alan bir bitki olup, tüberküloz hastalarına terlemeyi önleyici olarak ve kronik bronşitin tedavisi için tavsiye edilirdi. Bunun yanı sıra terleme, ateş, romatizma, seksüel zayıflık ve zihinsel ve sinirsel rahatsızlıklara karşı tedavi edici olarak ayrıca böcek öldürücü olarak da kullanılırdı [33].

Günümüzde ise antibiyotik kullanımının artması ve düzensiz kullanımı beraberinde antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç geliştirmesine neden olmuştur. Bu durum bilim adamlarını yeni antibiyotikler geliştirmeye yöneltmiştir [34]. Antimikrobial kemoterapide çeşitli enfeksiyonların genelinde tedavisinde antimikrobial kemoterapi olarak sinerjik etkisi olan Agumantin gibi ilaçlar kullanılır.

Halk arasında bir çok bitki bir araya getirilerek tedavi amaçlı yada ilk müdahale de kullanılır. Literatürde etnobotanik çalışmalarında *Salvia* türlerinin

çeşitli enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir [35]. Afrika'nın güney kesiminde *Salvia stenopylla*, *Salvia runcinata* ve *Salvia repens* mikrop öldürücü ve temizleyici olarak kullanılmaktadır. Yaprakları da kaynatılarak terleme, ateş, baş ağrısı ve hazım zorluğuna karşı kullanılır. Bitki ekstratları vücutta meydana gelen açık yaralara karşı da kullanılmaktadır. Ayrıca boğaz enfeksiyonları ve kadın rahatsızlıkları için kaynatılıp suyu içilirdi. Halk arasındaki kullanımının yaygınlığı günümüzde bilim adamlarını bu bitkilerin aktif bileşenlerini ve biyolojik aktivitelerini araştırmaya itmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar sonucunda farklı *Salvia* türlerinin antibakterial, anti-inflammatuar antikolinesteraz ve antikanser aktiviteleri olduğunu göstermektedir. Özellikle *Salvia* türleri yemeklere tat katmak amaçlı ve genellikle ekstratları ise yiyeceklerin raf ömürlerini uzatmak için kullanılmaktadır. Antioksidant aktivitesini yanında [36, 37] antiseptik ve antibakterial özellikler antifungal, antiviral sitotoksik, [38, 39] karın ağrısı giderici, diüretik, hipoglisemi, [40] yaraların iyileştirilmesinde, ve sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Keller'in oluşturduğu listesine göre adaçayı 60'dan farklı rahatsızlığın tedavisinde kullanılır [41].

1.2.2 *Salvia pomifera* ve *Salvia cryptantha* Türlerinin Genel Özellikleri

Alem : Plantae	Alem : Plantae
Şube : Magnoliophyta	Şube : Magnoliophyta
Sınıf : Magnoliopsida	Sınıf : Magnoliopsida
Takım : Lamiales	Takım : Lamiales
Familya: Lamiaceae	Familya : Lamiaceae
Cins : <i>Salvia</i>	Cins : <i>Salvia</i>
Tür : <i>Salvia pomifera</i>	Tür : <i>Salvia cryptantha</i>

Salvia pomifera, her mevsim yeşil rengini koruyan çalı şeklinde 1m boyundadır. Çiçeklerin de hem dişi hem erkek organı bir arada taşır. Polenleri i böcekler tarafından taşınır. *Salvia pomifera*, ışıklı, ortamlarla,

verimli, kuru yada nemli ve asitli toprağı tercih ederler. Gölge ortamlarda büyümmezler. Habitatı ise Güney Avrupa, Türkiye'nin Güneyi ve Yunanistan ile Girit adasıdır. Yaprakları güçlü bir koku ve tada sahiptir. Bitkinin yaprakları çay formunda tüketilir. Bitkinin genç yaprakları üzerinde bulunan yarı görünen keseler içerisindeki kristalimsi şeker bitki için bir koruma olurken bitkiye ayrı bir tat katar [42]. *Salvia pomifera*'nın yapraklarının etkisi genel olarak bilinen adaçayı olan *S. officinalis* ile aynı özellikte olup daha güçlüdür. Bu özellikleri antihidrotik, antiseptik, [43] antispazmik, kanamayı durdurucu, gaz giderici, düzenleyici, güçlendirici ve damar acıcı olmasıdır [44].

Salvia cryptantha görünüş olarak *Salvia multicalis*'e benzer. Ancak yaprakları daha incedir. Endemik bir türdür. Sivas ve Niğde civarlarında görülür [24].

1.3 Bitkisel İlaçlarda Kalite, Güvenirlik ve Etkinlik

Bitkisel ürünler doğal oldukları için sıklıkla güvenli olarak algılanır. Doğal olan her zaman güvenli olan demek değildir. Bitkisel tedavi uzmanlarına (herbalistler) göre saflaştırılmamış bitkinin kullanımı, bitkiyi oluşturan maddelerin birbirini nötralize etmesi sebebiyle yan etki olaylığını azaltmaktadır. Pek çok bitki yüksek derecede toksiktir ve diğer tamamlayıcı tedavi yöntemleri içinde fitoterapi yan etki ve toksisite yönünden çok daha fazla risk taşır [15].

Bitkisel tıbbın modern tıp ile entegre olabilmesi için konunun kalite ve güvenilirlik ve etkinlik açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. WHO 2004 yılında yayınladığı raporunda bitkisel ilaç ticareti yapan birçok Alman Federal İlaç ve Tıbbi Planlar Enstitüsü ve Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi'nden (FDA) gelen son uyarılarda, karaciğer nakline giden üç olgu ve ölümlü sonuçlanan bir olguda kava bitkisi ve karaciğer hasarı arasında ilişki tanımlanmıştır. Bu noktada temel sorun milyonlarca insanın bitkilere bu kadar rahatça güvenmesidir ve bu güven sonucu bilinçsiz yaygın kullanım, toplum sağlığını

tehlikeye atacak pek çok soruna yol açabilir [45]. Tüketicilerdeki genel kanı bitkisel olan bir şeyin zararsız olduğudur ki bu yaklaşım yanlış olup bitkilerin tüketim koşullarına bağlı olarak aslında bir takım riskler taşıdıklarını bugün biliyoruz. Tedavi edici özelliklerinin yanı sıra bitkisel ilaçlar aynı zamanda hastalıklardan korunmak için de tüketilmektedir. Özellikle marketlerde satılan çay formu bu amaçla tüketilmektedir. Bu çaylar doğal olarak toplanan bitkilerin herhangi bir hijyenik yada sıhhi kontrol olmaksızın kurutulup paketlenmesi sonucunda elde edilirler. Bu durumda bu bitkilerde mikrobiyal kontaminasyon söz konusu olabilir. Çevrede bulunan tozlar bitkinin herhangi bir bölümüne yerleşebilirken içerisinde birçok bakterial ve küf sporları da taşıyabilmektedir. Bacillaceae familyasını bakterial sporları ısıya karşı direnç göstermektedir. *Bacillus cereus* ve *Clostridium perfringens* bu familyanın üyesi olup potansiyel patojendir ve besin zehirlenmelerinden sorumludur. Bunun yanı sıra tıbbi bitkiler *Fusarium* subsp., *Aspergillus* subsp. gibi küfler tarafından da kontamine edilebilir. Bu yüzden bitkilerin toplanma, saklanma ve paketlenme koşulları belli bir denetim altında yapılmalıdır [46].

Halk ilacı olarak kullanım hekim ve ilaca ulaşmanın zor olduğu bazı Asya, Afrika ve Güney Afrika'nın bazı kesimlerinde yoğun bir biçimde görülmektedir ve adeta modern tıp ile yarışmaktadır. ABD de bu ürünler daha çok gıda desteği (nutrasötik) kapsamında değerlendirildiğinden FDA onay ve kontrolün dışında tutulmuştur. Son yıllarda bu ürünlerin kontrolsüz satışlarından doğan ve halkın sağlığını tehdit eden bir durum ortaya çıkmasından dolayı farmakognistler, toksikologlar ve diğer konu ile ilgili araştırmacılar bitkisel ilaçların yapısı, stabilitesi ve yan etkileri konusunda çok sayıda araştırma yayınlamışlardır [45].

Bitkisel ilaçlarla tedavide tıpkı kimyasal bir takım ilaçlarla olduğu gibidir. Yani hangi dozda alındığı ve doğru kullanımı önemlidir. Bitkisel ilaçlar da tıpkı biyomedikal ilaçlar gibi yan etkiler içermektedir. Çünkü bitkisel ilaçların da etki mekanizması tıpkı biyomedikal ilaçlarda olduğu gibidir. Bunun yanı sıra birçok kişisel kullanımda sorun çıkartabilir [17].

Tedaviye yönelik indeksler şifalı bitkilerin yan etkiye neden olacak miktarının özellikleri ile tedaviye yönelik etkilerinin dozajlarının kıyaslamasını işaret etmektedir. Yüksek tedavi edici indekse sahip olduğu bildirilmekle beraber tedaviye yönelik indeksi belirleyen asıl şartlar hangi şifalı bitkinin, hangi dozda ve hangi işlemler sonrası kullanıldığıdır. Eğer hasta tedavi edici doz olarak çok miktarda yada çok sık örneğin her ay tüketirse büyük ihtimalle toksite gelişecektir. Bunun için şifalı bitkinin tüketim miktarı doğru olarak araştırılmalıdır. Bitkisel ilaçlarla yüksek hassasiyetin, zehirlenmeye yada bazı diğer yan etkilere neden olabilir. Bir Afrika bitkisi olan Yohimbine fazla miktarda alındığı takdirde kişilerde alerjik reaksiyon gelişmesine neden olmaktadır. Kedi otu devamlı tüketildiğinde mitokondrial aktivitenin bozulmasına neden olan, alkali ajanların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Willow diye büyük yaprakları ile Avrupa da marketlerde aspirin gibi serbest satılan bu bitkinin bileşenlerinin aspirinin bileşenlerine benzeyip Reye Sendromuna sebep olduğu bildirilmiştir. WHO tarafından şifalı bitkilerle tedavi ile ilgili 5000'nin üzerinde yan etki oluşturduğuna dair rapor mevcuttur. Lazarou ve Pomeranz'ın raporuna göre 137.000 hastanede yatan Amerikalı senede ölmekte ve 2.7 milyon insan ise tam tanımlanmamış yada bilinçsizce kullanılan ilaçların yan etkilerinden kaynaklı ciddi olarak hastalanıp ölmektedir. Amerikan Zehir Kontrol Merkezi Kurumu ve Yiyecek ve İlaç Yönetimi (FDA) 'ne ulaşan raporlarda ciddi sağlık problemleri ve ölümler şifalı bitkilerin kullanımı sonucu oluşan yan etkileri yada toksik etkileşimlerden dolayı meydana gelmiştir. FDA 1993 den 1998 kadar 2600 ciddi medikal problemi rapor etmiş ve bunlardan 184'ü şifalı bitkilerin kullanılmasından kaynaklı olduğu belirlenmiştir [7].

Bu çeşit raporların varlığı, eksik kayıtlar ve yan etkileri ile ilgi yeterli bilgi olmamasından şifalı bitkilere olan ilgiyi azaltmıştır. Gerçi bugün kullanılan biyomedikal ilaçların günlük kullanımının sonuçlarının oluşturduğu sonuçlar ise ortadır. Sonuç olarak oluşan düşünce şifalı bitkilerle tedavi riski biyokimyasal ilaçları kullanmak kadar güvenli olduğudur [7].

1.4 Uçucu Yağların Genel Özellikleri

Uçucu yağlar kompleks doğal bileşenler olup bitkilerin sekonder ürünleridir. Su ile karışmayan maddeler olup etanol, eter, benzen, petrol eteri gibi organik çözücülerde çözülür. Oda sıcaklığında sıvı halde olup su buharı ile sürüklenebilen uçucu özellikte kokulu ve yağimsı karışımlardır. Açıkta bırakılınca oda sıcaklığında bile buharlaşabilir. [47, 48]

Uçucu yağlar ya bitkinin belirli organlarında örneğin taç yaprak, yaprak, meyve, kabuk, meyve sapı, odunsu doku gibi ya da bitkinin tüm organlarında ayrıca bazen bir organın belirli dokularında da bulunabilirler. Bu yağlar bitkilerin bağlı bulunduğu familyalara göre salgı tüyünde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde bulunmaktadır [49]

Bugüne kadar uçucu yağlarda 2000'den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiştir ve bunların büyük çoğunluğunu terpenik maddeler oluşturmaktadır. Pek azı aromatik benzen türevlerinin terpenlerle karışımı halindedir [47]. Uçucu yağların ana bileşenleri karbonhidrat, alkol, eter ve keton, fenol, aldehit, içeren mono ve seskiterpenlerdir. Diğer uçucu yağlar ise fenilpropenler ve spesifik sülfür yada nitrojen içeren maddeleri içerirler. Bu maddeler uçucu yağa aromatik ve tıbbi bitki özellikleri kazandırmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı eski çağlardan beri çeşitli baharatlar yemeklere sadece tat vermesi için değil aynı zamanda koruma amaçlıda eklenmiştir [50]. Çok uzun yıllardan beri uçucu yağlar bitkilerin çok çeşitli kısımlarından elde edilmektedir. Uçucu yağların istenilen koku ve tadı oksijenli bileşenlerden ileri gelmektedir. Oksijenli türevler ise terpenlerin oksitlenmesi ile meydana gelir.

Genel olarak yağ bileşeni çeşitli bileşenlerin belli oranda bir araya gelmesi ile oluşur. Bir çok *Salvia* türü uçucu yağlar bakımından az yada çok etkindir. *Salvia* türlerinden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinde ana madde olarak 1,8 sineol (eukaliptol) ve borneol bildirilmiştir. Bunun yanında bu

türlerin uçucu yağının yararlı bileşenleri yüksek miktarda içerdiği bildirilmiştir [51].

1.4.1 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağlar, yağı taşıyan bitki kısımlarından, genellikle distilasyon yolu ile kazanılır [52].

1.4.1.1 Su Distilasyonu

Su distilasyonu, kurutulmuş olan ve kaynatılmakta bozulmayan bitkisel materyal ile çalışılıyorsa seçilir. Terementi(terebentin) esansı bu yolla elde edilir. Çam yaprakları, ağaç parçacıkları, bitkiye ait diğer salgı maddeleri ve yağmur suyu ile karışık şekilde bulunan ham terebentin, distilasyon aygıtına yerleştirilir ve bütün uçucu kısımlar, yani uçucucu yağ ve su, toplama kabında yoğunlaşana kadar ısıtılır, distile edilir. Terebentin esansı hemen tamamen terpenik maddelerden oluştuğu için, uygulanmış olan bu ısıdan etkilenmez, bozulmaz [52].

1.4.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu

İster kuru, ister taze bitki olsun, ısıdan bozulan maddeler varsa uygulanır. Kuru materyalden hareket ediliyorsa (örneğin tarçın kabuğu), drog önce toz edilir sonra su ile örtülerek maserasyona bırakılır. Bu maserattan su buharı geçirilmesi suretiyle uçucu kısımlar ayrılır. Taze materyalden hareket ediliyorsa uzun süre maserasyona gerek yoktur. Su buharı genellikle başka bir yerde elde edilir ve bir boru aracılığı ile su-drog karışımı içine yöneltilir. Böylece ısı ile parçalanma olasılığı ortadan kaldırılmış olur. Distilattaki yağ tabakası sulu tabakadan ayrılır [52].

1.4.1.3 Buhar Distilasyonu

Doğrudan doğruya buhar distilasyonu ise taze materyale uygulanan bir yöntemdir. Bitki canlı olduğundan ve yeterince su taşıdığından bu yöntemde su ile maserasyona bırakma gereği yoktur. Bitkisel materyal toplanır, kesilir tel sepet yada benzeri kaplar içine konularak distilasyon kazanına yerleştirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltilen buhar, yağ damlacıklarını da beraber sürükleyerek toplama kabına getirir. Buhar distilasyonu sırasında bazı maddeler dayanıklılıklarını sürdürdükleri halde, bazıları bu ısıda hidroliz olurlar. İşte bu hidrolize engel olmak, yada hidrolizi en düşük düzeye indirebilmek için hücre zarından su ve buharın difüzyon hızını çok iyi düzenlemek ve distilasyonu olabildiği kadar hızlı yapmak gerekir. Uçucu yağ bitkide genellikle % 1–2 oranında, hatta bazen daha da az miktarda bulunduğundan, distilasyon işlemleri boyunca fazla hacimde su ve bu suya oranla, çok az miktarda uçucu yağ yoğunlaşacaktır [52].

1.4.1.4 Kuru Distilasyon

Bazı droglar ısıtıldıklarında uçucu maddeler kısmen parçalanarak distile olurlar. Materyal odun yada dal ise küçük parçalar halinde yüksek sıcaklıkta havasız ortamdaki bir kazana yerleştirilir ve kuru kuruya distilasyonu sağlanır. Elde edilen ürün soğutucudan geçirildikten sonra bir kaptaki toplanır [52].

1.4.1.5 Hidrodifüzyon

Bitkisel dokularda yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken, bir kısımda iç kısımda bulunur. İç kısımda yağ buhar ile almak mümkün değildir. Bitkiye buhar distilasyonunun aksine buhar bitkisel materyal dolu kazana üstten verilir, alttan çıkan buhar ise yoğunlaştırılır. Distilasyon süresinin kısalığı ve az buhar kullanımından dolayı az masraflı olduğundan tercih edilir [52].

1.4.1.6 Mekanik Yöntem

Bu yol genel olarak portakal, limon, bergamot ve mandalina gibi turunçgil meyve kabuklarından uçucu yağ elde etmek için kullanılır. Presleme sonucunda elde edilen bulanık usareler filtreden süzülür, yüksek devirde santrifüj edilir ve alkol ilave edilerek veya ısıtılarak bulanıklık yapan maddeler uzaklaştırılır [52].

1.4.2. Uçucu Yağların Farmakolojik Etkisi ve Kullanım Alanları

Bugüne kadar uçucu yağlarda 2000'den fazla kimyasal bileşenlerin bulunduğu gösterilmiştir ki, bunların en önemlileri terpenler, fenilpropanlar vs.dir. Ayrıca çok sayıda su buharında uçucu olan azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı da görülmüştür. Bu maddeler fizyolojik etkileri nedeni ile bazen tek tek veya bazen de karışım şeklinde terapide kullanılmaktadırlar [49].

Uçucu yağlar eski çağlardan günümüze kadar tedavide kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadırlar [49]. Halk tıbbında kullanılma amaçları esas alınarak bu ilaçlar üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar sonucunda bazı biyolojik etkileri bilimsel olarak da açıklanmıştır [53].

Tıpta, alternatif tedavide, kozmetikte ve yiyeceklerin raf ömürlerini uzatmak için kullanılan uçucu yağların doğal olarak bitkilerden elde edilmesi, organik çözücü maddeler yardımıyla ilgili bitki kısımlarının preslenmesi, su buharı distilasyonu veya ekstraksiyonu ile olmaktadır [54].

Dünya sağlık teşkilatının (WHO) 91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20.000 kadar olduğu belirtilmiştir. Doğal olarak yetişen bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinde birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler

izole edilmiş, bu maddeler mikroorganizmalar üzerine denenmiş ve aktiviteleri rapor edilmiştir [55].

Bilindiği gibi uçucu yağların, uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde etki gösteren özel kokulara sahip olma gibi özellikleri vardır. Bu son özellikleri, biyolojik olarak aktif olabileceklerini ortaya koymaktadır. En çok rapor edilen özellikleri antimikrobal olmalarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkarıldığı testler belli bir standardizasyona bağlı değildir ve uygun laboratuarlarda yapılabilmektedir. Genel olarak kullanılan teknikler agar difüzyon ve broth-dilüsyon yöntemleridir. Bu metotlar dışında uçucu yağların inhibisyon zon çaplarını belirlemek üzere son yıllarda kullanılan diğer bir yöntemde disk difüzyon metodudur [56].

Çizelge1.2 Türkiye de Bulunan *Salvia* Cinslerinin İçerdiği Ana Bileşenler [57]

Türkiye'de Bulunan Toplam Taksa Sayısı	Türkiye'de Bulunan Endemik Cinsler	İçerdikleri Uçucu Yağın Ana Bileşenleri (%)
92	44	1,8-sineol: <i>cryptantha</i>[8] <i>fruticosa</i> α pinen : <i>tomentosa</i> α +β-pinen: <i>candidissima</i> β -pinen: <i>wiedemannii</i> [29] β -tujon : <i>pomifera</i>[57] campor : <i>tomentosa</i> [8, 58] carvakrol:<i>verticillata</i> ssp. <i>amasiaca</i> linaik asetat: <i>sclarea</i> [57, 59] sabinil asetat : <i>pisidica</i> [8]

Günümüzde yaklaşık 3000 çeşit uçucu yağ bilinmektedir ve bunlardan 300 tanesi ticari öneme sahiptir [60]. Çok çeşitli uçucu yağ farmakolojik etkiler üretir, anti-inflmatuvar, antikanserojenik ve antioksidant özellikler

gösterir. Çok geniş bir spektrumdaki organizmalara etki eder örneğin bakteri, fungus, virüs, protozoa, böcekler ve bitkiler üzerine etkilidir. Uçucu yağlar bunun yanı sıra parfümeride, yiyecek ve içecek endüstrisinde de kullanılır. Uçucu yağlar antimikrobiyal özellikleri ile kimyasal koruyuculara bir alternatif olmuşlardır [61, 62]. Son zamanlarda doğal ürünlerde bulunan uçucu yağlara olan ilgi bir hayli fazladır. Bunun temel nedeni toksik etkisinin az olmasının yanı sıra ayrışabilirliğinin diğer antibiyotiklerle ve koruyucularla kıyaslandığında çok daha iyi olmasıdır. Tüm bu nedenlerden dolayı bitki uçucu yağları çalışma alanı olarak dikkat çekmektedir. Uçucu yağların etkinliğini belirleyebilmek için bileşenleri ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar yapılması önemlidir [61].

Uçucu yağların kimyasal bileşenleri iklime, mevsime, coğrafik koşullara, hasat zamanına, distilasyon tekniğine, depoalama şartlarına ve izolasyon metotlarına bağlıdır.[28] Fiari ve ark. 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada *S.sclarea*'nın doğal olarak yetişen biyotipinden elde edilen kültürlerin yaprak ve çiçeklerinin çiçeklenme ve tohumların olgunlaşmaya başlama dönemi olarak 2 farklı dönemde uçucu yağ elde edilmiştir. Tohumlanma döneminde elde edilen uçucu yağın veriminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Gene aynı çalışmada çiçeklerden elde edilen uçucu yağda monoterpenlerin miktarı seksiterpenlerden fazla iken yapraklarda bu durum tam tersi olup seksiterpenler major haldedir [63].

Buna ilaveten antibakterial aktiviteleri ise tipe, baharatın yada ucucu yağın bileşenlerine ve konsantrasyonuna, hedef organizmanın konsantrasyon ve tipine substratın bileşenlerine uygulama ve saklama koşullarına bağlıdır [26]. Çeşitli uçucu yağların kimyasal kompozisyonu ile ilgili birçok yayın mevcuttur [64]. Uçucu yağların kompozisyonlarının içeriği GC-MS analizi ile belirlenmekte ve uçucu yağlar 60 dan fazla bileşen içirmektedir. Ancak bu bileşenlerin %80'ni ana bileşenler tarafından oluşturulur, diğer maddeler ise eser miktarda bulunan maddelerdir [16].

Salvia türlerinden elde edilen birçok diterpenoid bilinmektedir. Örneğin *S.officinalis* ve *S.triloba* da diterpen karnosol bulunmuştur. Sonrasında yapılan çalışmalarla *S.officinalis* den ferruginol elde edilmiştir. Hem karnosol hem ferruginol 8,11,13 abitetrien yapısındadır. Salvin antibakteriyal diterpanoit olup *S.officinalis*'den elde edilmiştir ve 11,12-dihidroksi-8,11,13(~4)-abitetrien-2~oik asit yapısındadır. Farklı türlerden elde edilen uçucu yağların içeriklerinin farklı olmasının temel nedeni bu metabolitlerin genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmesidir [65].

1.5. Bitkilerden Elde Edilen Antimikrobial Özellik Taşıyan Temel Bileşenler

İlaçlarda selüloz, nişasta, pektin, protein, şeker gibi tedavi yönünden etkisiz maddeler yanında çok az miktarlarda, farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır. Bu bileşiklere "*etkili madde*" ismi verilmektedir. Bitkiler limitsiz sayıda aromatik bileşen içerirler. Bunların birçoğu fenollerdir yada onların oksijen bağlanmış halleridir. Bitkilerin sekonder metabolit üretmelerinin amacı kendilerini mikroorganizmalardan, böceklerden ve herbivorlardan korumaktır. Örneğin terpenoidler bitkiye koku verirken kuanin ve taninler ise bitkideki pigment oluşumunda görev alırlar. Bunun yanı sıra bitkilerin kendilerine has tatları bileşenlerinden kaynaklıdır. Bileşenlerin antimikrobial özellikleri kokulu bitkileri ve baharatları tıbbi amaçlı kullanmaya da imkan sağlamıştır [66].

1.5.1.Fenolikler ve Polifenoller:

1.5.1 1Basit Fenoller ve Fenolik Asitler

Bazı basit bioaktif fitokimyasalar fenolik halkalar içerirler. Sinnamik ve kafaik asit yüksek oksidasyon bölümü olan bileşenlerden türetilmiş geniş bir grup olan fenil prapon içerisinde yer alırlar. Şifalı bitkilerden genel olarak

bilinen tarhun otu ve kekik içerisinde virüslere, bakterilere ve funguslara etkili olan kafeik asit bulundurur. Katekol ve pirogallol her ikisinde hidroksilenmiş fenol gurubu içerisinde yer alıp aynı zamanda mikroorganizmalara karşı toksik etki gösterirler. Katekol de iki hidroksil gurubu bulunurken pirogallol de üç hidroksil gurubu mevcuttur. Fenol gruplarında yer alan hidroksil gurubunun sayısı bileşiğin mikroorganizmalara olan toksik etkisinin miktarı ile ilişkilidir. Bu konu ile ilgili en büyük kanıt hidroksil gurubu fazla olan fenol bileşenin toksitesinin artmasıdır [66]. Buna ilaveten birçok yayında okside olmuş fenollerin mikroorganizmaları inhibe ettiği belirlenmiştir [67, 68]. Bu anlamda fenolik etkinin toksik metabolizmasına baktığımızda, mikroorganizmadaki enzim mekanizmasının, oksitlenmiş bileşenler tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. Bunu yanı sıra sülfür bileşenleri ile etkileşim yada proteinlerle olan spesifik olmayan bağlantılarda yine mikroorganizmayı inhibe edebilmektedir [69].

Salvia L. cinslerinin çayında suda çözünen ve ana bileşen olarak bulunan polar fenolik bileşenler vardır. Bunların çoğu kafeik asitlerin türevleridir [70]. Bunlar, 4- hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit gibi bir kaç basit benzoik asit ayrıca 3-methoksi,-4-hidroksibenzoik asit veya vanillik asit, eter bağlanmış dimer formu olan heksil 4-hidroksibenzoat ve iki kumarin bağlanmış 6,7-dihidroksikumarin 7-methoksikumarin (herniarin) gibi karmaşık bileşenlerde vardır [70, 71].

Fenolik bileşenler düşük seviyede oksidasyona sahip karbon üçlü bağı ve oksijen içermezler olarak uçucu yağlar gibi sınıflandırılırlar. Sarımsak yağı içerdiği eugaonol ile karakterize edilir. Eugaonol hem bakterilere hem de funguslara karşı aktivite gösterir [71].

Salvia türlerinde fenolik asitlerin çoğu kafeik asit türevleridir. Kafeik asit metabolitleri, kafeik asit monomer, dimer, trimer, tetramer ve kafeik asit oligomerleridir. *Salvia* türlerinde en sık rastlanan kafeik asit monomerleri ferrulik asit, izoferrulik asit, klorojenik asit gibi asitlerdir. Kafeik asit dimerleri ise salvinolik asit A, salvonolik asit S, litospermat ve rosmanirik asittir.

Rosmarinik asit *Salvia* türlerinde en sık rastlanan kafeik asit dimerleridir. Bitkiye yüksek antioksidan özellik kazandıran major fenolik bileşiklerdir. Adenilat siklaz inhibisyonu, antioksidatif etki ve böbrek hücreleri üzerinde koruyucu etki gibi bazı biyolojik etkilerden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur [72].

1.5.1.2 Kinonlar

Kinonlar iki keton uzantısı olan aromatik bir halkaya sahiptir. Karakteristik özellikleri yüksek reaksiyona girme eğilimleridir ve doğada her yerde bulunur. Bu bileşenler, meyve yada sebzelerde kesilme yada yaralanma durumunda renk değişimine uğrayarak kahverengi renk alır ve aynı zamanda bu bileşen insan vücudundaki melanin oluşumu reaksiyonunda da rol alır. Difenol ve diketon arasında anahtar ilişkisi olup oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını meydana getirirler. Kendiliğinden indirgenme reaksiyonun bir parçası olan Kinon- hidrokinon çifti biyolojik birçok sistem için çok önemlidir. Koenzim Q(ubikinon) memelilerde elektron taşıma sisteminde yer alır. Vitamin K bir kompleks naftokinondur ve vitamin K'nın antihemorajik aktivitesinin vücut dokularının kolayca okside olması ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Bunlara ilaveten stabil serbest radikallerin elde edilmesinde kaynak olan kinonlar proteinlerdeki nükleofilik amino asitler ile dönüşümsüz kompleks oluştururlar. Bu durum genellikle proteinlerin yapısını bozar ve inaktive eder. Bu nedenden dolayı kinonların potansiyel antimikrobial aktivitesinin etkisi büyüktür. Olası hedef, mikrobial hücrenin hücre duvarı polipeptidleri ve membrana bağlı enzimleridir. Bütün bitkiler kendilerin mikroorganizmaların muhtemel toksik etkilerinden kinonların varlığı ile korumaktadırlar [73]. Kazmi ve ark. literatürde *Cassia italica*, olarak geçen Pakistan ağaçında antrakinon tespit etmişlerdir ki bu maddenin *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* ve *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas pseudomalliae* karşı etkili olduğu belirlenmiştir [74].

1.5.1.3. Flovonlar, Flavonoidler ve Flavonoller

Flavonlar bir karbonil gurubu içeren fenolik yapıdaki bileşenlerdir. 3-hidroksil gurubu içerenler ise flavonoldür. Flavonoidler ise hidroksillenmiş fenil bileşenleri içerirler ancak C₆-C₃ ünitelerine bağlı olarak aromatik halka biçimindedirler. Bu yapılarından kaynaklı bitkilerdeki mikrobiyal aktiviteye cevap oluştururlar. Dolayısıyla in-vitro şartlarda da geniş bir spektrumdaki mikroorganizmalara karşı etki gösterirler. Bu bileşenlerin de mikroorganizmalara etkisi kinonlarda açıklandığı gibi kompleks yapıdaki mikroorganizma hücre duvarına etki biçimindedir. Lipofilik yapıdaki birçok flavonoidler mikrobiyal membranın içine girebilmektedir. Kateksin flavonoid bileşenlerin C₃ biriminin azaltılmış halidir. Bu bileşenlerin in-vitro şartlarda *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* ve diğer bakteri ve organizmaları inhibe ettiği belirlenmiştir. Flavonoid bileşenlerin çok sayıdaki virüslere karşıda etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda HIV'e karşı etkili birçok flavonoid bildirilmiştir. Flavonoid bileşenlerinin yapısındaki değişimler bu bileşenlerin toksitesini artırmakta veya azaltmaktadır. Bitkideki tüm flavonoid bileşiklerin çok etkin olmaması bitkinin toksitesini azaltmakta ve günlük 1 gr karışık flavonoid içeren bitkilerin tüketimine imkan vermektedir. Bu konsantrasyon farmakolojik olarak etkili olup vücut açısından zararsızdır [75].

Yenilebilir flavonoidler son dönemde in-vitro ve in-vivo çalışmalarda insan sağlığında önemli rol oynayan birçok biyolojik yararları olduğuna dair yayınlar bulunmaktadır. Flavonoidler potansiyel antioksidantlar olup serbest radikalleri ortadan kaldıran, metal yakalayıcıdır. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu önler, anti-inflammatuar, antikanserojenik, antiartik ve antimikrobiyal aktivite gösterir. Epidomolojik çalışmalara göre flavonoid içeren besinlerin tüketilmesi kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi kronik rahatsızlıkların riskini azaltmaktadır [75].

1.5.2. Taninler

Tanin genel olarak bitki polimerik fenolü olarak bilinir ve bulunduğu tüm bitkilere buruk bir tat katarken proteinlere bağlanır ve onları çökertir. Bu madde her bitkinin gövdesinin kabuğunda, odunda, yapraklarında, meyvesinde ve köklerinde bulunur. Hidrolizleşebilen ve yoğunlaştırılan taninler olmak üzere iki gruba ayrılır. Hidrolizleşebilen taninlerin başında gallik asit yer alır ve genel olarak D-glikozun çok sayıda esterleşmiş olarak bilinir. Yoğunlaştırılabilen tanin ise flavonoid monomerlerinden türemiştir. Taninler, fagositik hücrelerin düzenlenmesi, tümörlü hücrelerin düzenlenmesi gibi durumlarda kullanılmaktadır. Taninler proteinlerle spesifik olmayan bağlanma (hidrojen bağları ve hidrofobik etki) ile bağlanır ve böylece bir kompleks oluştururlar. Bu özeliği tanine antimikrobiale aktivite kazandırmaktadır [75].

1.5.3. Kumarinler

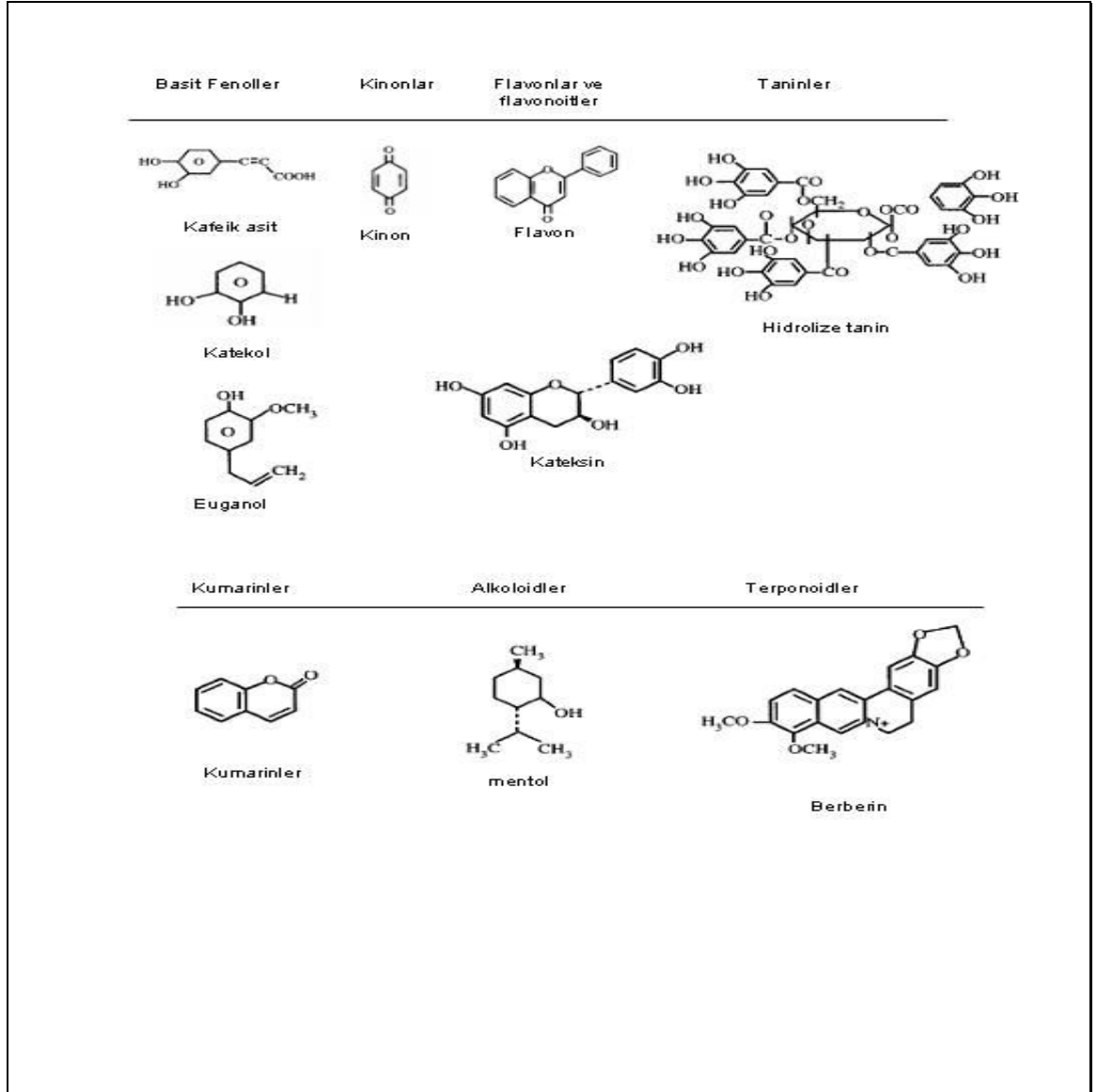
Kumarinler fenolik bileşenler olup benzen ve piron halkalarının birleşmesinden bir araya gelmişlerdir. Ot kokusunu ile karakterize edilir. Anitrombotik, anti-inflammatuar ve damar genişletici olarak kullanılır. Warfarin en fazla bilinen kumarindir ve antikoagülant olarak kullanılır. Kumarinlerle yapılan son dönem araştırmalarda *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra havuçta üretilen hidrolizleşmiş kumarinden türetilen fitolaksin fungal enfeksiyonlara cevap olduğu ve antifungal aktiviteyi artırdığı belirlenmiştir [76].

1.5.4. Uçucu Yağlar ve Terpenoidler

Bu maddelerden biri olan esanslar, esas itibariyle terpenlerden oluşmuş karışımlardır. Oda sıcaklığında sıvı, bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Su buharı ile sürüklenir, suda

çözünmez, organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. Özellikle çiçek ve meyvelerde bulunmakla beraber bitkinin diğer organlarından da elde edilebilirler. Bu amaçla su buharı distilasyonu veya organik çözücüler ile ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu bileşenler izopropan yapısına yakındır ve terpen olarak ifade edilirler, yapısal formülleri $C_{10}H_{16}$ 'dır. Bunlardan diterpenler, triterpenler ve tetra terpenler (C_{20} , C_{30} , ve C_{40}), meydana gelir. Bunun yanı sıra hemiterpenler(C_5) ve seskiterpenlerde(C_{15}) vardır. Bu bileşenlere oksijen eklendiğinde ise terpenoid adını alırlar. Örneğin metanol ve kamphor ve farnesol ve günümüzde antimalaryal olarak kullanılan artemisin terpenoid yapısındadır. Terpenler ve terpenoidler bakterilere karşı funguslara, virüslere ve protozoalara karşı aktivite gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir.1977 de yayınlandığına göre elde edilen uçucu yağların %60 nın fungusları inhibe ederken %30'nunda bakterileri inhibe ettiği bildirilmiştir [77]. Terpenlerin tam etki mekanizması anlaşılammakla beraber lipofilik yapıları ile membran içerisine girerek etkili oldukları düşünülüyor [78].

Şekil 1.1 Antimikrobiyal Özellik Taşıyan Temel Bileşenleri [73]



1.8 Şifalı Bitkilerin Antifungal Aktivitesi

Funguslar ökaryotik canlılar olup protein ve nükleik asit sentezi mekanizmaları gelişmiş hayvanlarla benzerlik gösterir. Bu durumda insanlara zarar vermeyen fungal inhibitör içiren bileşenler bulmak çok zor bir hal almaktadır. Özellikle Dermaphyta grubu yüksek antibiyotik direnci gösteren bir gruptur. Bu alanda etkili ve güvenli antifungal ajanların eksikliği dikkat çekmektedir [79].

Küfler her türlü doğal ortamda buluna bilen fırsatçı ajanlardır. Farklı koloniler oluşturup yiyeceklerin içerisinde yer alırlar. Güçlü hidrolitik enzim olan arsenelden dolayı bu organizmalar yiyeceklerin içinde yada üzerinde olduklarında yüksek denatrasyonlara ve ciddi ekonomik kayıplara neden olurlar. Buna ilavetene bu organizmalar aynı zamanda metabolit olarak potansiyel toksik üreticilerdir. Bu toksik maddeler tüketici sağlığına zararlı olup bu maddelere mikotoksin denir. Gıdaların mikotoksinlerle kontamine olması insanlarda ve hayvanlarda gıda kaynaklı mikotoksikozlara neden olmaktadır [80]. Potansiyel mikotoksin üretme kapasitesine sahip fungal türler ılımlı iklim zonlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Funguslar ile kontamine olmuş tahılların, mikotoksinlerle kirletilmesi insan ve hayvanlarda gıda ve yemlere dayalı mikotoksin alımı nedeniyle sağlık riskleri oluşturmaktadır.

Aflatoksinler furanokumarinlerden türevlenmiş polipeptidlerdir. Bu metabolitler zirai ürünler üzerinde başlıca *A.flavus*, *A. parasiticus* tarafından üretilmektedir [81]

A. ochraceus ve *Aspergillus niger* potansiyel okratoksin-A üreticileridir [82]. İlk olarak Van der Merwe ve ark. (1965) tarafından *Aspergillus ochraceus* kültüründen izole edilmiş bir sekonder metabolittir. Okratoksinin dünya çapında ilgi çekmesinin nedeni nefrotoksik özellikle olmasıdır. Kahve çekirdeklerinin kirlenmesi özellikle önemlidir. Çünkü OA fırınlama ile tamamen azaltılamamaktadır. Okratoksin-A'nın teratojenik, karsinojenik, genotoksik, immunosupresyon, mutajenik, v.b. gibi çeşitli biyolojik etkileri bilinmektedir [83-86].

Fumonisinler 1988 de keşfedilmesine rağmen toksikolojisi üzerindeki bilgiler henüz oldukça azdır. *F. proliferatum* mısırlarda fumonisin B1 üretebilmektedir. Fumonisin B1'in insanlarda özofagus kanserleri [87] riskini arttırdığı, ayrıca, domuzlar ve kümes hayvanlarında toksik olduğu ve atlarda öldürücü atlarda ELEM (equine lekoensefalomasia) hastalığına neden

olduğu, farelerde hepatosellüler karsinomaya neden olduğunu [88] bilinmektedir.

Kilinkilerde kullanılan birçok antibiyotik mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bitkisel kökenli antibiyotiklerle ilgili son 20 yıl boyunca yapılan çalışmalar sonucunda dünyadaki bitki türlerinin çok az bir kısmında bulunan antifungal bileşenler ortaya çıkarılmıştır. Antifungal ajanların çevresel olarak korunması ve yenilerin geliştirilmesi için potansiyeli belli bu değerli kaynakları kaybetmekten kaçınarak bitkilerin toplanması ve incelemesi için çok fazla çaba harcamak gerekir [89].

Kimyasal fungusidler kullanımı gün getikce çevresel düzenlemeler ve sık rastlanan sağlık sorunlarına ışık tutma konusunda popülaritesini günde güne kaybetmektedir. Bu durumda doğal ve yeni fungusit kaynaklarının araştırılmasını zorunlu kılmıştır [90]. Son yıllarda doğal kaynaklardan elde edilen kimyasalların kullanımı, doğal fungusitler üzerine olan araştırmaları artırmış ve bu araştırmalar sonucunda bir çok etkili doğal fungusit belirlenmiştir [91]. Dermal ve mukozal insan enfeksiyonları son 30 yıl içerisinde tehlikeli bir boyutta artmıştır. Bu artışın temel nedeni kemoterapi uygulanan kanserli hastalar ve organ nakli yapılan hastalarda tedavide kullanılan ilaçlara karşı bağışıklık geliştiren birey sayısının popülasyonda artış göstermesidir. Özellikle HIV pozitif hastalar çoğunlukla antifungal olarak kullanılan flucunazole karşı direnç geliştirir [92]. Birkaç istisna dışında insan ve hayvanlarda hastalığa sebebi olan patojen funguslar aynıdır. İnsan ve hayvanda hastalık yapan funguslar için kullanılan tedaviler, çeşitli yan etkilerin oluşmasından, direnç gelişmesinden dolayı yeteri kadar etkili değildir. Bu konudaki ortak karar bu dezavantajlardan uzak yeni antifungal maddelerin geliştirilmesi yönündedir [93]. Farklı antifungal ajanlar üzerine yoğun bir çalışma mevcut olmasına rağmen etkili antifungal ilaç sayısı sınırlıdır. Kullanılan bir çok ilaç da toksik etki yada yan etki gösterebilmektedir. Bu etkiler göze alındığında elde edilebilecek antifungal ajan kaynaklarının sınırlı olduğu görülmektedir. Bütün bunlar fungus hücrelerinde farklı hedef bölgelerde aktivite gösteren antifungal ajanlar için

yeni kaynaklar bulunması gerekliliğini ortaya koymaktadır [94]. Bazı bitkilerin bileşenlerinin mikrobiyal büyümeyi önlediği kanıtlanmıştır. Bu bitki bileşenleri yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal maddelerle kıyaslandığında da farklı yapılara ve farklı etkiye sahiptir [89].

1.9.Şifalı Bitkilerin Antibakterial Aktivitesi

Bitkilerin antimikrobiyal özellikleri onların sekonder metabolitleri çeşitli kimyasal bileşenlerinin birlikte olan etkisidir. Antimikrobiyal etki gösteren kimyasallar genel olarak alkaloidler, flavonoidler, isoflavonoidler, taninler, kumarinler, glikosidler, terpenler, fenilpropeneler, ve organik asitlerdir. Geniş spektrumlu ve ayrımı tam olarak yapılamamış kimyasal koruyucuların kullanılması dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına ve bu durumda yiyecek zehirlenmelerine neden olmaktadır. Bunlardan dolayı yeni antimikrobiyal ajanlar arayışı günümüzde daha fazla artmıştır [95]. Gıda zehirlenmesi gelişmiş ülkelerde bile yüksek bir oranda olup hala temel sorunlardandır. Yalnızca Amerika da 81 milyon kişinin 6'da biri gıda zehirlenmesi ne uğramakta bunlardan senede 9.000'ni ölmektedir. *Salmonella* türleri, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni* zehirlenmeye neden olan temel patojenlerdir. Aslında, gıda zehirlenmesi hem müşteriyi hem de yiyecek endüstrisini kullanılan koruyucu maddeler bakımından yakından ilgilendirmektedir. Bu yüzden gıda zehirlenmelerine yol açan nedenleri azaltan etkili ve yeni teknolojilere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddeler gıda korumasındaki seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Asırlardır 'entiritis' içeren çeşitli hastalıkların iyileştirilmesi için bitkisel tıpta yerli bitkiler kullanılmıştır. Sarımsak, tarçın, hardal, zencefil ekstratları ve diğer otlar antimikrobiyal özellikler gösterir. Ayrıca bir çok aromatik bitkinin uçucu yağları, örneğin Labiatae familyasına ait bitkilerin bir çoğunun bu özellikte olup antimikrobiyal aktivite gösterdiği çeşitli yayınlarda belirtilmiştir. Örneğin defne, karanfil, kekik ve biberiyeden elde edilen yağların

L.monocytogenes'e karşı ve diğer patojenlere karşı aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [96].

Bitkiler bir çok enfeksiyon hastalığının tedavisinde bitkisel tedavi edici olarak çok uzun yıllardır ve halen günümüzde kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde birincil sağlık sorunlarının tedavisinde bitkiler etkili bir rol oynar. Biyolojik olarak aktif ekstratlar üzerine yapılan çalışmalar ölümcül fırsatçı ajanların meydana gelmesi ve birçok antibiyotiğe karşı mikrobial direnç göstermelerinden dolayı geleneksel bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır [97].

Geleneksel bitkilerin kullanımı ile ilgili araştırmacılar yalnızca bu bitkilerin bilimsel kullanım yüzdesini belirleme üzerine değil aynı zamanda içerdikleri farmakolojik bileşenleri de tespit etmeyi amaçlamaktadırlar. Tıbbi kullanılabilirliği olan hedef bitkiler, bilim adamlarının bilgisi ile geleneksel kullanımındaki bilgilerin bir araya getirilmesi ile rasgele uygulanan prosedürlerden dolayı meydana gelen gereksiz deneme ve yanlış kullanımlar son bulabilir. Şimdiden 94 bitki türünden etnobotanik alanında 122 ilaç keşfedilmiştir. Biyolojik aktiviteyi tespit etmek için çeşitli uygulamalar mevcuttur. Bu uygulamalar Öncelikle in-vitro şartlarda daha sonra doğal ürünlerdeki tepkisi in-vivo koşullarda değerlendirilir. Kaba yada parçalı ekstralar ve bazen antibakterial, anti-inflammatuvar, antioksidant, antihelmintik ,anti-amoebik, anthistosomal ve antimalariyal aktivite bunun yanı sıra piskotropik ve neotropik özellikler içeren bileşenleri bulduklarını rapor edilmiştir [98].

İn-vitro şartlardaki biyolojik aktivite testleri için standart ilaç, çalışmanın etkin olabilmesi için belli bir testte kullanılması gereklidir. Ekstratın aktivitesi belirlenirken farklı uygulamalar karşılaştırılmalıdır. Kaba ekstratın çok sayıda bileşen içermesinden dolayı belkide sinerjit aktivite göstereceğinden bu karşılaştırma yalnızca saf standartlarla yapılmamalıdır. Dünyanın farklı bölgelerinde, farklı bitki ekstratları üzerine çok sayıda antimikrobial çalışma mevcuttur. Bölgesel etki ve patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç dolayısıyla bitkilerden elde edilen ekstratlardaki

biyolojik olarak aktif bileşenlerin tespit edilip sonrasında saflaştırılan bu moleküllerin bitkisel tıptaki kullanımı önemlidir[99].

1.10 Şifalı Bitkilerin Tüberküloz Tedavisindeki Yeri

Tüberküloz 21.yüzyılın hala ciddi sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Her yıl yaklaşık 8 milyon kişi bu sağlık sorunu ile karşılaşmakta ve bunlardan 2-3 milyonu ölümlle sonuçlanmaktadır [100]. Tüberküloz ülkemizde ve dünyada morbidite ve mortalite açısından hala önemini korumaktadır. Yapılan çalışmalarla, 2020 arasında içerisinde bir milyon insanın enfekte olacağı bunlardan 200 milyonu hasta olurken 70 milyonunun tüberkülozdan öleceği tahmin edilmektedir [56]. Bunun yanı sıra bu sayıdaki artışın en büyük nedeni global HIV epidemileri ve bizde olduğu gibi tüberküloz prevalansının yüksek olduğu bir çok gelişmekte olan ülkede, tedaviye yönelik uygulamalardaki çeşitli hata ve aksaklıkların birden fazla ilaca karşı direnç gelişmesine neden olmasıdır [101]. Ayrıca bizim gibi gelişmekte olan ülkelerin sağlık programlarında tüberkülozun tedavi ve kontrolüne verilen önem azalmış ve gelişmiş ülkelerde de tüberküloz için halk sağlığı ve klinik hizmetler konusunda alınan kararlarda azalma olmuştur. Tüberküloz teşhisinde uygulanan yöntemlerin çabuk ve hızlı olması önemlidir. *M. tuberculosis* teşhisinde kullanılan yöntemler; Kültür temel bir yöntem olup, mikroorganizmanın geç gelişmesinden dolayı 3 haftadan önce sonuç alma imkanı bulunmayan bir yöntemdir. Bir diğer yöntem moleküler tanı yöntemi olup, mikroorganizmanın yapısının karışıklığı uygulamayı zorlaştırırken bunun yanı sıra pahalıdır. BACTEC MGIT Yöntemi ile mikroorganizmanın üremesinin tayininde 4ml MGIT besiyeri içeren tüpler kullanılır. İn-vitro oksijen üretimine bağlı floresans tayin tekniği ile 7-12 gün içerisinde *Mycobacterium* 365nm dalga boyunda UV reader ile okunarak belirlenir [102].

Newton ve arkadaşları tarafından 2000 yılında 350 doğal ürünün antimikobakteriyal aktivite gösterdiği yayınlanmıştır [100]. Bazı bileşenler örneğin, alkaloidler [103, 104], flavonoidler [105] yada diğer terpenoidlerin [101] antimikobakteriyal aktivite gösterdiği literatürde bildirilmiştir. Bu anlamda tıbbi bitkiler orijinal aktif ilaçlar yada yeni etkili ajanlar konusunda çok önemli kaynaktır.

Günümüzdeki çalışmalar aromatik bitkilerden M.T.B karşı bu etkin olan bileşenleri tespit etme üzerine yoğunlaşmıştır. Bitkilerden oksidatif stres sonucu elde edilen uçucu yağlar biyolojik olarak bulunmasını sağlayan δGI değerini düşürdüğü radiometrik olarak tespit edilmiştir [106].

Aromatik nor-abietane diterpen, multikaulin, multiorthokin, 2 dimetilmultiortokin gibi antitüberküloz ajanları olan bu terpenoidler Ulubelen ve arkadaşları tarafından (2005) *Salvia multicaulis* ve *Salvia blepharochlaena* köklerinden elde edilmiştir. [107]

Literatür taraması sonucunda mono, di ve triterpenlerle yapılan antitüberküloz aktivite çalışmalarının yok denecek kadar az olduğu buna karşılık yapılan birkaç çalışmada ekstrelerin yüksek derecelere varabilen antitüberküloz aktivitesi gösterdiği görülmüştür [108]. Tüberküloz, *M. tuberculosis* complex olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip kronik, nekroz yapan bir enfeksiyondur. Hastalığın oluşumundan %97–99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. 1882 yılında etkenin (*M. tuberculosis*) bulunmasına, 1921 yılında bir aşının geliştirilmesine ve 1950'li yılların ortalarından beri etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına karşın tüberküloz, tüm dünyada, özellikle de yoksul ülkelerde, önemli bir sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. İmmün-düşkün olmayan konakta tüberküloz enfeksiyonu sonrası yaşam boyu aktif tüberküloz gelişme riski %5–15 iken HIV enfeksiyonlularda en az %30 ve yılda %7-10'dur. ABD'de yeni tanımlanan tüberküloz hastalarının %20-29'unda HIV pozitifliği saptanmaktadır. HIV enfeksiyonlu kişilerde tüberkülozun seyri de oldukça farklıdır. Antibiyotiğe karşı direnç gösteren

ırkların ortaya çıkması üzerine tüberküloz tedavisinde acil olarak mikobakteri direncine karşı etkili yeni farklı bir ilaç geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır [109].

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanışı

Tıbbi bitkiler drog olarak kullanıldıkları taktirde etken maddenin miktarı, bitki materyalinin toplama zamanı ve saklama koşullarına bağlıdır. Bu etken maddelerin etkili olduğu dönem her bitki için farklıdır. Bu da her bitki için özel bir toplama, saklama zamanı olduğunu gösterir [47].

2.1.1 Gölgede Kurutma

Bitkisel materyal üzeri kapalı yanları açık hangarlar içinde kurutulur. Ve bunlar tabaka halinde yere ya da raflara serilerek küflenmelerini önlemek için sık sık alt üst edilir [47].

2.1.2 Saklama

Bitkisel droglar için plastik poşetler kısa zamanda küflenmeye neden olacağından uygun değildir. Daha çok kese kağıdı, mukavva, kutu yada cam içerisinde saklanırsa bir yıl boyunca muhafaza edilebilir [45].

Araştırmamızda *Salvia* cinsine ait farklı lokalitelerden toplanan *Salvia crypthanta* Bilkent / Ankara *Salvia pomifera* Kuşadası mevkinden Haziran ayı içerisinde toplanmış ve toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Toplanan bitki örnekleri gölgede ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

2.2 Ekstrelerinin Hazırlanışı

Araştırmada kullanılan bitkiler tartıldıktan sonra etanol ve metanol ekstralarında belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

2.2.1 Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı

Kurutulmuş ve ufalanmış bitki yaprakları ve dallarından oluşan materyal 150g olacak şekilde tartıldıktan sonra içinde 1lt (%80) metanol bulunan Soxhlet ekstretörünün içinde çözücünün kaynama sıcaklığını geçmeyecek şekilde [38] ayarlanıp 72 saat boyunca işleme tabii tutuldu. Whatman filtre kağıdı no: 1 kullanılarak süzülen ekstre, konsantre hale getirmek için kurutma dolabında 40 °C 2 gün süresince tutulup kalan metanolün buharlaşması sağlandı. 5 ml %5 lik DMSO (dimetilsülfooksit) içerisinde 0.5 g ekstre tartılarak son konsantrasyon 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bu stoktan 2 ml alınarak 0.22 µl 'lik mebran filtreden geçirilerek steril stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok ekstre hemen yada daha sonra kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.

2.2.2 Etanol Ekstresinin Hazırlanışı

Kurutulmuş ve ufalanmış bitki yaprakları ve dallarından oluşan materyal 150 g olacak şekilde tartıldıktan sonra içinde 1lt %80'lik etanol bulunan Soxhlet ekstretörünün içinde çözücünün kaynama sıcaklığını geçmeyecek şekilde [38] ayarlanıp 72 saat boyunca işleme tabii tutuldu. Whatman filtre kağıdı kullanılarak süzülen ekstrat, konsantre hale getirmek için kurutma dolabında 40 °C de 2 gün süresince tutulup kalan metanolün buharlaşması sağlandı. 5 ml DMSO (dimetilsülfooksit) içerisinde 0.5 g ekstre tartılarak son konsantrasyon 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bu stoktan 2 ml alınarak 0.22 µl'lik mebran filtreden geçirilerek steril stok elde

edildi. Elde edilen stok ekstre hemen yada daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

2.2.3 Farklı Konsantrasyondaki Ekstre Çözeltilerin Hazırlanışı

Ağırlığı bilinen ve 0,5 g olarak tartılan kaba ekstreler üzerine 5 ml DMSO eklendi. Çözgenin ekstrelere tam etkili olabilmesi için vorteks de 10 dakika boyunca karıştırıldı. 30°C' e ayarlanmış etüvde 15 dakika bekletildikten sonra tekrar vorteks ile karıştırıldı. Bu işlem ekstreler tamamen çözülmüncye kadar devam etti. 0.22 mikrometre çapındaki şırınga filtresinden gerekli olan miktar ekstre geçirildi. Çapı 6 mm olan disklere emdirilmek üzere *S. pomifera*'nın metanol ekstratınının 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml'lik konsantrasyonları; *S. cryptantha*'nın metanol ekstratı ise 100 mg/ml ve 20 mg/ml olarak hazırlandı. *S. pomifera* ve *S. cryptantha*'nın etanol ekstreleri ise 100 mg/ml, 20 mg/ml olarak hazırlandı.

2.3 Uçucu Yağın Hazırlanışı

2.3.1 Hidrodistilasyon

Küçük parçalara ayrılan bitki örneklerinden 100 gr örnek alınarak 500 ml'lik balona alınmış ve üzerine 300 ml su ilave edilerek birkaç tane de kaynama taşı atılarak balon elektrikli ısıtıcıya yerleştirilmiştir. Balonun ağzına soğutucu bağlı Klevenger aparatı bağlanarak cihazın büret kısmında uçucu yağ miktarında değişim olmayıncaya kadar 4-5 saat süre ile ısıtılmıştır. Bu şekilde bitkilerin uçucu yağları elde edilmiştir. Şekil 2.1'de Clevenger aparatı görülmektedir.



Şekil 2.1: Klevenger Aparatı

2.4 Kullanılan Mikroorganizmalar

Escherichia.coli (ATCC 11230), *Bacillus cereus* (CCM 99), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Klebsiella pneumoniae* (CCM 2318), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (6538P), olmak üzere altı çeşit bakteri ve *Candida albicans*.(ATCC 10239) maya örneği olarak kullanıldı. Stok kültürler Müller Hinton Agar (MHA) içeren yatık agarlara hazırlanarak, +4°C' de saklandı.

Çalışmamızda aynı zamanda patojen funguslar olan, *Aspergillus ochraceus* K.Wilhelm (MUC 39534) *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus niger* V. Tiegham (TA 47-3), *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg (teleo. *Gibberella intermedia*) (TA 18-2)'da kullanıldı. Bu standart ırklar Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edildi. Stok kültürler için Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

İn-vitro koşullarda antibakterial aktivite belirlemesi MHA, MHB kullanılarak, antifungal aktivite tayin ise SDA ve SDB kullanılarak yapıldı.

2.5 İnokulum Hazırlanışı

İnokulum antibakterial, antifungal, ve antitüberküloz aktivite için hazırlandı.

2.5.1 Fungal İzolatlar

Bir haftalık kültürden seçilen funguslar belli miktar serum fizyolojiğın içerisinde sporları tam dağılacak şekilde iyice ezildi ve vortekste homojen oluncaya kadar karıştırıldı. Fungus süspansiyonu McFarland 0.5 indeksine göre UV spektroda 400nm dalga boyunda absorbands 0.400-0.450 olacak şekilde ayarlandı.

2.5.2 Bakteri ve Maya İzolatları

Bakteriler ve mayanın 24 saatlik kültürlerinden 2 ml serum fizyolojik ile karıştırıldı. Yoğunluğu McFarland 0.5 indeksine göre ayarlandı. Daha sonra yoğunluğu 10^6 koloni olarak hazırlamak için 2 ml serum fizyolojiğın içersine McFarland'a göre standart edilmiş inokulumdan 20 µl aktarıldı.

2.6 Methanol ve Etanol Ekstrelerinin Antibakterial Aktivitelerinin Tayini

Çalışmada kullanılan methanol ve etanol ekstralarının antibakterial aktivitesini belirlemek için uluslararası klinik laboratuvarı komitesinin belirlediğı standartlara [56] göre disk difuzyon metoduyla belirlendi.

2.6.1 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibakterial Aktivitenin Belirlenmesi

Yirmi dört saatlik taze bakteri kültüründen McFarland 0.5 indeksine göre hazırlanan bakteri süspansiyonun 20 µl porsiyonu MHA üzerine yayıldı. 15 dakika çözeltiyi emmesi için bırakıldı. Sonra üzerine 6 mm çapında steril diskler yerleştirildi. Disklerin üzerine 20 µl, şırıngalı filtre ile steril edilmiş ekstraların farklı konsantrasyonları emdirildi. Standart ilaç olarak Ciproflaksin antibiyotik diski kullanıldı. 24 saat 35 °C de bekletildikten sonra zon çapları ölçüldü. Zon çapları kontrol değerleri ile karşılaştırıldı. Tüm çalışma iki paralelli olarak hazırlandı.

2.6.2 Tüp Dilüsyon Yöntemiyle Bakteri ve Mayada MİK Belirlenmesi

Her iki bitki içinde metanol ve etanol ekstralarının tüp dilüsyon yöntemiyle MİK, MBC değerleri belirlendi. Tüplere 2 ml serum fizyolojik konulup 0,5 McFarland indeksine göre bakteri süspansiyonu hazırlandı. 10⁶ koloni hazırlamak için serum fizyolojinin içersine bakteri süspansiyonundan 2 ml 20 µl aktarıldı. Her bir tüpe standart miktarda olarak 500 µl besiyeri konuldu. 100 mg/ml olarak hazırlanan ekstralardan ilk tüpe 500 µl konuldu. *Salvia pomifera* ve *Salvia cryptantha* için bir önceki disk difüzyon işleminde bakteri ve mayalardan elde edilen sonuçların ışığında her seferinde iki kat dilüsyon olmak üzere 50 mg/ml- 3,125 mg/ml' lik seri dilüsyon hazırlandı. Negatif (-) kontrol için 500 µl ekstre, pozitif (+) kontrol için DMSO 500 µl, ve her bir tüpe 20 µl bakteri süspansiyonu ilave edildi. 35C° 24 saatlik sonuçlar, belirlendi. Üreme çözeltideki bulanıklığa göre belirlendi. Üremenin olmadığı konsantrasyon minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) olarak tespit edildi.

2.6.3 MBK'nin Belirlenmesi

MIK değerleri belirlendikten sonra üremenin olmadığı tüplerdeki karışımlardan MHA içeren besiyerine 20 µl porsiyon yayıldı. Ekim yapıldıktan 35°C 24 saatlik sonuçlar sonrasında minimum bakteriyel konsantrasyon MBK olarak belirlendi.

2.7 Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivitesinin Belirlenmesi

Metanol ve etanol ekstralarının antifungal aktivitelerini belirlemek için Uluslararası klinik laboratuvarı komitesinin belirlediği standartlara [56] göre disk difüzyon metodu uygulandı. Fungusların renkli olmalarından dolayı fungus inokulumları 450nm dalga boyunda, absorpsiyonu 0.45 olacak biçimde ayarlandı.

2.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antifungal Aktivite Tayini

Bir haftalık stok fungusdan alınarak 450 nm dalga boyunda absorpsiyonu 0,45 olacak şekilde hazırlanan fungus süspansiyonundan 20 µl alınarak içerisinde 20 ml SDA bulunan 9 cm çapındaki petrilere yayıldı. İnokulum içeren petrilere üç tane 6 mm çapındaki boş disk konuldu. 6 mm çapındaki boş antibiyogram disklerine konsantrasyonları sırasıyla 100 mg/ml ve 20 mg/ml olacak şekilde hazırlanan etanol ve metanol ekstralarında 20 µl emdirildi. 48-72 saat 25°C'de bekletildikten sonra zon çapları ölçüldü. Aktif konsantrasyonda zon çapı 6mm den büyük olarak gözlemlendi. Tüm çalışma iki kez tekrarlandı.

2.7.2 Broth Mikrodilasyon Yöntemiyle Funguslarda MIK Belirlenmesi

Uluslararası klinik laboratuvarı komitesinin belirlediği standartlara göre mikrodilasyon yöntemi uygulanmıştır [110]. Sonuçların değerlendirilmesi plaka okuyucu UV spektrofotometrede yapılmıştır. Tüm kuyucuklara 100 µl SDB konuldu. Fungus inokulumları 450 nm dalga boyunda, absorbansı 0.45 olacak biçimde ayarlandı. Negatif (-) kontrol için 100 µl stok çözelti pozitif (+) kontrol için 100 µl DMSO ve 10 µl fungus süspansiyonundan ilave edildi. İlk kuyucuğa 100 µl, 100 mg/ml olarak hazırlanan metanol ekstresi konuldu. 50 mg/ml- 3.125 mg/ml kadar iki kat seri dilusyon halinde hazırlandı. Her birine 10 µl fungus süspansiyonu ilave edildi. Ekimin yapıldığı gün birinci gün olarak kabul edildi. 48-72 saat 25°C'de inkubasyona bırakıldı. 3.gün sonuna kadar her gün plaka okuyan UV spektrofotometrede 600nm'de her bir örnek için 3 kez okuma yapıldı. Standart sapmaları hesaplanarak absorbansı düşük olan örneklerde antifungal aktivite tespit edildi.

2.7.3 MFK'nin Belirlenmesi

MIK değerleri belirlendikten sonra üremenin olmadığı tüpteki çözülden SDA içeren besiyerine 20 µl porsiyon yayıldı. Ekim yapıldıktan 25°C 48-72 saatlik inkubasyon sonrasında minimum bakterisidal konsantrasyon MFK olarak belirlendi.

2.8 HPLC Analizi ve Koşulları

Çalışmamızda HPLC analizi kullanarak metanol ekstresini bileşenlerini belirledik. Dedektör:olarak DAD dedektör ($\lambda_{max}=278$), örnekleyici; SIL-10AD vp; Sistem kontrol ediciler: SCL-10Avp; pompa: LC-10ADvp; degazır; DGU 14A; kolon kazanı; CTO-10Avp; Kolon, 5µ ODS (2) (250x4,60 mm) 54 micron; hareketli faz,: A: %3 asetik asit; B: metanol; Akış Hızı : 0.8 mL / dakika ve kolon sıcaklığı : 30°C olacak şekilde analiz koşulları hazırlandı.

2.8.1. HPLC Analizi için Numune Hazırlama

Salvia pomifera ve *Salvia cryptantha*'nın metanol ekstratlarından 10 mg tartıldı. 1 ml metanolde çözülüp 20 mikrolitresi HPLC' ye enjekte edildi.

2.9 Uçucu Yağların Antibakterial Aktivite Tayini

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların miktarlarının az olmasından dolayı küçük hacimlerle 96 well plate de yapılan çalışmalarla antibakterial aktivite belirlendi. DMSO ile çözülen uçucu yağların son konsantrasyonları 100 µl/ml olarak hazırlandı. İçerisinde 100 µl MHB bulunan kuyucukların ilkinde 100 µl bu çözümden konuldu. İki kat seri dilüsyon olacak şekilde 50 µl-0,78 µl/ml yoğunluğa kadar çözelti hazırlandı. Bakteriler ve mayanın 24 saatlik kültürlerinden 2 ml serum fizyolojik ile karıştırıldı. Yoğunluğu McFarland 0.5 indeksine göre ayarlandı. Daha sonra yoğunluğu 10^6 koloni olarak hazırlamak için 2 ml serum fizyolojinin içersine McFarland'a göre standart edilmiş inokulumdan 20 µl aktarıldı. Negatif (-) kontrol için 100 µl stok çözelti, pozitif (+) kontrol için 100 µl DMSO ve her bir kuyucuğa 10 µl bakteri süspansiyonundan ilave edildi. Ekimin yapıldığı gün birinci gün olarak kabul edildi. 35C^o'de inkubasyona bırakıldı. Birinci gün ve 24 saatlik sonuçlar 600 nm dalga boyunda plaka okuyan UV de her bir örnek için 3 kez okutuldu.

2.9.1 Mikrodilüsyon Yöntemi ile MIK Belirlenmesi

Aktivite çalışmasının değerlendirilmesi sonucunda üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MIK olarak kaydedildi.

2.9.2 MBK'nin Belirlenmesi

MIK değerleri belirlendikten sonra üremenin olmadığı kuyucuktaki çözültiden MHA içeren besiyerine 20 µl porsiyon yayıldı. Ekim yapıldıktan sonra 35°C 24 saatlik inkubasyon sonrası sonuçlardan minimum üremenin olduğu konsantrasyon MBK olarak belirlendi.

2.10 Uçucu Yağların Antifungal Aktivite Tayini

Bir haftalık stok fungusdan alınarak 450 nm dalga boyunda absorbans 0,45 olacak şekilde hazırlandı. Her bir kuyucuğa standart olarak 100 µl SDA konuldu. İlk konsantrasyonu 100 µl/ml olacak şekilde hazırlanan çözültiden ilk kuyucuğa konuldu ve konsantrasyon 2 kat seri dilusyon olacak şekilde 100 µl besiyeri-çözülti karışımından bir sonraki kuyucuğa aktarıldı. Kalan fazla miktar ise atıldı. Kuyucukların her birine 10 µl fungus süspansiyonu eklendi. Negatif (-) kontrol için 100 µl stok çözülti pozitif (+) kontrol için 100 µl DMSO ve 10 µl fungus eklendi. Ekimin yapıldığı gün birinci gün olarak kabul edildi. 48-72 saat 25°C'de inkubasyona bırakıldı. 3.gün sonuna kadar her gün 96 well plate okuyan UV spektrofotometrede 600 nm'de her bir örnek için 3 kez okuma yapıldı.

2.10.1 Mikrodilusyon yöntemi ile MIK Belirlenmesi

Aktivite çalışmasının değerlendirilmesi sonucunda üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MIK olarak kaydedildi.

2.10.2. MFK'nın Belirlenmesi

MIK değerleri belirlendikten sonra üremenin olmadığı kuyucuktaki çözültiden SDA içeren besiyerine 20 µl porsiyon yayıldı. Ekim yapıldıktan

sonra 25°C 48-72 saatlik inkubasyon sonrası sonuçlardan minimum bakterisidal konsantrasyon MFK olarak belirlendi.

2.11 Uçucu Yağların Kalitatif ve Kantitatif Tayini

Elüsyon analizi, ekseriyetle gaz kromatografisinde tercih edilen gelişmiş bir metottur. Bu metot vasıtasıyla ayrılacak olan uçucu karışımın ufak bir numunesi kolonun ön ucuna gönderilir. Kolon belirli bir sıcaklıkta tutulur ve taşıyıcı gazın sabit bir akımı kolon içinden geçirilir. Taşıyıcı gaz elüentir, buhar veya gaz şeklinde olan karışım bileşenlerini kolon boyunca iletir. Burada bileşenler kolon içindeki sabit faz tarafından farklı sıcaklıklarda alıkonurlar; böylece aynı zamanda efektif iletme hızları fark eder. Sabit fazın her numune bileşenini tutmaya mütemayil olduğu kuvvetin şiddeti farklıdır. Bu kuvvetin bünyesi adsorpsiyon, çözünürlük, kimyasal bağ veya moleküler filtrasyon v.b. olabilir. Faz denge farklarından dolayı, numune bileşenleri kromatografik kolon boyunca hareket ederken, sabit ve hareketli faz arasında dağılarak birbirinden ayrılırlar. Her bileşen partiyon katsayısı K ya bağlı olan bir hızda hareket edecektir. Gaz kromatografisinden elde edilen çok az miktarda maddelerin yapısı hakkında bilgi edinmek için Kütle spektrometresi kullanılır. İki yöntemin birleştirilmesi doğal ve sentetik organik karışımlarda bileşenlerin yapı analizi için çok uygun bir yöntemdir.

2.12 GC/GC-MS

Her iki analizde kapiller kolon kullanılmıştır. Retansiyon zamanlarının standart bileşikleri standart uçucu yağların değerleri ile ve kütle spektrumlarından Wiley Library değerleri karşılaştırılması ile maddelerin teşhisi yapılmıştır. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC/MS) analiz koşulları çizelge 2.1 de verilmiştir. GC analiz koşulları; eş zamanlı olarak

GC/MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır (FID 300°C).

Çizelge 2.1 GC/MS Analiz Koşulları

Sistem	: Agilent 5975 GC-MSD sistemi
Kolon	: HP-Innowax Silika kapiler (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)
Sıcaklık Programı	: 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C ye
Enjektör	: 250°C
Taşıyıcı Gaz	: Helyum (0.8 ml/dak)
Split oranı	: 40:1
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle Aralığı	: <i>m/z</i> 35-450
Kütüphane	: BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams-LIBR (TP) Kütüphane tarama Yazılımları

2.13 Metanol ve Etanol Ekstrelerinin ve Uçucu Yağların Antimikobakteriyal Aktivite Tayinleri

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların ve ham ekstrelerin (metanol ve etanol ekstresi) her biri için antimikobakteriyal aktivite araştırıldı. Bu amaçla ön tarama ile aktivite gösteren örneklerin 100 mg/ml, 40 mg/ml, 20 mg/ml ve 10 mg/ml seri dilusyonları hazırlanarak iki paralelli olarak çalışıldı. Ve MİK değerleri saptandı. Aktivite denemelerinde oldukça duyarlı sonuçların saptanabilmesinde modern tetkiklerin kullanılması önem taşımaktadır. Aktivite testleri *in-vitro*, oksijen tüketimine bağlı flouresans tayini ile yapıldı [102].

2.14 İnvitro Oksijen Üretimine Bağlı Floresans Tayini Tekniği

Flüoresansa neden olan bileşik 16x100mm tüplerin dip kısmına gömülü olan silikon flüoresans özeliğindeki bir bileşiktir. Bu bileşik broth içerisinde bulunan çözülmüş oksijene karşı hassasiyet gösterir. İlk olarak çok fazla miktardaki çözülmüş oksijen bileşik tarafından emilir ve sonuçta ve sonuçta çok zayıf bir ışımaya belirir. Mikroorganizmaların aktif solunum yapması sonucunda oksijen tüketildiğinde 365 nm de UV transilluminatör ya da uzun dalga boylu UV ışığında (Wood'un lambası) flüoresansın gözlemlenmesine imkan sağlar. Büyümenin belirlenmesi homojen olmayan bir bulanıklıkla yada kültür besiyeri içinde küçük taneler yada parçalarla belirlenir [102].

Besiyeri içerisinde mycobacteria'nın büyümesini hızlandıracak bir takım maddeler içirmektedir. Oleik asit tuberkül basili için metabolizmasında çok önemli rol oynar ve yararlanır. Albümin rolü ise *Mycobacterium* türleri için toksik olabilen serbest yağ asitlerine bağlanarak ajanlardan korumaktır. Dekstroz ise bir tür enerji kaynağıdır. Toksik peroksidazları parçalamak için besiyeri katalazda içerir.

2.15 Besiyerinde Kullanılan Maddelerin Özellikleri

2.15.1 BBL MGIT 7H9 Broth'un İçeriği

Tüp 110 µl flüoresanslı belirleyici ve 4ml de broth içerir. İndikatör silikon içinde Tris 4, 7 - difenil-1,10-fenanthroline ruthenium chlorid pentahidrat bulunur. Tüpün içerisinde % 10'luk karbondioksit vardır. Tüpün ağzı sıkıca kapalıdır.

Yaklaşık formülü bir litre saf suda;

Modifiye edilmiş Middlebrook 7H9 Broth base 5.9 gr

Kasein pepton 1.25 gr

2.15.2 BBL MGIT OADC Zenginleştirici İçeriği

15 ml Middlebrook OADC zenginleştirici olup, yaklaşık formülü bir litre saf suda aşağıdaki şekildedir.

Bovin albumin 50.0 gr Katalaz 0.03 gr
Dekstroz.....20.0 gr Oleik asit 0.6 gr

2.15.3 BBL MGIT PANTA Antibiyotik İçeriği

Bir şişe de liyofilize olmuş halde antimikrobiyal ajan içerir.

Kullanmadan önce 3 ml steril distile yada deiyozine su ile karıştırılır.

Yaklaşık formül;

Polymyxin B 6,000 unite Trimethoprim ... 600 µg
Amphotericin B 600 µg Azlocillin 600 µg
Nalidixic acid2,400 µg

Pasaj yaparken başka mikroorganizmalarla kontaminasyonu engelleyen antibiyotik kokteyldir. Bu madde sadece pasajlarda kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite çalışmamızda, ekstrelerle herhangi bir etkileşime girmemesi için kullanılmadı.

2.15.4 Kullanılan Reaktiflerin Saklama Koşulları

BBL MGIT (Mycobacteria Growth İndikatör Tube) tüpleri 2 ila 25°C' de saklanmalı ama kesinlikle dondurulmamalıdır. Mümkün olduğunca az ışığa maruz kalmalıdır. Broth temiz ve renksiz olmalıdır, herhangi bir bulanıklık tespit edilirse kullanılmamalıdır. Üzerinde belirtilen Son kullanma tarihine kadar ekim yapılabilir. Ancak inkübasyon en fazla 8 haftadır.

BBL MGIT OADC kapalı bir yerde 2 ila 8°C. de saklanmalıdır. Donmamalı yada çok ısınmamalıdır. Kullanılacağı zaman açılmalıdır.

Mümkün oldukça ışık içermeyen bir yerde saklanmalıdır. BBL MGIT PANTA liyofilize halde vial şişelerde 2 ila 8°C' de saklanmalıdır.

2.16. Antimikobakterial Aktivite Tayini

MGIT içerisinde 4ml modifiye edilmiş Midllebrook 7H9 Broth Base bulundurur. Tüpün içerisinde dip kısmında oksijene duyarlı ve ışığa yapan silikon bulunur. Mikroorganizmanın üremesi ile var olan oksijen miktarı düşer ve bu durum 365nm de transilluminatör ile okutulur.

Becton Dickinson tarafından manuel çalışmak için hazırlanan hassasiyet testine göre her bir tüpe özel OADC (oleik asit, albumin, dekstroz,katalaz) zenginleştirici maddesinden 500 µl konuldu daha sonra aktivitesi belirlenecek maddeden 100 µl konuldu. Son konsantrasyon 1.5-0.012 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. İçlerine 100 µl seyreltilmiş mycobacterium konuldu. İnokulum aktarılmayan tüp negatif kontrol olarak belirlenirken pozitif kontrolün içinde ise sadece organizma ve OADC vardır. Başka bakterilerin üreyip üremediğini kontrol etmek amacı ile kanlı agara ekim yapıldı. Çünkü Kanlı agarda *mycobacterium tuberculosis* üreyemezken diğer bakteriler üremektedir. 37 C de inkübe edilir. Kontrol tüpü (+) olduğu gün 'gün 0' olarak kabul edildi ve takip eden iki gün için (gün 1 ve gün 2) okuma yapıldı. Üremenin (-) olduğu konsantrasyon MIK değeri olarak kabul edildi.

3. SONUÇ

3.1 Metanol ve Etanol Ekstresinin Antibakterial Aktivitesi

Çalışmamızda kullanılan *S. pomifera* ve *S. cryptantha* 'nın non-polar bir çözücü olan metanol ile çözülmesi sonrasında elde edilen ekstratların antibakterial aktiviteleri sırasıyla Çizelge 3.1 ve 3.2 de verilmiştir. Her iki bitkinin etanol ekstrelerinin aktiviteleri ile bilgi Çizelge 3.3 de verilmiştir. Pozitif kontrol için Ciproflaksin kullanılmıştır. Kullanılan diskler 6 mm çapındadır . Zon çapı ölçümü disk dahil olmak üzere yapılmıştır. *Candida albicans* için kontrol kullanılmamıştır.

Çizelge 3.1. *Salvia pomifera* metanol ekstresinin disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyal aktivitesi

İnhibisyon Zon Çapları(mm)				
Kullanılan Bakteriler	Methanol			Ciproflaksin
	10 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	
<i>Proteus vulgaris</i>	12.25±2.06	8.25±0.95	7.25±0.5	34.5±6.45
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0	0	37.5±1.75
<i>Bacillus cereus</i>	11±1,15	0	0	37.25±3.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	41.25±1.5
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	26.5 ±1.29
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.0±0.81	0	0	32±3.91
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	*

Çizelge 3.2. *Salvia cryptantha* Metanol ekstresinin disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyal aktivitesi

İnhibisyon Zon Çapları(mm)		
Kullanılan Bakteriler	Methanol 20 mg/ml	Ciprofloxacın
<i>Proteus vulgaris</i>	0	28.5±1.29
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	47.5±2.38
<i>Bacillus cereus</i>	9.25±0.95	44.0±0.81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	32.75±0.95
<i>Escherichia coli</i>	0	42.75±2.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.25±0.5	28.5±1.29
<i>Candida albicans</i>	0	*

Çizelge:3.3. *Salvia pomifera* ve *Salvia crypthanta* etanol ekstrlerinin disk difüzyon yöntemi ile antibakterial aktivitesi

İnhibisyon Zon Çapı (mm) (Disk difüzyon yöntemi ile etanol ekstresi antibakterial aktivite)						
Bakteriler	<i>Salvia pomifera</i>		Ciproflaksin	<i>Salvia cryptantha</i>		Ciproflaksin
	100 mg/ml	20 mg/ml		100 mg/ml	20 mg/ml	
<i>Proteus vulgaris</i>	12±1.63	0	47.5±2.38	13.75±0.5	9±0.86	34.5±4.20
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	0	30.25±2.75	0	0	33.25±2.75
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	34±1.82	14±2.30	9.5±0.57	32±1.82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	38.25±2.5	0	0	34.25±2.5
<i>Escherichia coli</i>	10.25±0.95	0	28.5±1.5	0	0	26.25±2.21
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	33.75±3.94	11±0.81	6.5±1.29	32.25±0.5
<i>Candida albicans</i>	0	0	*	0	0	*

3.2. Metanol ve Etanol Ekstresinin Bakteriler İçin MIK Tayini

Çalışmamızda MIK tayini için tüp dilusyon yöntemi kullandık. Disk difüzyonla yapılan tarama testi sonrasında 10 mg/ml-0,625 mg/ml kadar iki kat seri dilusyon hazırladık.

Negatif Kontrol: Besiyeri+ Ekstre,

Pozitif Kontrol, Besiyeri+ DMSO+ Bakteri süspansiyonu.

(+) : Aktivitenin olduğunu,

(-) : Aktivitenin olmadığını gösterir. İlgili veriler; Çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Çizelge: 3.4 *Salvia pomifera* ve *Salvia crypthanta* Metanol Ekstresinin Tüp Dilusyon Yöntemi İle MIK Tayini.

Bitkiler	Bakteriler	Konsantrasyonlar (mg/ml)						
		50	25	12,5	6,75	3,37	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol
<i>Salvia pomifera</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Salvia crypthanta</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	-	+
	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	-	+

Çizelge: 3.5 *Salvia pomifera* ve *Salvia crypthanta* Etanol Ekstrelerinin Tüp Dilusyon Yöntemi İle MIK Tayini.

BİTKİ	Bakteriler	Konsantrasyonlar (mg/ml)						
		50	25	12,5	6,75	3.37	Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol
<i>Salvia pomifera</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+	+		-	+
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+		-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+		-	+
<i>Salvia cryptantha</i>	<i>Proteus vulgaris</i>		-	+	+		-	+
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-		-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+		-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-		-	+
	<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+		-	+

Çizelge:3.6 *Salvia cryptantha* ve *Salvia pomifera* metanol ve etanol ekstralarının MIK ve MBK değerleri

	BAKTERİLER	MIK(mg/ml)	MBK(mg/ml)
		ETANOL	
<i>Salvia cryptantha</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	12,5	12,5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	25
	<i>Bacillus cereus</i>	25	25
		METANOL	
	<i>Proteus vulgaris</i>	25	25
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	50	50
	<i>Bacillus cereus</i>	12,5	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	12,5
<i>Salvia pomifera</i>		METANOL	
	<i>Proteus vulgaris</i>	6,75	6,75
	<i>Bacillus cereus</i>	12,5	12,5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,75	12,5
		ETANOL	
	<i>Proteus vulgaris</i>	25	25
	<i>E.coli</i>	50	50

3.3. Methanol ve Etanol Ekstrelerinin Antifungal Aktivitesi

Çalışmamız kullandığımız bitkilerin antifungal aktivitelerini disk difüzyon yöntemi ile belirledik. Kullandığımız fungusların süspansiyonları 450 nm de absorbansı 0.45 olacak şekilde UV spektrofotometrede ayarlandı. Kullanılan boş antibiyogram testlerinin çapları 6mm olup zon çapı ölçümü disk dahil olmak üzere yapılmıştır. Elde edilen veriler çizelge 3.4'de verilmiştir.

3.1. Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Funguslar İçin MİK ve MFK Tayini

Disk difüzyon ile yapılan ön tarama testlerinin verilerine dayanarak Fungusların MİK değerini belirlemek için Mikrodilution Broth Tekniği uygulanmıştır. Renkli sporlarından dolayı aktivite tayini 96 well plate okuyuculu spektrofotometrede 600 nm de absorbansı belirlenerek yapılmıştır.

Salvia pomifera'nın metanol ekstresinde çalıştığımız funguslara karşı bir aktivite gözlenmemiştir. *Salvia cryptantha*'nın etanol ekstresinde de benzeri durum gözlenmiştir.

Çizelge 3.7. *Salvia pomifera* ve *Salvia cryptantha* etanol ve metanol ekstrelerinin disk difüzyon yöntemi ile antifungal aktivitesi.

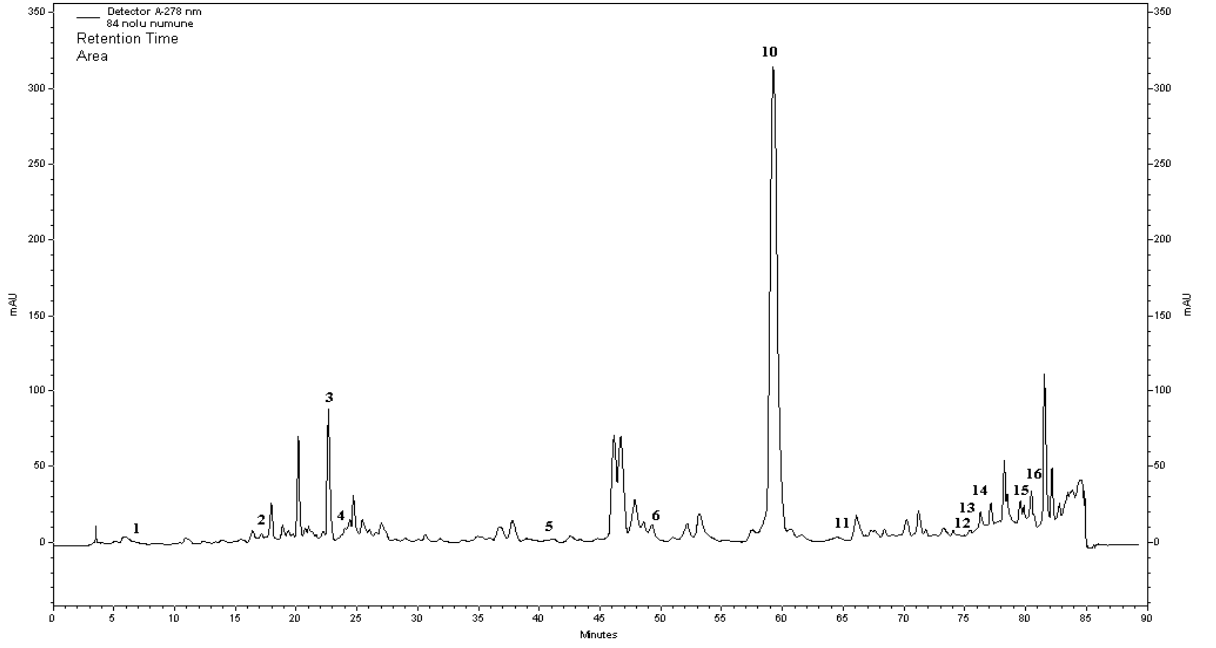
İnhibisyon Zon Çapı (mm)						
		Metanol			Etanol	
BİTKİ	FUNGUSLAR	10 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	100 mg/ml	20 mg/ml
<i>Salvia pomifera</i>	<i>Aspergillus nigar</i>	0	0	0	8.5±0.57	0
	<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0	7.25±0.5	0
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0	0	7.25±0.5	0
	<i>Fusarium proliferatum</i>	0	0	0	0	0
<i>Salvia cryptantha</i>	FUNGUSLAR	100 mg/ml	20 mg/ml		100 mg/ml	20 mg/ml
	<i>Aspergillus nigar</i>	7.75±0.5	0		0	0
	<i>Aspergillus flavus</i>	7.75±0.5	0		0	0
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	0		0	0
	<i>Fusarium proliferatum</i>	0	0		0	0

Çizelge 3.8 Metanol ve Etanol Ekstrelerinin Funguslar İçin MIK ve MFK Tayini

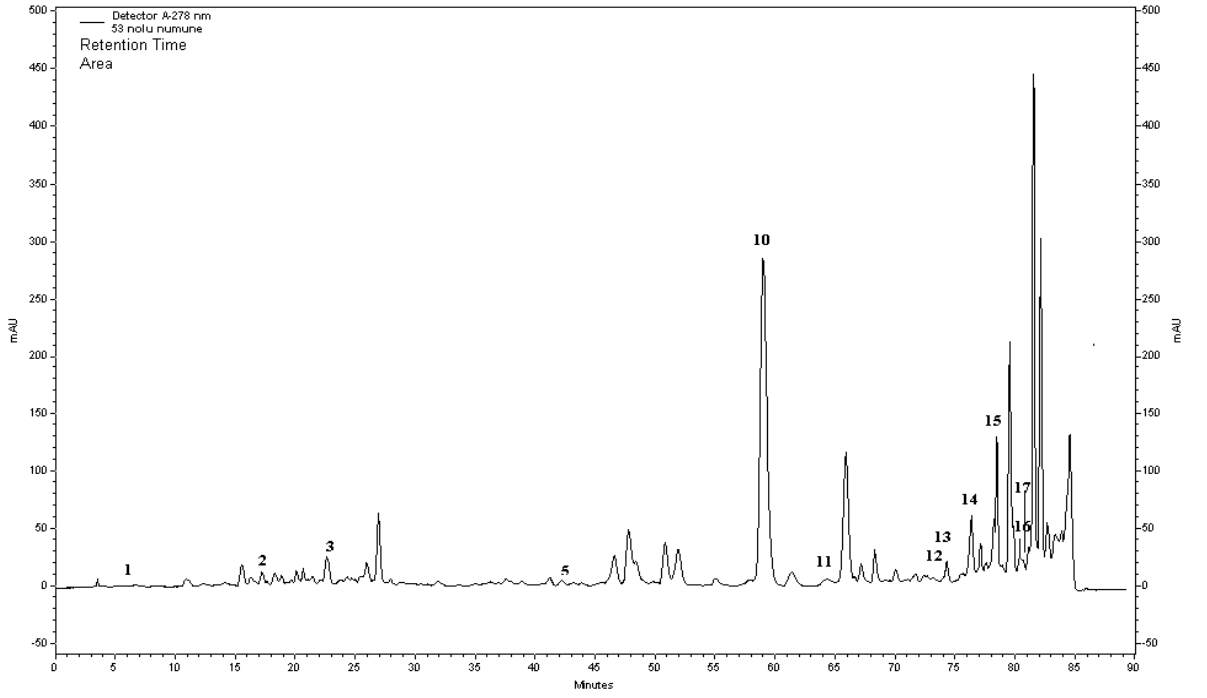
BİTKİ	FUNGUS	MIK(mg/ml)	MFK(mg/ml)	MIK(mg/ml)	MFK(mg/ml)
		ETANOL		METANOL	
<i>Salvia cryptantha</i>	<i>A.nigar</i>	0	0	50	50
	<i>A.flavus</i>	0	0	50	50
	<i>A.ocreceus</i>	0	0	0	0
	<i>F.proliferatum</i>	0	0	0	0
<i>Salvia pomifera</i>	<i>A.niger</i>	25	25	>50	50
	<i>A.flavus</i>	50	50	0	0
	<i>A.ocreceus</i>	50	50	0	0
	<i>F.proliferatum</i>	0	0	0	0

3.4 HPLC Analiz Sonuçları

Çalışmamızda kullanılan *Salvia pomifera* ve *S. cryptantha*'nın metanol ekstrelerinin HPLC yöntemi ile bileşenleri belirlenmiştir. Kullanılan standartlar, (1) gallic, (2) kateşin, (3) kafeik, (4) epikateşin, (5) vitexin, (6) rutin, (7) naringin, (8) hesperidin, (9) apigenin-glukozit, (10) rosmarinik, (11) eriodictiol, (12) quercetin, (13) naringenin, (14) luteolin, (15) apigenin, (16) karvakrol ve (17) acecetin şeklinde kromotogramlarda numaralar ile verilmiştir. Şekil 3.1: *Salvia cryptantha* metanol ekstresinin kromotogramı, Şekil 3.2: *Salvia pomifera* metanol ekstresinin kromotogramı verilmektedir. Çizelge 3.9: HPLC Analiz sonuçları µg/gr olarak verilmektedir.



Şekil 3.1 *Salvia cryptantha* metanol ekstresinin kromotogramı



Şekil 3.2 *Salvia pomifera* metanol ekstresinin kromotogramı

Çizelge 3.9 HPLC Analiz Sonuçları

Standartlar	Metanol($\mu\text{g}/\text{gr}$)	
	<i>Salvia pomifera</i>	<i>Salvia cryptantha</i>
gallik	57,00	31,00
katesin	643,50	116,40
kafeik	524,20	1321,90
epikatesin	-	57,78
vitexin	35,88	45,88
rutin	-	1322,20
Naringin	-	-
Hesperidin	-	-
Api-glu	-	-
rosmarinik	22436,20	22632,90
eriodictiol	156,89	143,95
quersetin	129,38	125,58
naringenin	326,57	11,27
luteolin	1567,87	984,19
apigenin	1677,73	169,91
karvakrol	382,33	312,16

3.5 Uçucu Yağların Antibakterial Aktivitesi

Bitkilerden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların antibakteriyal aktiviteleri, MİK ve MBC değerleri tespit edildi. İlk gün ekimin hemen ardından UV 96 well-plate okuyucudan alınan absorbans değerleri kaydedildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından tekrar kaydedilen absorbans değerleri karşılaştırıldı ve düşük absorbans değerine sahip örnekler bize aktivite varlığını gösterdi. *E.coli* ve *K.pneumonia* 'ya karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

3.5.1 Uçucu Yağların MIK ve MBK Tayini

Salvia cryptantha ve *S.pomifera*'nın uçucu yağlarının MIK ve MBK değerleri µl/ml olarak verilmiştir.

Çizelge 3.10 Uçucu Yağların MIK ve MBC Değerleri

BİTKİ	BAKTERİ	Uçucu Yağ	
		MIK(µl/ml)	MBK(µl/ml)
<i>Salvia cryptantha</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	3.12	6.75
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	1.56	3.12
	<i>Bacillus cereus</i>	3.12	3.12
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.75	6.75
	<i>Escherichia coli</i>	1,56	3.125
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.12	3.125
	<i>Candida albicans</i>	3.12	3.125
<i>Salvia pomifera</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	6.75	6.75
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	12.50	25.00
	<i>Bacillus cereus</i>	3.125	6.75
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.00	50.00
	<i>Escherichia coli</i>	6.75	6.75
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.75	12.50
	<i>Candida albicans</i>	6.75	12.50

3.6 Uçucu Yağların Antifungal Aktivitesi

Uçucu yağların antifungal aktivitelerini belirlemek için mikrodilüsyon broth tekniği uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak besiyeri+fungus+DMSO, negatif kontrol olarak besiyeri+uçucu yağ hazırlanmıştır. Uçucu yağ konsantrasyonu 25 µl/ml- 0.78µl/ml olacak şekilde iki kat seri dilüsyon halinde hazırlandı. Tüm funguslar 450 nmde 0.45 absorbans olacak hazırlandıktan sonra 600 nm de 96 well plate UV reader da okutularak aktivite tayini yapıldı. İlk gün ekimin hemen ardından alınan absorbans

değeri diğer iki gün boyunca absorbands değerinden düşük olduğu durumlar aktivite varlığını göstermektedir. Çünkü üreme olmadı takdirde yoğunluk azalmakta bu da düşük absorbands değeri almamıza neden olmaktadır.

3.6.1.Uçucu Yağların MIK ve MFK Tayini

S.pomifera ve *S.cryptantha*'nın uçucu yağlarının MIK ve MFC değerleri Çizelge 3.11'de verilmektedir.

Çizelge 3.11 Uçucu Yağların MIK ve MFK Değerleri

BİTKİ	FUNGUS	MIK(μ l/ml)	MFK(μ l/ml)
		Uçucu Yağ	
<i>Salvia cryptantha</i>	<i>A.niger</i>	0	0
	<i>A.flavus</i>	0	0
	<i>A.ocreceus</i>	0	0
	<i>F.proliferatum</i>	25	25
<i>Salvia pomifera</i>	<i>A.niger</i>	1.56	1.56
	<i>A.flavus</i>	1.56	1.56
	<i>A.ocreceus</i>	0.78	1.56
	<i>F.proliferatum</i>	1.56	3.125

3.6.2. Uçucu Yağların GC-MS Analizi

Çizelge 3.12, Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'de *Salvia crypthanta* ve *Salvia pomifera*'nın uçucu yağlarının GC/MS sonucunda ortak bileşenleri verilmektedir.

Çizelge 3.12 *Salvia cryptantha* Uçucu Yağının Bileşenleri

RI	Bileşik	%
1032	α -pinen	3.1
1076	kamfen	2.6
1118	β -pinen	1.5
1174	mirsen	1.0
1188	α -terpinen	0.2
1203	limonen	0.7
1213	1,8-sineol	16.7
1246	(Z)- α -Osimen	0.2
1255	γ -terpinen	0.6
1280	p -simen	0.3
1497	α -kopaen	0.8
1532	kafur	15.3
1544	α -gurjunen	0.3
1590	bornil asetat	1.7
1611	terpinen-4 ol	0.6
1612	β -karyofillen	4.7
1661	alloaromadendren	0.6
1687	α -humulen	0.4
1704	α -muurolen	0.7
1719	borneol	4.5
1741	β -selinen	0.9
1743	α -muurolene	0.2
1745	α -selinen	0.5
1773	δ -kadinen	1.1
1776	γ -kadinen	0.4
1804	mirtenol	1.9
1854	germacrene-B	0.5
1953	palustrol	1.4
2008	karyofillen oksit	1.3
2057	ledol	1.4
2104	viridiflorol	21.4
2145	valeranon	1.0
2198	timol	6.7
2239	karvakrol	0.3
2250	α -ödesmol	0.9
2257	β -ödesmol	2.9
	Toplam(%)	98.3
	Bileşik sayısı	36

Çizelge3.13 *Salvia pomifera* Uçucu Yağının Bileşenleri

RI	Bileşik	%
1014	trisiklen	0.2
1032	α -pinen	5.6
1035	α -tuyen	e
1072	α -fenken	e
1076	kamfen	5.8
1118	β -pinen	5.7
1132	sabinen	0.1
1174	mirsen	4.4
1188	α -terpinen	0.4
1203	limonen	1.7
1213	1,8-sineol	40.1
1255	γ -terpinen	0.5
1256	3-oktanon	0.1
1280	<i>p</i> -simen	0.9
1290	terpinolen	0.2
1437	α -tuyon	3.7
1451	β -tuyon	3.4
1474	<i>trans</i> -sabinene hidrat	0.2
1532	kafur	11.2
1553	linalol	0.8
1556	<i>cis</i> -sabinene hidrat	0.1
1565	linalil asetat	0.2
1571	<i>trans-p</i> -ment-2-en-1-ol	-
1590	bornil asetat	1.1
1611	terpinen-4 ol	0.7
1612	β -karyofillen	2.1
1628	aromadendren	0.2
1638	<i>cis-p</i> -ment-2-en-1-ol	-
1658	sabinil asetat	-
1687	α -humulen	0.3
1706	α -terpineol	1.8
1719	borneol	3.3
1773	δ -kadinen	0.1
1776	γ -kadinen	-
1804	mirtenol	0.1
1853	<i>cis</i> -kalamenen	-

1864	<i>p</i> -simen-8-ol	-
1941	α -kalakoren	0.1
2008	karyofillen oksit	0.8
2045	humulen epoksit-I	-
2071	humulen epoksit-II	0.2
2098	globulol	0.1
2104	viridiflorol	0.8
2144	spatulenol	0.1
2198	timol	-
2221	izokarvakrol (=4- <i>Izopropil-2-metil fenol</i>)	-
2224	klovenol	-
2239	karvakrol	0.1
2324	karyofilladienol-II	0.1
2389	karyofillenol-I	0.3
2392	karyofillenol-II	0.2
2645	manol	0.3
	Toplam %	98.1
	Bileşik sayısı	52

Çizelge 3.14 *Salvia cryptantha* ve *Salvia pomifera* Uçucu Yağlarının Ortak Bileşenleri

Bileşikler	<i>S.crypthanta</i> (%)	<i>S.pomifera</i> (%)
α -pinen	3,1	5,6
Kamfen	2,6	5,8
β -pinen	1,5	0,7
Mirsen	1	4,4
α -terpinen	0,2	0,4
α -terpinen	0,7	1,7
1,8-sineol	16,7	40,1
γ -terpinen	0,6	0,4
<i>p</i> -simen	0,3	0,9
Kafur	15,3	11,2
bornil asetat	1,7	1,1
Terpinen-4 ol	0,6	0,7
β -karyofillen	4,7	2,1
α -humulen	0,4	0,3
Borneol	0,7	3,3
karyofillen oksit	1,3	0,8
Mirtenol	1,9	0,1
karvakrol	0,3	0,1

3.7 Metanol,Etanol ve Uçucu Yağlarının Antimycobacterial Aktivitesi

İnvitro oksijen üretimine bağlı floresans tayini tekniği i kullanılır 365 nm de UV reader ile okutulan değerler pozitif kontrol da üreme olduktan sonra 2 gün süresince günlük okutulur. Her iki bitki örneğinin metanol,etanol ve uçucu yağlarının antimycobacterial aktivitesi belirlenmiş ve Çizelge 3.15'de MIK değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.15 Metanol, Etanol ve Uçucu Yağlarının Antimycobacterial Aktivitesi

Bitkiler	MİK		
	Metanol Ekstresi (mg/ml)	Etanol Ekstresi (mg/ml)	Uçucu yağ(µl/ml)
<i>Salvia cryptantha</i>	1.56	1.56	12,5
<i>Salvia pomifera</i>	0.39	>1.56	<50

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda kullandığımız bitkilerin metanol ve etanol ekstralarının antimikrobiyal aktivite tayin için funguslardan *A. niger*, *A. flavus*, *F. proliferatum*, *A. ocreceus* kullanılırken, bakteriler için *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* *E. coli* ve *C. albicans* mayası kullanıldı.

Salvia pomifera metanol ekstresinin aktivite tayini için genel tarama yöntemi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Metanol ekstresinin 1 mg/ml ve 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonu *P. vulgaris*'de sırasıyla 8.25±0.95 ve 7.25±0.5 lik inhibisyon zon çapı oluşturarak en yüksek aktiviteyi gösterdi. Ayrıca metanol ekstresinin 10mg/ml konsantrasyonu *P. vulgaris* dışında *B. cereus* da 11.25±0.95'lik inhibisyon zon çapı oluştururken *Staphylococcus aureus* üzerinde 8.0±0.81'lik inhibisyon zon çapı oluşturdu. Diğer bakterilere karşı aktivite gözlenmedi.

Salvia cryptantha metanol ekstresinin 20 mg/ml'lik konsantrasyonu 9.25±0.95'lik inhibisyon zon çapı ile *B. cereus* üzerine ve 7.25±0.5' lik zon çapı ile *Staphylococcus aureus* üzerinde aktivite göstermiştir. Diğer bakterilere karşı aktivite gözlenmemiştir. Antibakterial hassasiyetin Gram pozitif ve gram negatiflerde farklı olması morfolojik yapıdan kaynaklanmaktadır. Gram negatif bakteriler en dış kısımlarında fosfolipidik bir yapıya sahip olup lipopolisakarit bileşenler taşır. Bu drum hücre duvarını lipofilik parçalara karşı geçirmez yaparken içerdiği polar hidrofilik parçalara karşı bir bariyer olup bu limit 600DA'dır. Gram pozitif bakterilerde ise dış

tabakalarında sadece peptidoglikandan oluştuklarından ve geçirgenlikten etkilenmediklerinden çok daha hassastır [111].

Salvia pomifera etanol ekstresinin 20 mg/ml' lik konsantrasyonu hiçbir bakteriye karşı etki göstermemiştir. 100mg/ml'lik konsantrasyonu *P.vulgaris* için 12 ± 1.63 lük *E. coli* için 10.25 ± 0.95 'lik inhibisyon zon çapı oluşturdu.

Salvia crytantha'nın etanol ekstresinin 100 mg/ml'lik konsantrasyonu *P. vulgaris* ve *S. aureus*'a karşı aktivite gösterdi. *P. vulgaris* için 13 ± 0.5 , 11 ± 0.81 inhibisyon zon çapı ölçüldü. 20 mg/ml için 11 ± 0.81 ve 6.5 ± 1.29 inhibisyon zon çapları belirlendi.

Disk difüzyon çalışmasında kontrol olarak kullanılan ciproflaksinin oluşturduğu zon çapları çalışmamızda kullanıldığımız *S. cryptanta* ve *S. pomifera* bitkilerinin ham ekstrelerinden çok daha fazladır. Sonuç olarak ciproflaksin ticari bir antibiyotik olurken kullandığımız ekstreler ham ekstrelerdir.

Salvia crypthanta etanol ekstresi için antifungal aktivite görülmezken, *Salvia pomifera* da metanolde aktivite görülmemiştir. *Salvia cryptantha* metanol ekstresi 100 mg/ml de *A. nigar* ve *A. flavus*'a karşı aktivite gösterirken *Salvia pomifera* etanol ekstresi 100 mg/ml de *A. nigar*, *A. ocreceus* ve *A. flavus*'a karşı aktivite göstermiştir. Hepsi için MİK değeri 50 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Metanol ve etanol ekstreleri saf birçok bileşiği içerdiğinden ve bu bileşenlerin sinerjik etkisi farklı olabilmektedir.[22]

Çalışmamızda kullandığımız *S. cryptantha* ve *S. pomifera* bitkilerinin uçucu yağlarının konsantrasyonu 50 µl/ml-0,78 µl/ml olacak şekilde seri dilisyonu hazırlanmıştır.

S. cryptantha uçucu yağının MIK değeri *K. pneumonia* ve *E. coli* için 1,56 µl/ml olarak belirlenip anlamlı bir aktivite göstermiştir. Her iki organizmada 3.12 µl/ml de bakteridal aktivite göstermiştir. *P. aeruginosa* en dirençli bakteri olup MIK değeri 6,75 µl/ml olarak belirlenmiştir. Geriye kalan *S. aureus*, *P. vulgaris*, *B. cereus* ve *C. albicans* 'ın MIK değeri 3,12 µl/ml olarak belirlenmiştir.

S. pomifera uçucu yağının *B. cereus* üzerinde en fazla etkiye sahip olup MIK değeri 3,12 µl/ml'dir. *S. aureus* ve , *P. vulgaris*, *C. albicans* ve *E. coli* için MIK 6,25 µl/ml, *K. pneumonia* için MIK 12,5 µl/ml, *P.aeruginosa* en dirençli bakteri olup MIK değeri 25 µl/ml olarak belirlenmiştir.

S. cryptantha uçucu yağının içerisindeki %21,4 viridflorol *Salvia pomifera* içerisinde bulunmamaktadır. Bu madde Gram negatif bakteriler olan *K. pneumonia* ve *E. coli* üzerinde etkili olabilir.

Penna ve arkadaşları Sardunya'da doğal olarak yetişen *Salvia sclarea* ve *Salvia deseloena* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri konusunda yaptıkları çalışmada *S. sclera* uçucu yağının *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermis* ve *C. albicans*'a (MIK 0.250-1 mg/ml) karşı anlamlı bir aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. (kandidisal aktivite dozu >2 mg/ml). Çalışılan *S. sclarea* uçucu yağ örneğinin %47,4'ünü oluşturan α -terpiniolen *S. aerous*, *E. coli*, *S epidermis*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans*'a karşı önemli etkisi olduğunu ve lineolün etkisinin daha zayıf olduğunu belirlemişlerdir [[63] Çalıştığımız bitkilerden *S. pomifera* da %0,2 α -terpiniolen varken *S. cryptantha* da tespit edilmemiştir. Her iki bitkide de lineol bileşiğine rastlamamıştır. *S. cryptantha* da bulunmamasına ve *S. pomifera*'nın uçucu yağında çok az bir miktar

bulunmasına rağmen *C. albicans*, *S. aureus* ve *E. coli*'e karşı aktivite göstermesi α -terpiniolen dışındaki diğer bileşenlerinde bu bakterilere karşı etkili olduğunu göstermektedir.

S. cryptantha ve *S. pomifera* uçucu yağların bileşenleri bakımından benzerlik görülmüştür. Çalışmamız da Kuşadasından toplanan *S. cryptantha* da bitkisinden çok az miktarda (%3,1) α -pinene rastlanmıştır. En yüksek miktarda bulunan %21,4 ile viridifloroldür. Sivas bölgesinden toplanan *S. cryptantha* ve *S. multicaulis* türleri ile 2004 yılında Bektaş Tepe ve arkadaşları tarafından yapılan uçucu yağ analizine göre en yüksek miktarda α -pinene rastlandığı bildirilmiştir [50]. Bu durumda bitkilerin lokalite farklılığından kaynaklanabilirken aynı zamanda toplanma zamanı ve uçucu yağ elde etme yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir (Lis-Balchin,1997). *S. cryptantha* ve *S. pomifera* bitkilerini metanol ve etanol ekstraktlarının uçucu yağları ile antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırdığımızda çok daha az etkili olduğunu görmekteyiz. *Salvia* türleri, uçucu yağlarında içerdikleri 1,8-sineol ve borneol ile karakterize edilir [112].

Salvia türlerinde tipik olarak bulunan 1.8 sineol *Salvia pomifera* da %40.1 iken *Salvia cryptantha* da %16.7 oranında bulunmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal aktivite gösterdiği bilinen kafur maddesi *Salvia pomifera* ve *Salvia cryptantha* uçucu yağlarında bulunmaktadır. Oranları sırasıyla %15.3 ve %11.2 dir.

Salvia pomifera uçucu yağı en düşük konsantrasyon olan 0.78 μ l/ml *A. ocreceus* 'a karşı antifungal aktivite göstermiştir. Ayrıca *A. niger*, *A. flavus*, *F. proliferatum* için MİK değeri 1.56 μ l/ml dir *Salvia cryptantha* *F. proliferatum* üzerine aktivite gösterdiği belirlendi ve MİK değeri 25 μ l/ml olarak belirlenmiştir.

Salvia pomifera Kuşadası'ndan toplanmış olup nemli ortamda yetişen bir tür iken *S. cryptantha* ise iç Anadolu da karasal iklimde yetişmektedir. Bu durumda çevresel koşullardan etkilenen sekonder metabolit oluşumunu her iki bitki için değiştirmiştir. Çalışmamızda *S. pomifera*'nın antifungal aktivitesi *S. cryptantha* dan daha fazladır. Bu durum yetiştiği nemli ortamda kendisini fungal etkilerden korumak için geliştirdiği sekonder metabolitlerden kaynaklanabilir.

Ayrıca *Salvia* türlerinin karakteristik özelliği olan rosmarinik asit her iki *Salvia* türün de yüksek miktarda bulunmaktadır ve bu fenolik asit bitkiye yüksek antioksidan özellik kazandırmaktadır [70]. *S. cryptantha* yüksek miktarda rutin içermektedir. Rutin bir flavanoiddir. Daha çok tahıllarda ve baklagillerde bulunur en çok karabuğdayda bulunduğu bildirilmiştir. Damar cidarlarını güçlendir ve son zamanlarda yapılan yayınlarla antioksidant özellik gösterdiği de açıklanmıştır. [70]

Salvia pomifera da metanol ekstresinde anti tüberküloz aktivite bulunmaktadır. HPLC sonucunda etkin bir madde olan karvakrol oranı düşük olmasına karşın *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı aktivite göstermesi metanol bileşenindeki gallik asit, kateksi veya epigeninden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Literatür taraması sonucunda mono, di ve triterpenlerle yapılan anti tüberküloz aktivite çalışmalarının yok denecek kadar az olduğu buna karşılık yapılan birkaç çalışma da ekstraktların yüksek derecelere varabilen anti tüberküloz aktivitesi gösterdiği görülmüştür [104, 113].

Bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin antimikobakteriyel aktivite tayinlerinde alkaloidler, flavonlar, kumarinler, kromonlar, kalkanlar, terpenoidlerin, saponinler, steroidler, fenoller, polifenol ve peptidlerin aktivite gösterdiği bulunmuştur [114].

Çalışmamızda kullandığımız bitkiler halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitkiler olup bunların biyolojik aktivite tayinleri etkinliğini artırmak ve doğru kullanımını sağlamak açısından önemlidir. Günümüzde düzensiz antibiyotik kullanımının bir sonucu olarak ortaya çıkan antibiyotik direncine karşı yeni ajanlar belirlenmesi önemlidir. Özellikle tüberküloz bugün yeniden ciddi bir sorun haline gelmiş ve yüksek oranlarda ölümlere neden olmaktadır. Tedavinin etkinliği erken teşhis ve doğru antibiyotik kullanımına bağlıdır. Bu yüzden tıbbi bitkiler yeni ajanlar için büyük bir kaynaktır.

5. KAYNAKÇA

- [1] Benli, M., Yigit, N., "Ülkemizde yaygın kullanımı olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **3**(8): 1-8 (2005).
- [2] Bouwmeester, J., Matusova, R., Zhongkui S., and Beale, M.H., "Secondary Metabolite Signalling in Host–Parasitic Plant Interactions," *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**: 358-364 (2003).
- [3] Yazaki, K., Editors, : Handbook of Plant Biotechnology, J (2004), pp. 811–857., "Natural Products and Metabolites". Ohn Wiley & Sons Ltd. P. 811-857 (2004).
- [4] Zuin, G.a.V., J.H., "Pesticide Residues in Medicinal Plants and Phytomedicines", *Phytother. Res.*, **14**: 73-88 (2000).
- [5] Rocha, G., Almeida, J.R., Macedo R.O and Barbosa-Filho, J.M., "A Review of Natural Products with Antileishmanial Activity," *Phytomedicine* **12**, **12**: 514-535 (2005).
- [6] Perry, N.B., Anderson, R. E., Brennan, N. J., Douglas, M. H.,sheaney, A. J., mcgimpsey, J. A., ve Smallfield, B. M. . And "Essential Oils from Dalmation Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons and Sites." *Agricultural and Food Chemistry*, 2048-2054(47): 2048-2054 (1999).
- [7] www.wpro.who.int/rcm/en/archives/rc52/documents/wpr_rc52_7.htm. (04.07.2007).
- [8] Baser, K.H.C., Özek, T., Akgül, A.,Tumen, G., "Composition of the Essential Oil of Nepeta Racemosa Lam.," *J.Essent.Oil.Res.*, **5**(2): 215-217 (1993).
- [9] Duraipandiyan, V., Ayyanar M., and Ignacimuthu, S., "Antimicrobial Activity of Some Ethnomedicinal Plants Used by Paliyar Tribe from Tamil Nadu, India", *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2006**, *6*:35 doi:10.1186/1472-6882-6-35, **6**(35): (2006).

- [10] Bayram, E., "Batı Anadolu Florasında Yetişen Anadolu Adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill)'Nda Uygun Tiplerin Seleksiyonu Üzerine Araştırma", *Türk. J. Agric. For.:* 351-357 (2001).
- [11] Blumberg, D.L.M.a.J.B., "A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.)", *Phytother. Res.*, **20**: 619-633 (2006).
- [12] P´erez, C., Anesini, C., 1994b. In vitro antibacterial activity of Argentine folk, *Ethnopharmacology*, m.p.a.S.t.J.o., and 44, "In Vitro Antibacterial Activity of Argentine Folk Medicinal Plants against *Salmonella Typhi*." *Ethnopharmacology*, **44**: 41-46 (1994).
- [13] Mativandlela, S.P.N., "Evaluation of Isoletes and Identified Phenolics from *Pelorganium Sidoides* Against *Mycobacterium Tuberculosis* Other Bacteria and Fungi", Published phd Thesis, University of Pretoria. (2005).
- [14] Leaman, D., J., *Medicinal Plant Conservation*, in *Newsletter of the Medicinal Plant Specialist Group Of the IUCN Species Survival Commissio*. 2006.
- [15] Bent, S., Ko, R., , United, C.U.H.M.i.t., States: A reviewthe American Journal Of Medicine, and 2004 April, v., 478-485, "Commonly Used Herbal Medicines in the United States:" *The American Journal Of Medicine*, **116**: 478-485 (2004).
- [16] Senatore, F., "influence of Harvesting Time on Yield and Composition of the Essential Oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania(Southern Italy)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**(1327): (1996).
- [17] Sarisen, O., Çalışkan,D.,, "Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat (!)", *Sted*, **14**(8): 182-187 (2005).
- [18] Seef, L.B., ve ark. *Hepatology* 2001; ".Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease." *Hepatology*,, **34**: 472-80 (2001).
- [19] Gursoy O.V., G.U.K., "Anadoluda Diş Ve Dişeti ile ilgili Hastalıkların Tedavisinde Halk arasında yaygın olarak kullanılan Bitkiler,kullanım Şekilleri Ve Bitkisel Özellikleri", *Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Dergisi*, **7**(1): (2004).

- [20] Yücel, E., Tülükoğlu, A., "Gediz (Kütahya) Çevresinde Halk ilacı Olarak kullanılan Bitkiler", *ÇEV-KOR*, **9**(36): 12-14 (2000).
- [21] Balandrin, M., Kjocke A, Wurtele E ve ark., "Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials", *N.Science*, **228**: 1154-1160 (1985).
- [22] Wagnor H., H., H. And Farnsworth, N. R., "Principle Pp. The Economic Significance of Plants and Their Constituents as Drugs." London. London: Academic Press,. P. 1-17 (1989).
- [23] Parekh, J., Jadeja, D., Chanda, S., "Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity", *Turk J.Bio.*, **29**: 203-210 (2005).
- [24] Davis, P.H., "**Flora of Turkey and East Aegean Island**", Edinburg. University of Edinburg Pres. (1982).
- [25] Baser, K.H.C., "Aromatic Biodiversity among the Flowering Plant Taxa of Turkey", *Pure Appl. Chem*, **74**: 527-545 (2002).
- [26] Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G, Karadogan T., "Antibacterial Activity and Composition of Essential Oils from Origanum, Thymbra and Satureja Species with Commercial Importance in Turkey", *Food Control*, **15**: 169-172 (2004).
- [27] Verastegui M.A., S.J.S., "Antimicrobial Activity of Extracts Three Major Plants from the Chihuahuan Desert", *Ethnopharmacol*, **52**: 175-177 (1996).
- [28] Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. Ve Haroutounian, S. A., "Chemical Composition and in-Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Greek Achillea Species", *Z.Naturforsch*, **57**: 287 (2002).
- [29] Tümen, G., Sezik, E., Başer, K.H.C., "The Essential Oils of Satureja Parmassica Hedr. And Sart, Ex Boiss Subsp. Siplea P.H Davis", *Flav.Frag.J.*, **7**(1): 43-46 (1992).
- [30] Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T. ,Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S., "Antibacterial Activity of the Essential Oils of Salvia Officinalis L. And Salvia Triloba L. Cultivated in South Brazil": (2005).

- [31] Onlooker, "Sage against Age", *The Pharmaceutical Journal Vol*, **255**: 708 (1995).
- [32] Digrak, M., ılıçım, A., Alma, M. H., aen S., .Tr. J. Of Biology, 23, 241-248, (1999), "Antimicrobial Activites of the Extracts of Various Plants (Valex, Mimosa Bark, Gallnut Powders, Salvia Sp. And Phlomis Sp.)", *Tr. J. Of Biology*,, **23**: 241-248 (1999).
- [33] Kamatoua, G.P.P., Viljoen A.M., Gono-Bwalya A.B., van Zyl R.F., van Vuuren R.L.,Lourens, A.C.U., Baser,K.H.C., Demirci B.,Lindsey K.L., van Staden J.,Steenkamp, "The in Vitro Pharmacological Activities and a Chemical Investigation of Three South African Salvia Species", *Journal of Ethnopharmacology*, **102**: 382-390 (2005).
- [34] Nostro, A., Germano, M.P., Angelo, V.D., Marino, A. And Cannatelli, M.A., "Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity", *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 379-384 (2000).
- [35] Kamatoua, G.P.P., Viljoen A.M.,Van Vuuren,S.F., Van Zyl, R.L., "In Vitro Evidence of Antimicrobial Synergy between *Salvia Chamelaeagnea* and *Leonotis Leonurus*", *South African Journal of Botany*, **72**: 634-636 (2006).
- [36] Kabouchea, A., Kabouchea, Z.,Öztürk,M.,Kolak vetopçu G.,, "Antioxidant Abietane Diterpenoids from *Salvia Barrelieri*", *Food Chemistry*, **102**(4): 1281-1287 (2006).
- [37] Tepe, B., "Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of the Methanolic Extracts of *Salvia Virgata* (Jacq), *Salvia Staminea* (Montbret & Aucher Ex Bentham) and *Salvia Verbenaca* (L.) From Turkey", *Bioresource Tecnology*: (2007).
- [38] Lin, L.Z., Wang, X. M., Huang, X. L., Huang, Y., & Cordell, G. A., "Sapriolactone, a Cytotoxic Norditerpene from *Salvia Prionitis*", *Phytochemistry*,, **28**: 3542-3543 (1989).
- [39] Ulubelen, A., Topcu, G., Chai, H. B., & Pezzuto, J. M., "Cytotoxic Activity of Diterpenoids Isolated from *Salvia Hypargeia*." *Pharmaceutical Biology*, **37**: 148-151 (1999).
- [40] Jimenez, J., Risco, S., Ruiz, T., & Zarzuelo, A., "Hypoglycemic Activity of *Salvia Lavandulifolia*", *Planta Medica*, **52**: 260-262 (1986).

- [41] Orhan, İ., Şener, B. Ve ark., "Antioxidant and Anticholinesterase Evaluation of Selected Turkish Salvia Species", *Food Chemistry*, **103**: 1247-1254 (2007).
- [42] Facciola, S., *Excellent. Contains a Very Wide Range of Conventional and Unconventional Food Plants (Including Tropical) and Where They Can Be Obtained (Mainly N. American Nurseries but Also Research Institutes and a Lot of Other Nurseries from around the World.)*, in *A Source Book of Edible Plants*. 1990, Kampong Publications: Cornucopia.
- [43] Weckessera, S., Engela, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schemp, C.M., "Screening of Plant Extracts for Antimicrobial Activity against Bacteria and Yeasts with Dermatological Relevance": (2006).
- [44] Wen, D., Liu, Y., Li, W., Liu, H., "Separation Methods for Antibacterial and Antirheumatism Agents in Plant Medicines", *Journal of Chromatography*, **812**: 101-117 (2004).
- [45] Süzer, Ö. "Süzer Farmakoloji". Klinisyen Tıp Kitabevleri 3.baskı (2005).
- [46] Sökmen, A., Gürel, E., "Bitki Biyoteknolojisi", Konya. Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları. P. 211 (2001).
- [47] Baytop, T., *Farmakognozi*. 1986, İstanbul Üniversitesi Yayınları: İstanbul.
- [48] Berk, A., "Esanslar (Eterik yağlar)", İstanbul. Hüsnü Tabiat Matbaası (1953).
- [49] Çelik, E., Çelik G.Y., "Bitki Uçucu yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **5(2)**: 1-6 (2007).
- [50] Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Dafererad, D., Vardar-Unlu, G., Polissioud, M., Sokmen A., "Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts of *Salvia Cryptantha* (Montbret Et Aucher Ex Benth.) And *Salvia Multicaulis* (Vahl)", *Food Chemistry*, **84**: 519-525 (2004).

- [51] Delamare, A., P.,L., Moschen-Pistorello I.,T., Articoa, L., Atti-Serafinia, L., and Echeverrigaraya,S., "Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Salvia Officinalis* L. And *Salvia Triloba* L. Cultivated in South Brazil", *Food Chemistry*, **100**(2): 603-608 (2007).
- [52] Gammal, S.Y.E., "Extraction of Volatile Oils Throughout History", *Hamdard Medicus*, **34**: (1991).
- [53] Kıvanç, M.A., "Antibacterial Activities of Essential Oils from Turkish Spices and Citrus," *Flavour and Fragrance Journal*,, **1**: 175-179 (1986).
- [54] Dorman, H.J.D., et.al., "Antimicrobial Agents from Plants Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils", *J. App. Microb.*, **88**: 308-316 (2000).
- [55] Ertürk, Ö., Demirbağ, Z.,, "Scorzonare *Mollis* Bieb. (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi," *ÇEV-KOR*,, **12**(47): 27-31 (2003).
- [56] NCCLS, "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test(6th.Ed.)", *Wayne PA: Approved Standard*, **M2-A6**: (1997).
- [57] Baser, K.H.C., Özek, T., Krimer, N.,Tumen, G., "The Essential Oil of *Salvia Pomifera* L.," *J.Essent Oil Res.*, **5**(3): 347-348 (1993).
- [58] Tümen, G., Ermin, N., Özek, T., Kürkcüoğlu, M., Başer, K.H.C., *The Composition of Essential of the Two Varieties of Thymbra Spicata L.* In *10th. Symposium on Plant Drugs*. 1993. İzmir/Türkiye.
- [59] Baser, K.H.C., Sarikardasoglu S., ve Tumen G., "The Essential Oil of *Cyclotrichium Niveum* (Boiss.) Manden Et Scheng." *J. Essent. Oil Res*, **6**: 9-12 (1994).
- [60] Braak V., S.A.J.J., Lejiten, G.C.J.J., "Essetial Oils and Oleoresins:A Survey in the Netherlands and Other Major Markets in the European Union ,Cbi, Centre for the Promotion of imports from Developing Countries", (4): (1999).
- [61] Chouliara, E., Karatapanis, A.,Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., "Combined Effect of Oregano Essential Oil and Modified Atmosphere Packaging on Shelf-Life Extension of Fresh Chicken Breast Meat, Stored at 4⁰C", *Food Microbiology*, **24**: 607-617 (2007).

- [62] Adiguzel, A., Özer, H., Kiliç, H. Ve Çetin, B., "Screening of Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Satureja Hortensis* on Foodborne Bacteria and Fungi", *Czech J. Food Sci.*, **25**(2): 81-89 (2007).
- [63] Lorenza, D., Paz, D., Davies, P., Villamil, J., Conigueral, S., Dellaccassa, E., "Characterization and Enantiomeric Distribution of Some Terpenes in the Essential Oil of Uruguayan Biotype of *Salvia Sclerea*", *Flavour and Fragrance Journal*, **19**(4): 303-307 (2007).
- [64] Burt, S., "Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods", *International Journal of Food Microbiology*, **94**(223): (2004).
- [65] Wenkert, E., Fuchs A, Mcchesney, J.D., "Chemical Artifacts from the Family Labiatae", *J. Org. Chem.*, **30**(2963): 1-22 (1965).
- [66] Geisman, T.A., *Flavonoid Compounds, Tanins, Lignins and Related Compounds.*, in *Pyroel Pigments, Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents*, M.F.a.E. Stotz, Editor. 1963, Elsevier: New York. P. 265.
- [67] Scalbert, A., "Antimicrobial Properties of Tanins." *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883s (1991).
- [68] Urs, N.V. et. al., "Enhancement of the Bactericidal Activity of Peroxidase System of Phenolic Compounds. (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, Soybeans)", *Phytopathology*, **65**: 686-690 (1975).
- [69] Mason, T.L., et.al., "Inactivation of Red Beet Betaglucan Synthase by Native Oxidized Phenolic Compounds." *Phytochemistry*, **26**: 2197-2202 (1987).
- [70] Lu, Y., Foo L. Y., "Polyphenolics of *Salvia*", *Phytochemistry*, **59**: 117-140 (2002).
- [71] Ulubelen, A., Tuzlaci, E., "Flavonoids and Triterpenoids from *Salvia Euphratica* and *S. Longipedicellata*", *Fitoterapia*, **61**: 185 (1990).
- [72] Gerhardt, U., Schroeter, A., "Rosmarinic Acid A Naturally Occurring Antioxidant in Spices." *Fleischwirtschaft*, **63**: 1628-1630 (1983).

- [73] Harris, R.S., "Vitamins K, in Pyrrole Pigments, Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents" M. Florkin and E. Stotz, Editor., 1963, Elsevier: New York.
- [74] Kazmi, M.H., A. Malik, S. Hameed, N. Akhtar, and S. Noor Ali., "Anthraquinone Derivative from *Cassia Italica*." *Phytochemistry*, **36**: 761-763 (1994).
- [75] Cowan, M.M., "Plant Products as Antimicrobial Agents", *Clinical Microbiology*, **12**(4): 564-582 (1999).
- [76] Weinmann, I., *History of the Development and Applications of Coumarin and Coumarin-Related Compounds.*, in *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action.*, R. O'Kennedy and R. D.Thornes, Editor. 1997, Wiley & Sons, Inc.: New York.
- [77] Chaurasia, S.C., and Vyas, K.K., In Vitro Effect of Some Volatile Oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*., in *J. Res. Indian Med.* 1977.
- [78] Vishwakarma, R.A., "Stereoselective Synthesis of a-Arteether from Artemisinin", *J. Nat. Prod.*, **53**: 216-217 (1990).
- [79] Augustine, S.K., Bhavsar S.P., & Kapadnis, B.P, "Production of a Growth Dependent Metabolite Active against Dermatophytes by *Streptomyces Rochei* Ak 39", *Indian J Med Res*, **121**: 164-170 (2005).
- [80] Kirska, R., Baumgartner, S., Josephs, R., "Review, the State-of-Art in the Analysis of -a and -B Trichothecene Mycotoxins in Cereals, Fresenius", *Journal of Analytical Chemistry*,, **369**(469-476): (2003).
- [81] Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., Cleveland, T. E., "Molecular Genetic Analysis and Regulation of Aflatoxin Biosynthesis," *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**(2): 83-93 (2003).
- [82] Teren, J., Varga,J., Hamari,Z., Rinyu, E., Kevei, F., " Immunochemical Detection of Ochratoxin a in Black *aspergillus* Strains." *Mycopathologia*: 171-196 (1996).
- [83] European Commission, Directorate-Generale VI. "VI.B.II.1 Legislation Relating to Crop Products and Animal Nutrition" In *Agriculture Public Animal and Plant Health*,. (1999).

- [84] Commission, E. *Directorate-Generale Vi. In VI.B.II.1 Legislation relating to Crop Products and Animal Nutrition*. 1999: Agriculture Public Animal and Plant Health.
- [85] Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G., Marzin, D., "Genotoxicity of Ochratoxin A by *Salmonella mutagenicity* Test after Bioactivation by Mouse Kidney Microsomes." *Mutat Res*, **29**: 195-202 (1999).
- [86] Dirheimer, G., Creepy, E., "Mechanism of Action of Ochratoxin A", *IARC Sci Publish*, **171-186**: (1991).
- [87] Shier, W.T., "The Fumonisin Paradox: A Review of Research on Oral Bioavailability of Fumonisin B1, a Mycotoxin Produced by *Fusarium moniliforme*." *J.Toxicol. Toxin Reviews*, **19**: 161-187 (2000).
- [88] D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., "Fusarium Mycotoxins: A Review of Global Implications for Animal Health, Welfare and Productivity." *Animal Feed Science and Technology*: 183-205 (1999).
- [89] Fennera, R., Sortino, M., Kuze Rates, S.M., Dall'Agnola, R., Ferraza, A., Bernardia, A.P., Albring, D., Nora, C., von Posera, G., Schapoval, E., Zacchino S., "Antifungal Activity of Some Brazilian Hypericum Species", *Phytomedicine*, **12**: 236-240 (2005).
- [90] Irobi, O.N.et.al., "Antifungal Activity of Aqueous Extract of Dormant Fruits of *Hyphaene thebaica* (Palmae)", *Pharmaceutical Biology*, **37**(2): 114-117 (1999).
- [91] Rana, B.K., Taneja, V. And Singh, U.P., "Antifungal Activity of an Aqueous Extract of Leaves of Garlic Creeper (*Adenoclymma alliaceum miers.*)", *Pharmaceutical Biology*, **37**(1): 13-16 (1999).
- [92] Stein, A.C., Sortino M., Avancini, C., Zacchino, S., von Poser, G., "Ethnoveterinary Medicine in the Search for Antimicrobial Agents: Antifungal Activity of Some Species of Pterocaulon (Asteraceae)", *Journal of Ethnopharmacology*, **99**(211-214): (2005).
- [93] Selitrennikoff, C.P., "Antifungal Proteins." *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 2883-2894 (2001).

- [94] Jantan, J., Mohd, S., Mohd, Y., Chen Bee Chin, Lau Lee Chen and Ng Lee Sim, "Antifungal Activity of the Essential Oils of Nine Zingiberaceae Species", *Pharmaceutical Biology*, **41**(5): 392-395 (2003).
- [95] Evandro Leite de Souza, et.al., "Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated from Foods", *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, **48**(2): 245-240 (2005).
- [96] Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., "Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils and Essences against Important Foodborne Pathogens", *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**(118-122): (1998).
- [97] Tshikalange, T.E., Meyer, J.J., Hussein, A.A., "Antimicrobial Activity, Toxicity and the Isolation of a Bioactive Compound from Plants Used to Treat Sexually Transmitted Diseases", *Journal of Ethnopharmacology*: (2004).
- [98] O'Gara, E., Hill, D.J., Maslin, D.J., "Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*", *Environ. Microbiol*, **66**: 2269-2273 (2000).
- [99] Fennell, C.W., Lindsey, K.L., Sparg S.G., Stafford, G.I., Elgorashi, E.E., Grace, O.M., "Assessing African Medicinal Plants for Efficacy and Safety: Pharmacological Screening and Toxicology", *Journal of Ethnopharmacology*, **94**: 205-217 (2004).
- [100] Billoa, M., Cabalion, P., Waikedre, J., Fourneau, C., Bouttier, S., Hocquemillera, R., Fourne, A., "Screening of Some New Caledonian and Vanuatu Medicinal Plants for Antimycobacterial Activity", *Journal of Ethnopharmacology*, **96**: 195-500 (2005).
- [101] Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fisher, N.H., "Antimycobacterial Plant Terpenoids", *Planta Medica*, **67**: 685-694 (2001).
- [102] Banfi, E., Scialino, G., and Monti-Bragadin, C., "Development of a Microdilution Method to Evaluate Mycobacterium Tuberculosis Drug Susceptibility", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**: 796-800 (2003).
- [103] Houghton, P.J., Woldemariam, T.Z., Watanabe, Y., Yates, M., "Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of Alkaloids Constituents of Angustura Bark, *Galipea officinalis*." *Planta Medica*, **65**: 250-254 (1999).

- [104] Newton, S.M., C. Lau, et al., "The Evaluation of Forty-Three Plant Species for in Vitro Antimycobacterial Activities; Isolation of Active Constituents from *Psoralea Corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*", *Journal of Ethnopharmacology*, **79**(1): 57-67 (2002).
- [105] Lin, Y.M., Zhou, Y., Flavin, M.T., Zhou, L.M., Nie, W., Chen, F.C., "Chalcones and Flavonoids as Anti-Tuberculosis Agents." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **10**: 2795-2802 (2002).
- [106] Sinha, P., Kumar, S., Darokar, M. P. And Khanuja, S. P. S., "Isolation of Oxidative Stress Response Mutants in *Escherichia coli* for Their Use as a Genetic Screen to Identify New Anti-mycobacterials as Functional Analogues of Isoniazid", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **8**: 791-798 (2006).
- [107] Tosun, F.A.K., Ç., Şener, B., ve Vural, M., "The Evaluation of Plants from Turkey for in Vitro Antimycobacterial Activity", *Pharmaceutical Biology*, **43**(1): 58-63 (2005).
- [108] Rastagi, N., Abaul, J., "Antimycobacterial Activity of Chemically Defined Natural Substances from the Caribbean Flora in Guadeloupe", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **4**: 267-273 (1998).
- [109] Martin, A., Takiff, H., Vandamme, P., Swings, J., Palomino, J. C., Portaels, F., "A New Rapid and Simple Colorimetric Method to Detect Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium Tuberculosis Using Nicotinamide." *J Antimicrob Chemother.*, **58**: 327-331 (2006).
- [110] NCCLS, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 9th International Supplement", **M100-S9**: (1999).
- [111] Bassan, A., Adwan, G., Dahood, A., Jarar, N., Kamel Adwan, K., "Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine", *Tubitak*, **84**: 99-102 (2004).
- [112] Tepe, B., Daferera D., Sokmen A, Sokmen, M., Polissiou, M., "Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Various Extracts of *Salvia Tomentosa* Miller (*Lamiaceae*)", *Food Chemistry*, **90**: 333-340 (2005).
- [113] Dettrakul, S., P. Kittakoop, et al., "Antimycobacterial Pimarane Diterpenes from the Fungus *Diaporthe* Sp." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**(7): 1253-1255 (2003).

- [114] Okunade, A.L., M. P. F. Elvin-Lewis, et al., "Natural Antimycobacterial Metabolites: Current Status", *Phytochemistry*, **65**: 1017-1032 (2004).