



**BAZI TIBBİ BİTKİLERİN FARKLI EKSTRAKSİYON  
KOŞULLARINDA ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI**  
**Ümmühan ÜNLÜ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Programı  
Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ  
Nisan-2016**

**T.C**  
**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI TIBBİ BİTKİLERİN FARKLI EKSTRAKSİYON KOŞULLARINDA  
ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ümmühan ÜNLÜ**

**Anabilim Dalı : Biyoloji**

**Programı : Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ**

**KARAMAN-2016**

## TEZ ONAYI

Ümmühan ÜNLÜ tarafından hazırlanan “**Bazı Tıbbi Bitkilerin Farklı Ekstraksiyon Koşullarında Elde Edilen Özütlerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi ve Karşılaştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

(Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Kamil Özdağ Fen Fak. Biyoloji Bölümü)

İmza:



Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

(Başkent Üniversitesi  
Transplantasyon ve Gen Bilimleri)



Doç. Dr. Meltem KARS

(Selçuk Üniversitesi  
Çevre Koruma)



Tez Savunma Tarihi: 11/04/2016

**Yukarıdaki Sonucu Onaylarım**



Doç. Dr. Ahmet İpek

**Enstitü Müdürü**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Ümmühan ÜNLÜ**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAZI TIBBİ BİTKİLERİN FARKLI EKSTRAKSİYON KOŞULLARINDA ELDE EDİLEN ÖZÜTLERİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIRILMASI

Ümmühan ÜNLÜ

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Nisan, 2016, 115 sayfa

Tüm dünyada tıbbi açıdan önemli bulunan bitkiler halk arasında kullanılmaktadır ve doğal olarak yetişen bazı bitkilerin sahip olduğu antimikrobiyal etkileri yıllardır bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, bitkisel materyallerin içindeki fitokimyasal bileşiklerin güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, Karaman ili bölgesinde yetişen *Alkanna orientalis*, *Anchusa officinalis*, *Cruciata taurica*, *Delphinium peregrinum*, *Euphorbia macroclada*, *Moltkia coerulea*, *Myosotis ramosissima*, *Ranunculus argyraeus*, *Veronica multifida* ve *Vicia canescens* ssp. *gregaria* olmak üzere 10 farklı bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi araştırıldı. Bitkilerin gövde kısımları kurutulup öğütüldükten sonra su ve hekzan kullanılarak ekstraksiyonları yapıldı. Özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Klebsiella pneumonia* bakterilerine karşı test edildi. *Cruciata taurica* su özütü DPPH metoduna göre en düşük EC<sub>50</sub> değerine sahiptir. Hatta, bu özüt en yüksek fenolik içerik miktarına da sahiptir. Buna karşılık, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *A.tumefaciens*'e karşı 14mm inhibisyon zonu ile *Alkanna orientalis* su özütü göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tıbbi bitki, Antioksidant aktivite, Antimikrobiyal aktivite, *Alkanna orientalis*

## ABSTRACT

Ms Thesis

### DETERMINATION AND COMPARISON OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF EXTRACTS OBTAINED AT DIFFERENT EXTRACTION CONDITIONS OF SOME MEDICAL PLANTS

Ümmühan ÜNLÜ

Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ

April, 2016, 115 Pages

Medicinally important plants are used among general public all over the world and antimicrobial effects of some naturally grown plants have been known for years. Performed studies showed that phytochemical compounds found in plant materials have intense antioxidant and antimicrobial activity. Therefore, in this study, antioxidant and antimicrobial activities of ten different plant species being of *Alkanna orientalis*, *Anchusa officinalis*, *Cruciata taurica*, *Delphinium peregrinum*, *Euphorbia macroclada*, *Moltkia coerulea* *Myosotis ramosissima*, *Ranunculus argyraeus*, *Veronica multifida* and *Vicia canescens* ssp. *gregaria* grown in Karaman province were investigated. After being dried and grinded, extractions of stem parts of plants were carried out by using water and hexane. Antimicrobial activities of extracts were tested against *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Agrobacterium tumefaciens* and *Klebsiella pneumonia*. *Cruciata taurica* water extract had the minimum EC<sub>50</sub> value with respect to DPPH method. It also has the highest total phenolic content. On the other hand, *Alkanna orientalis* water extract showed the highest antimicrobial activity with 14mm inhibition zone against *A.tumefaciens*.

**Keywords:** Medicinal plant, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, *Alkanna orientalis*

## ÖN SÖZ

Günümüzde antibiyotikler uygunsuz olarak kullanılmaktadır. Enfeksiyonun bakteriyel kökenli olduğunu saptamak için gereken tanı testlerinin yeterli olarak yapılmaması, enfeksiyon olmaksızın antibiyotik kullanılması, yanlış antibiyotik seçilmesi, uygun dozda kullanılmaması, doz aralıklarına dikkat edilmemesi, gerekli olmadığı halde bir ya da birden fazla antibiyotiğin aynı anda alınması, kültür sonucuna uygun olmayan antibiyotik kullanılması antibiyotiğin uygunsuz kullanımına örneklerdir. Bu tür kullanımlara bağlı olarak normal flora olarak adlandırılan ve insan vücuduna fayda sağlayan mikroorganizmalar olumsuz etkilenmektedir. Aynı zamanda mikroorganizmalarda direnç gelişmektedir. Dirençli mikroorganizmalar mevcut antibiyotiklerden etkilenmeyerek tedavisi güç enfeksiyon hastalıklarını oluşturmaktadır. Hastaların hastanede yatma süreleri uzamakta ve tedavi maliyeti artmaktadır. Bu nedenle, mikroorganizma kaynaklı enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanmak için yeni antimikrobiyal maddelere ihtiyaç vardır. Bu amaca yönelik olarak bu tez çalışması yapılmıştır.

Tez çalışmalarımda bana yol gösteren, tez gelişimini titizlikle inceleyen, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aytac KOCABAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Buğrahan EMSEN'e, her zaman destek olan çalışma arkadaşlarım Yasemin BAŞKAYA, Nermin GÜMÜŞTAŞ, İbrahim SAVRAN ve Serap GÖNEK'e teşekkür ederim. İsimlerini anmadığım veya anmayı unuttuğum, tezimin olgunlaşma sürecinde bana katkı sağlayan tüm dostlarıma yürekten teşekkür ederim. 01-YL-14 nolu proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim. Son olarak çalışmam boyunca benimle beraber tüm sıkıntılara katlanıp sabır gösteren hayat arkadaşım, sevgili eşim Sedat ÜNLÜ'ye, ayrıca beni manevi olarak destekleyen ve varlığıyla beni her zaman mutlu eden kızım Ayşe Naz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Ümmühan ÜNLÜ**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>ÖN SÖZ</b> .....	v
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	x
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	4
2.1. Bitkilerin Kullanım Şekilleri .....	4
2.1.1. Tıbbi Amaçlı Olarak Kullanımları .....	4
2.1.2. Kozmetikte Kullanımları .....	9
2.1.3. Gıda Endüstrisinde Koruyucu Olarak Kullanımları .....	10
2.1.4. Anti-Helmintik Olarak Kullanımları .....	11
2.1.5. Zirai Mücadelede Kullanımları .....	11
2.1.6. Hayvanlar Üzerinde Kullanımları .....	12
2.1.7. Doğal Boyamacılıkta Kullanımları .....	14
2.1.8. Anti-Fungal Olarak Kullanılmaları .....	14
2.2. Tıbbi Bitkilerdeki Etken Maddeler.....	15
2.2.1. Fenolik Bileşikler .....	17
2.2.2. Polifenoller .....	20
2.2.3. Karotenoidler .....	21
2.2.4. Diğer Tanınmış Fitokimyasallar .....	22
2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri .....	24
2.3.1. Ekstraksiyon Parametreleri.....	25
2.3.2. Mekanik Ekstraksiyon .....	27
2.3.3. Çözücü Ekstraksiyonu .....	28
2.3.4. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon .....	31
2.3.5. Süperkritik Akışkanlarla Ekstraksiyon.....	32
2.3.6. Diğer Ekstraksiyon Yöntemleri .....	33



	<b><u>Sayfa</u></b>
2.4. Antimikrobiyal Aktivite .....	37
2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	43
2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi .....	45
2.5.2. E-Test Yöntemi .....	46
2.5.3. Tüp Dilüsyon Yöntemi .....	46
2.5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi .....	47
2.6. Antioksidan Aktivite .....	48
2.6.1. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri.....	52
2.6.2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları .....	54
2.6.3. Antioksidanların Sınıflandırılması .....	55
2.7. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	55
2.7.1. Hidrojen Atomu Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayanan Yöntemler .....	56
2.7.2. Elektron Transferi (ET) Reaksiyonlarına Dayanan Yöntemler.....	58
2.8. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri .....	64
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>67</b>
3.1. Materyal.....	67
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar .....	67
3.1.2. Kullanılan Bitkiler .....	67
3.1.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları .....	67
3.2. Metot .....	68
3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Elde Edilmesi.....	68
3.2.2. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi .....	68
3.2.3. DPPH Radikal Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi.....	69
3.2.4. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi .....	69
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>71</b>
4.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği.....	72
4.2. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Yakalama Etkileri.....	74
4.3. Örneklerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi .....	77
4.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri .....	80
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>82</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>91</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>104</b>

	<b><u>Sayfa</u></b>
EK A .....	104
EK B .....	109
EK C .....	110
EK D .....	111
EK E .....	112
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>114</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2. 1:</b> Bazı serbest radikal türleri .....	49
<b>Çizelge 4. 1:</b> Örneklerin ekstraksiyon verimi.....	71
<b>Çizelge 4. 2:</b> Kuru örneklerin 1 gramındaki toplam fenolik madde miktarı .....	74
<b>Çizelge 4. 3:</b> Su ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikallerini yakalama aktiviteleri .....	75
<b>Çizelge 4.4:</b> Hekzan ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikallerini yakalama aktiviteleri.....	76
<b>Çizelge 4. 5:</b> Örneklerin DPPH yakalama aktivitelerinin EC <sub>50</sub> değerleri .....	77
<b>Çizelge 4. 6:</b> Örneklerin disk difüzyon yöntemi ile antibiyogram sonuçları .....	79
<b>Çizelge 4. 7:</b> Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zonları .....	79
<b>Çizelge 4. 8:</b> Örneklerin bazı test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri.....	81

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1	: Flavonoidlerin kimyasal yapıları .....	18
Şekil 2. 2	: Soxhlet Ekstraktörü .....	30
Şekil 2. 3	: Fleming tarafından uygulanan antibiyotik duyarlılık deneyi .....	43
Şekil 2. 4	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı .....	63
Şekil 4. 1	: Su özütlerinin toplam fenolik madde miktarları .....	73
Şekil 4. 2	: Hekzan özütlerinin toplam fenolik madde miktarları .....	73
Şekil Ek A. 1	: <i>Alkanna orientalis</i> (Tosbağa Otu) bitkisi .....	104
Şekil Ek A. 2	: <i>Anchusa officinalis</i> (Sığır Dili) bitkisi .....	104
Şekil Ek A. 3	: <i>Cruciata taurica</i> bitkisi .....	105
Şekil Ek A. 4	: <i>Delphinium peregrinum</i> (Hezaren Saray Çiçeği) bitkisi .....	105
Şekil Ek A. 5	: <i>Euphorbia macroclada</i> (Sütleğen) bitkisi .....	106
Şekil Ek A. 6	: <i>Moltkia coerulea</i> (Anadolu Taşkesen Otu) bitkisi .....	106
Şekil Ek A. 7	: <i>Myosotis ramosissima</i> (Unutma Beni Çiçeği) bitkisi .....	107
Şekil Ek A. 8	: <i>Ranunculus argyraeus</i> (Düğün Çiçeği) bitkisi .....	107
Şekil Ek A. 9	: <i>Veronica multifida</i> (Mine Çiçeği) bitkisi .....	108
Şekil Ek A. 10	: <i>Vicia canescens</i> ssp. <i>gregaria</i> (Fiğ) bitkisi .....	108
Şekil Ek B. 1	: Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi..	109
Şekil Ek C. 1	: DPPH İçin Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi .....	110
Şekil Ek D. 1	: <i>Cruciata taurica</i> bitkisi için % inhibisyon grafiği .....	111
Şekil Ek E. 1	: <i>Alkanna orientalis</i> bitkisinin su ekstresinin sekiz test mikroorganizmasına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite .....	112
Şekil Ek E. 2	: <i>Alkanna orientalis</i> bitkisinin hekzan ekstresinin sekiz test mikroorganizmasına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite .....	113

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
mm	Milimetre
nm	Nanometre
L	Litre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
kg	Kilogram
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mM	Milimolar
N	Normalite
dH <sub>2</sub> O	Distile su
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü)
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
MHz	Megahertz
KHz	Kilohertz
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
DMSO	Dimetil sülfoksit
Troloks C	6- hidroksil-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
ABTS	2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat)
AAPH	2,2-azobis (2-aminopropan) diklorit
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Süperoksit Radikali
•OH	Hidroksil Radikali
O <sub>2</sub>	Singlet Oksijen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit
LOOH	Lipid hidroperoksit

<b>R-PE</b>	R-fikoeritrin
<b>Cu</b>	Bakır
<b>Ig G</b>	İmmünglobulin G
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit

### **Kısaltmalar**

### **Açıklama**

<b>MÖ</b>	Milattan Önce
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	Ribo nükleik asit
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>MSSA</b>	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MRSA</b>	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>ORAC</b>	Oksijen Radikal Absorbans Kapasite
<b>TRAP</b>	Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre
<b>CUPRAC</b>	Oksidan Olarak Cu (II) Kullanılan Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi
<b>TEAC</b>	Troloks eşiti antioksidan kapasite
<b>FRAP</b>	Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standarts Institute
<b>EUCAST</b>	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>ADTS</b>	Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>LDL</b>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>GAE</b>	Gallik asit eşdeğeri
<b>KOB</b>	Koloni Oluşturan Birim
<b>SÇE</b>	Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu
<b>SAE</b>	Süperkritik Akışkanlarla Ekstraksiyon

**KFME**

Katı Faz Mikro Ekstraksiyon

**MDE**

Mikrodalga Destekli Ektraksiyon

**UEDE**

Ultrasonik Enerji Destekli Ekstraksiyon



## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu var olduğu günden beri besin ve ilaç kaynağı olarak bitkileri kullanmış, vücudunda meydana gelen herhangi bir rahatsızlık durumunda çare olarak bitkilere yönelmiştir (Koç, 2012). İlk çağlardan beri insanlar hangi bitkileri besin kaynağı olarak tüketebileceğini, hangi bitkilerin zehirli ya da şifalı olduğunu deneme yanılma yoluyla öğrenmişlerdir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Koyuncu ve ark., 2008). Ürettikleri veya topladıkları bitkilerdeki esas etken maddeyi basit yöntemler kullanarak elde etmeyi başarmışlardır (Koyuncu ve ark., 2008). Eski uygarlıkların bitkileri kullanımıyla ilgili bilgiler kitabeler ve arkeolojik materyallerde bahsedilmektedir. Bu materyallere göre MÖ 50000 yıllarında yontma taş devrine ait bilgiler mevcuttur (Kaya, 2010). Bitki ekstraktlarından hazırlanan ilaçların kullanımı MÖ 2700'lü yıllarda Çin'e kadar uzanmaktadır. Eski mısırdaki kazılarda bitkilerin gıdalarda kullanıldığı ile ilgili ilk yazılı kayıtlar elde edilmiştir. MÖ 2500 yıllarında mısırdaki cesetleri mumyalamak için nane ve çeşitli bitki ekstraktlarının kullanıldığı bilinmektedir. Bu bitki ekstraktları ile cesetler muamele edilmekte ve uygulanan diğer yöntemler sayesinde mumyalar uzun yıllar boyunca bozulmadan muhafaza edilmekteydi. Birçok kutsal kitapta da bitkilerin hem şifa hem de güç kaynağı olduğundan bahsedilmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Mısır dönemine ait MÖ 1550 yılında yazılmış bir papürüse göre, yaklaşık 450 civarında kayıtlı hastalık ve bu hastalıkların tedavisinde nebati ve hayvani maddelerden elde edilen ilaçların kullanıldığı saptanmıştır. MÖ 460-377 yılları arasında yaşayan ve tıbbın babası olarak anılan Hipokrates yaşadığı dönemde kullanılan 400 tür bitkiden söz etmiştir. Ünlü Türk bilgini İbn-i Sina "Şifa" ve "Kanun fit-Tıb" adlı eserlerinde tıbbi bitki, inorganik ve hayvani kökenli 900'den fazla ilaçtan bahsetmiştir (Kaya, 2010). Kuzey Irak'ta bulunan Şanidar Mağarası'nda, 1957 yılında yapılan kazılarda altmış bin yıl öncesine ait olduğu tahmin edilen, gülhatmi, civanperçemi, kanarya otu, peygamber çiçeği, ebegümece, mor sümbül ve efedra gibi bitki türlerinin bulunduğu belirtilmektedir (Dağcı ve ark., 2002; Gül, 2014). Hitit dönemine ait tabletlerde bulunan reçetelerde kayıtlı olan bitki adları, Anadolu halkının eski dönemlerden beri bitkileri tedavi amacıyla kullandığını göstermektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Türkiye bitkisel çeşitlilik yönünden oldukça zengin bir floraya sahiptir (Şahin, 2009). Üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunmaktadır. Anadolu, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü görevi yapmakta, pek çok cins ve seksiyonun orijin ve



farklılaşım merkezini oluşturmaktadır. Ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucu olarak da tür endemizmi yüksek olmaktadır (Toroğlu ve enet, 2006; şahin, 2009; opuroğlu, 2013; Karankı, 2013 ). Ülkemizde 9000 civarında doğal olarak yetişen bitki türünün %30'u endemiktir. Ancak yetişen bu bitki türlerinden yeterince faydalanılmamaktadır (şahin, 2009; Karankı, 2013).

Ülkemizde, bitkilerin tıbbi kullanımında en yaygın yöntem bitki ayı şeklindedir (Koç, 2012). Bunun dışında, günümüzde çeşitli boya, koku ve tat sanayisi, temizlik malzemeleri, süs eşyası, gıda katkıları, kozmetik sanayisi ve zirai mücadele gibi sektörlerde de yaygın kullanılmakta ve her geçen gün yeni kullanım alanları keşfedilmektedir (Koç, 2012; opuroğlu, 2013).

1926 yılından bu yana bitkilerin insan sağlığı açısından önemli özellikleri ve mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisi laboratuvarlar da araştırılmaya başlanmıştır (Toroğlu ve enet, 2006; şahin, 2009; Karankı, 2013). Dünya geneline baktığımız zaman nüfusun %64'ü tedavi amacıyla bitkileri kullanmaktadır (Koç, 2012). Dünya Sağlık Örgütü verileri bu oranın gelişmekte olan ülkelerde %80'e yükseldiğini ve 3,3 milyar insanın tedavi olmak amacıyla tıbbi bitkilerden faydalandığını göstermektedir (şahin, 2009). Gelişmiş ülkelerde ise reçeteli ilaçların %25'inin içindeki kimyasal maddeler bitkilerden köken almaktadır (Koç, 2012). Günümüzde en çok satan ilaçların 1/3'ü ya doğal ürünlerden ya da doğa tarafından sağlanan ürünlerden elde edilmektedir. Bu alanda geleneksel bitkiler sıklıkla kullanılmaktadır (Rifai ve ark., 2005).

Dünya genelinde bulunan bitki türü sayısı 750000-1000000 olarak tahmin edilmektedir (Kaya, 2010). Sistematikiler tarafından yapılan araştırmalara göre, tanımlı yapılmış yaklaşık 500 bin bitki çeşidi bulunmaktadır (Koyuncu ve ark., 2008; Kaya, 2010). Dünya sağlık örgütünün yaptığı araştırmalara göre ise, bu bitkilerden 20.000 kadarı tedavi amacıyla kullanılmakta ve 500 kadarının ticareti yapılmaktadır (Toroğlu ve enet, 2006; Koyuncu ve ark., 2008; şahin, 2009; Koç, 2012; Ertaş ve ark., 2012; Karankı, 2013). Ayrıca kullanılan bitkilerin çok azı farmakopelerde kayıtlıdır (şahin, 2009). Örneğin Türkiye'de kayıtlı bitki sayısı 140 civarındayken halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı daha fazladır (şahin, 2009; Ertaş ve ark., 2012; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Tüm dünyada tıbbi açıdan önemli bulunan bitkiler halk arasında kullanılmakta ve doğal olarak yetişen bazı bitkilerin sahip olduğu antimikrobiyal etkileri yıllardır bilinmektedir. Bitkilerin içerdikleri etkili maddeler sayesinde antimikrobiyal etki gösterdikleri saptanmıştır (Şahin, 2009). Yapılan çalışmalar, bitkisel materyallerin içindeki fitokimyasal bileşiklerin güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal antioksidan ve antimikrobiyaller, sentetik antioksidan ve koruyuculara alternatif olduğu için yoğun bir ilgi oluşturmuştur (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bu etkili maddeleri oluşturan bileşiklerin miktarı bitkiler arasında değişiklik göstermekte ve bitkinin yetiştiği yer, iklim şartları, mikroorganizmaların türüne bağlı olarak antimikrobiyal etkileri değişmektedir (Şahin, 2009).

İnsanların doğal ürünlere olan talebi günden güne artmakta ve doğrudan bitkilere yönelmektedir. Bunun nedenlerinden biri 20. Yüzyıl başlarında üretilen ilaçların %40'ı tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilirken, 1970'li yıllardan sonra bu oranın %5'lere kadar düşmesidir (Çopuroğlu, 2013). Diğer nedenleri, bitkilerin kolay ve ucuz tedavi imkânı sağlaması, etkilerinin daha geniş olması, sentetik ilaçların daha tehlikeli yan etkilerinin olması ve bakterilerin sentetik ilaçlara karşı daha kolay dirençli suşlar oluşturmasıdır (Şahin, 2009; Çopuroğlu, 2013). Bitkisel drogların çok uzun süredir kullanılıyor olması istenmeyen ve beklenmeyen etkilerinin daha iyi bilinmesini sağlamıştır (Şahin, 2009). Ancak geleneksel olarak kullanılan bazı bitki türlerinin fazla kullanılması nedeniyle, bu türlerin sayısı giderek azalmaktadır. Bu nedenle insanlar tarafından kullanılan ve henüz etkisi keşfedilmemiş birçok bitki türünün yok olmadan önce araştırılması önem taşımaktadır (Çopuroğlu, 2013).

Bu çalışma, belirlenen bitki türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması ve kullanılan çözücüye bağlı olarak antimikrobiyal aktivitedeki değişimlerin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

## **2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Bitkilerin Kullanım Şekilleri**

Yontma taş devrinden beri insanlar Anadolu'da yaşamakta ve bitkileri 50000 yıldan beri farklı alanlarda kullanmaktadır (Özbek, 2005). Tıp, baharat, ilaç sanayi, meşrubat, parfüm, sabun, şekerleme, kozmetik, diş macunu, çiklet, şifalı ve dinlendirici çay imalatı, esans, aroma, süs ve peyzaj kullanım alanlarından bazılarıdır (Sıcak ve ark., 2013; Gül, 2014).

#### **2.1.1. Tıbbi Amaçlı Olarak Kullanımları**

Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bileşimlerin kaynağını tıbbi bitkiler oluşturmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Halep'in güneyinde Ebla yakınlarında bulunan çivi yazısıyla yazılmış olan tabletler, en az 5000 yıldan beri tedavi amacıyla bitkilerin kullanıldığını göstermektedir (Dağcı ve ark., 2002; Sıcak ve ark., 2013). Tarih öncesi dönemlerden başlayarak Mezopotamya, Eski Mısır, Hitit, Yunan, Roma, Selçuklu ve Osmanlı dönemlerinden beri bitkisel ilaçların kullanıldığı bilinmektedir. Tıpta sıklıkla kullanılan birçok ilaç bitkilerden (kınakına bitkisinden elde edilen kinin, haşhaştan üretilen morfin, söğüt kabuğu kullanılarak elde edilen asetil salisilik asit, yüksükotundan üretilen digoksin, güzel avratotu bitkisinden elde edilen atropin ve hiyosin gibi) elde edilmektedir (Özbek, 2005; Harput, 2010). İlaç hammaddesi olan bu bitkiler daha ucuz, doğal, toksik ve yan etkilerinin daha az olması nedeniyle hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ilgi görmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Günümüzde "tıbbi bitkilerle tedavi" anlamında Fitoterapi tanımı kullanılmaktadır (Özbek, 2005). Bazı ülkelerde tamamlayıcı-destekleyici alternatif tıp olarak da adlandırılmaktadır (Erdem ve Ata Eren, 2009). Fitoterapi, tedavi edici özelliği olan taze veya kurutulmuş bitkilerin ya da bu bitkilerden çıkarılan özlerden elde edilen çay, damla, kapsül, tablet, draje, şurup gibi ürünlerin kullanılarak hastalıkların tedavi edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Özbek,2005).

Bitkisel ürünlerin tedavi için kullanımı bölgelere göre farklılık göstermektedir. Afrika ülkeleri modern ilaçlara erişim güçlüğü yaşadığı için nüfusun %80'i bitkisel ürünleri kullanmaktadır. Ancak gelişmiş ülke toplumlarında bu oran %50 civarına düşmektedir.

Çin ve Hindistan gibi eskiden beri bitkileri tedavi için kullanan ülkelerde ise hala nüfusun %65'i düzenli olarak bu ürünleri tüketmektedir (Uzun ve ark., 2014).

Bitkilerin modern tıp uygulamalarında kullanılması insanların tıbbi ve aromatik bitkilerle tedaviye olumlu bakmalarını sağlamıştır. Bazı ülkelerdeki doktorlar artık sentetik ilaçlar yerine bitkisel ilaçları reçete edebilmektedir (Sıcak ve ark., 2013). İsviçre, Almanya, Fransa gibi ülkelerde modern tıpla bitkisel ilaçları birleştirmek için bir eğilim mevcuttur. Tıp fakültesinde olan her öğrenci fitoterapi derslerini zorunlu olarak almaktadır. Hekimlerin %80'i reçetelere düzenli bir şekilde bitkisel ilaçları yazmaktadır. Almanya'da eczaneler tarafından bitkisel ilaçların %80'i hazırlanmakta ve bu ilaçların %42'si reçeteli ilaçlar grubunda bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bitkisel ilaç satışları 1997 yılında bir önceki yıla göre %9 oranında artış göstermiş ve hastaların %5'i bitkisel tedaviyi temel tedavi olarak almaktadır. Amerika yılda 3,24 milyar doları bu tedaviler için kullanmakta, İngiltere ise bitkisel tedavi için 40 milyon sterlin harcamaktadır (Özbek, 2005).

Bitkilerin tedavi edici özelliği, bitkinin yapısında bulunan çok sayıda bileşimin oluşturduğu sinerjik etkiden kaynaklanmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bitkilerden sentezlenen flavonoid, alkaloid, berberin, kinin, terpenoid, emetin ve tanin gibi kimyasal maddeler insanlar üzerinde önemli biyolojik etkilere sahiptir. Bu kimyasalların, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve içerdiği bileşimlerin tek tip antibiyotiğe karşı direnç kazanan mikroorganizmaların yok edilmesinde daha etkin bir tedavi sağladığı kaydedilmektedir (Hussain ve ark., 2011; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Suudi Arabistan'da yapılan bir araştırmada siyah çayın kalp hastalığı riskini azalttığı yönünde bulgular mevcuttur. Araştırmaya katılan 30 ile 70 yaş arası deneklerin %20'sinin günde 6 fincandan fazla çay tükettikleri belirtilmektedir. Siyah ve yeşil çayda flavonoid adındaki antioksidan maddenin bol miktarda bulunduğu, araştırmaya katılan deneklerinin bazılarının sağlıksız beslenme ve sigara kullanımı öyküsü olmasına rağmen çay içindeki bu antioksidan maddenin kalp hastalığı riskini önemli oranda engellediği saptanmıştır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Bazı bitkiler taze ya da kronik yaraları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Tropik bir bitki olan *Aloe vera* sıcak ve nemli iklimlerde yetişmekte ve uzun yıllardır yanık tedavisinde uygulanmaktadır. 1. ve 2. derece yanıklarda iyileşmeyi hızlandırdığı, tedavi süresini kısalttığı ve epitelyum oluşum hızını artırdığı saptanmıştır (Durusoy ve Gözel Ulusal, 2007; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). *Aloe vera* jelinin radyodermitle hastalarda kullanımı kaşıntı, yanma hissi ve skar doku oluşumunu azaltmaktadır (Durusoy ve Gözel Ulusal, 2007). Yapılan başka bir çalışmada, *Terminalia arjuna* ekstraktı gastrik ülser oluşturulan ratlarda kullanılmıştır. Ratlara farklı dozlarda diclofenac sodium verilmiş ve ülser oluşumu sağlanmıştır. *Terminalia arjuna* bitki ekstraktı farklı konsantrasyonda ratlara uygulanmış ve ülser yaralarının iyileşmesinde etkisi olduğu saptanmıştır (Devi ve ark., 2007; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Çiğertaze otu (Ada çayı, *Salvia officinalis*) ekstraktının sindirimi düzenleme, öksürüğü engelleme, yüksek tansiyonu düşürme, gece terlemelerini azaltma, öksürüğü engelleme, kanı temizleme gibi etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Arıduru ve Arabacı, 2013). Gargara solüsyonu şekline getirilerek ağız yaraları, boğaz ağrıları, diş eti hastalıkları ve bademcik enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Östrojen salgısını artırma özelliği sayesinde menapoz dönemindeki şikâyetleri azalttığı ve Parkinson hastalığında meydana gelen sekresyon artışını önlediği belirtilmektedir (Bahtiyarca Bağdat, 2006).

Sarımsak (*Allium sativum*) geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yüksek olan kan basıncı, kolesterol ve trigliserit seviyelerini normale düşürerek kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Kandaki fibrin seviyesini azaltıp plakçık oluşmasını engellemekte ve bu sayede kalp krizi riskini azaltmaktadır. Kuvvetli ve doğal bir antiseptiktir. İçeriğindeki allisin sayesinde bakteri, virüs ve protozoonlar üzerinde antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır (Ağbaş ve ark., 2013).

Kekik (*Thymus vulgaris*) halk arasında balgam söktürücü ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Öksürük ve üst solunum yolu enfeksiyonların da çay ya da gargara şeklinde tüketilmektedir. Bunun yanında sindirim sistemi ile ilgili şikâyetleri azaltmaktadır. Menstrüasyon dönemindeki ağrıları azaltmakta ve ergenlik sivilcelerinin iyileşmesini sağlamaktadır. Böbrek taşlarını düşürme, vücuttaki yağları eritme, tansiyonu geçici olarak düşürme, diş ağrısını giderme, kan şekerini düşürücü ve idrar söktürücü etkileri bulunmaktadır (Benli ve Yiğit, 2005).

Üreme sistemi ile ilgili birçok şikâyetle bitkilerden faydalanılmaktadır. Adet düzenleyici olarak *Apium graveolens* (kereviz), *Petyroselinum crispum* (maydanoz); adet sancılarını gidermek için *Potentilla anserina* (beşparmakotu); gonore hastalığını tedavi etmek için *Oleum pini*, *Oleum templini* (çam yaprağı esansı); seks hormonlarının regülasyonu için *Cimicifuga racemosa* (simisifuga, karayılan kökü, fare otu) bitkilerinin kullanıldığı belirtilmektedir (Özbek, 2005).

Kuşburnu bitkisi Hipokrat zamanından beri tıbbi olarak kullanılmaktadır. İltihap sökücü, dış eti kanamalarını önleyici ve kabız yapıcı özelliği bulunmaktadır. Ayrıca böbrek, safra ve mesane taşlarına etki göstermektedir. Halk arasında antidiyabetik olarak da kullanılmaktadır (Akçiçek, 2010). Katırtırnağı bitkisinin çiçekleri çay şeklinde demlenerek halk arasında tüketilmektedir. Böbrek taşı, kalp hastalıkları, balgam sökücü ve idrarla ilgili şikâyetlerin tedavisi için kullanılmaktadır (Sıcak ve ark., 2013). Anason tohumundan elde edilen yağ bit ve uyuz tedavisinde kullanılmaktadır. Antibakteriyel ve antiparaziter etki göstermektedir. *Melisa officinalis*'den elde edilen yağ *herpes simplex* üzerinde antiviral etki göstermektedir (Durusoy ve Gözel Ulusal, 2007).

19. yüzyılda zeytin yaprağının ateş düşürücü etkisi tespit edilmiştir. Bakteri, virüs ve mantarlara karşı antimikrobiyal etki göstermektedir. İçeriğinde bulunan Oleuropein'in, viral hemorajik septisemi etkeni olan *Rhabdovirus* (VHSU) üzerinde antiviral etki gösterdiği saptanmıştır. HIV hastalarında kullanılan zeytin yaprağı ekstresinin, immün sistemi güçlendirdiği ve oral kullanılan ilaç tedavisinin etkinliğini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda HIV'e bağlı ortaya çıkan Kaposi sarkomunu tedavi etmek için kullanılmıştır (Akçiçek, 2010).

Ceviz (*Juglans regia*), halk arasında geleneksel olarak tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Yeşil kabuk ve yaprak kısımları antidiyaretik, antifungal, antihelmintik, kanama durdurucu ve damarları güçlendirici olarak kullanılmaktadır. Bazı Avrupa ve Asya ülkelerinde kurutulmuş ceviz yaprağı çay olarak tüketilmektedir. Yeşil kabuk ve yaprak kısımları özellikle flavonoidler olmak üzere fenolik maddelerce zengindir. Bu fitokimyasallar oksidatif stresi azaltarak ve moleküllerin oksidatif hasara uğramasını engelleyerek dejeneratif hastalıklardan korunmayı sağlamaktadır. Ayrıca serbest radikalleri süpürücü etkisi ile antikanserojenik olarak görev almaktadır (Yiğit ve ark., 2009).

Bitkilerle tedavi doğal bir yöntemdir ama doğal olması her zaman güvenli olduğu anlamına gelmemektedir (Özbek, 2005). Fitoterapi yaygın kullanılmasına rağmen tıbbi klinik uygulamalarda yan etkileri henüz tanımlanmamış ve ortaya çıkan istenmeyen sonuçların sadece bir kısmının rapor edildiği tahmin edilmektedir (Erdem ve Ata Eren, 2009). Tüketiciler bitkisel ürünleri masum olarak görmekte ve ortaya çıkan şikâyetleri yeni bir hastalık olarak düşünmektedir. Bu nedenle bu şikâyetleri doktoruna bildirmemektedir (Aydos, 2011).

Bitkisel ilaçların kullanılan diğer ilaçlarla olan etkileşimleri konusunda veriler azdır ve yeni incelenmeye başlanmıştır. Tüketilen bitkisel ürünler aktif olarak kullanılan ilaçların etkisini arttırma ya da azaltma şeklinde etki gösterebilmektedir (Erdem ve Ata Eren, 2009). Örneğin ginseng bitkisi aktif kullanılan diyabet ilaçlarıyla beraber tüketilirse hipoglisemiye neden olabilmektedir. Antihipertansifler ile beraber, karaciğeri temizlemek için kullanılan karahindiba (*Taraxacum officinale*) hipotansiyon riskine neden olmaktadır (Demirezer, 2010). Ayrıca tüketilen bitkisel ürünlerin ilaçlarla etkileşime girerek toksik olabileceği gösterilmiştir (Özbek, 2005). Ma Huang (*Ephedra sinica*) efedrin içeren, zayıflatıcı ajan olarak ve astım tedavisinde kullanılan bir bitkidir. Ancak bu bitkinin kullanımına bağlı hipertansiyon, kalp krizi, inme, nöbet ve psikoz gibi toksik etkileri saptanmıştır. Aşırı sempatomimetik uyarı sonucunda ölüm vakaları bildirilmiştir (Aydos, 2011). Tıbbi olarak kullanılan bazı bitkilerin hepatotoksik etkilerinin bulunduğu yönünde yayınlar bulunmaktadır (Özbek, 2005). Bitkisel ilaçların besinlerle olan etkileşimleri ise hiç ele alınmamaktadır (Erdem ve Ata Eren, 2009). Bunun yanında bitkilerin aşırı olarak tüketilmeleri de istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Örneğin, aşırı miktarda tüketilen sarımsak (*Allium sativum*) böbrek, karaciğer ve kalp üzerinde zararlı etkilere neden olabilmekte (Demirezer, 2010) ve cerrahi operasyondan önce tüketilen sarımsağın platelet agregasyonunu engellediği için ameliyat sonrası kanamaya eğilimi arttırdığı belirtilmektedir (Gezmen Karadağ ve ark., 2013). 15 g/gün'den fazla tüketilen adaçayı (*Salvia officinalis*) ateş, titreme ve konvülziyonlara sebep olmaktadır (Demirezer, 2010).

Bitkinin sistematik açıdan teşhis ve adlandırmasının doğru yapılmaması istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Örneğin, çok zehirli bir bitki olan baldıran otu (*Conium maculatum*) yaprağı maydanoza (*Petroselinum crispum*) benzemektedir (Erdem ve Ata Eren, 2009). Fitoterapide kullanılan bitkilerin tür düzeyinde teşhisi yapılmalı, kimyasal

ve mikrobiyolojik yönden kontrollü, içindeki etken madde miktarı belirli, standardize edilmiş ve hijyenik koşullarda ambalajlanarak hastaya sunulması gerekmektedir (Özbek, 2005).

Günümüzde zayıflatıcı ve anti-kanser özelliği olduğu iddia edilen bitkisel karışım çaylar ilgi görmektedir. Ancak kansere iyi gelen bitkiler sitotoksik özelliğe sahiptir ve tüm hücreler için öldürücü olabilmektedir. Bu nedenle “seçici zehir” özelliği olan bitkiler kullanılmalıdır. Yapılan araştırmalarda binlerce bitki incelenmiş ve çok azının ilaç şekline getirilmesi uygun görülmüştür. Kanserle mücadelede bitkilere büyük ümit bağlanmaktadır (Erdem ve Ata Eren, 2009).

Ülkemizde bitkisel ürünlerin kontrolü Sağlık Bakanlığı ve Tarım Bakanlığı tarafından yapılmaktadır. Farklı yönetmelikler çıkarılmasına rağmen yeterli denetim yapılmamaktadır. Denetimsizlikten faydalanan firmalar bitkisel ürünlere farklı kimyasal bileşenler eklemektedir. Örneğin sibutramin zayıflama ilaçlarına eklenen bir kimyasaldır ve ülkemizde 2010-2012 yılları arasında beş kişinin ölümüne neden olmuştur (Uzun ve ark., 2014).

Son yıllarda zayıflamak, yaşlanmayı önlemek, immün sistemi güçlendirmek, cilt güzelliğini sağlamak, idrar atılımını arttırmak, kan yapımını arttırmak, hafızayı güçlendirmek, tansiyonu düşürmek gibi amaçlarla kullanılan bitkisel ürünlerin ilaç metabolizmasına olan etkileri ve toksik etkileri nedeniyle kontrollü ve dikkatli kullanılması önerilmektedir (Gezmen Karadağ ve ark., 2013). Fitoterapinin etkin ve güvenli bir tedavi olduğu tam kanıtlanmadığı için bitkisel ilaçları reçete ederken bazı kurallara uyulması gerekmektedir. Buna göre, hamile veya hamile kalmayı düşünenler, emzirme döneminde olanlar, bebek ve çocuklar, hepatite bağlı sarılık geçiren ya da alkol kullananlar, ciddi hastalığı olanlar tıbbi bitkileri kullanmamalıdır. Ayrıca düzenli olarak uzun süreli tedavi amacıyla kullanılmamalıdır (Özbek, 2005).

### **2.1.2. Kozmetikte Kullanımları**

Kozmetikte kullanılan kremlerin hazırlanmasında bitkisel kökenli hammaddeler sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun en önemli nedenleri, tıbbi bitkilerin içinde bulunan çok sayıda etken maddenin geniş bir etki alanına sahip olması, güvenilirliklerinin daha yüksek olması ve biyolojik sistemlere daha uyumlu olmalarıdır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).



Kozmetikçiler *Aloe barbadensis*, *Celastrus paniculatus*, *Cyperus scariosus*, *Ginkgo biloba*, *Myrtus caryophyllus* ve *Withania somnifera* gibi bitkilerin ekstraktlarını cildi canlandırmak ve korumak için kozmetik ürün halinde formüleştirmiştir. Ülkemizde de gül kurusu, gül yağı, gül suyu, lavanta yağı gibi kozmetikte kullanılan organik ürünler üretilmektedir (Bayram ve ark., 2010). Kekik bitkisi cilt problemlerini engellemek için parfümeri ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır (Bahtiyarca Bağdat, 2006). Yapılan çalışmalarda, yeşil çay ekstraktlarının yaşlanmayı yavaşlatıcı özelliğinin bulunduğu ve çay yapraklarında bulunan flavonoidlerin bu etkiyi sağladığı belirtilmektedir. Deve dikenini bitkisi ile yapılan çalışmalarda, elde edilen ekstraktların antiinflamatuvar özelliği ve cilt hücrelerini yenileme yeteneği sayesinde sedef hastalığında kullanımının başarılı olduğu görülmüştür. Üzüm ülkemizde kolaylıkla yetişen ve uzun yıllardır farklı amaçlar için kullanılan bir bitkidir. Cilt kırışıklıklarını gidermek için kullanılan kozmetik preparatlarda yenileyici ve onarıcı etkisi nedeniyle üzüm çekirdeği yağı kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

### **2.1.3. Gıda Endüstrisinde Koruyucu Olarak Kullanımları**

Gıda kaynaklı hastalıklar gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sorun teşkil etmektedir. Gıdalardan kaynaklanan 200'den fazla hastalık bilinmektedir. Gıda kaynaklı hastalıkların oluşumunda virüs, bakteri, parazit, prionlar gibi mikroorganizmalar ve bunların ürettiği toksinler rol oynamaktadır. Hastalık hafif gastroenterit şeklinde ya da nörolojik, hepatik ve renal sendrom gibi hayatı tehdit eden belirtiler olarak ortaya çıkmaktadır (Mead ve ark., 1999). Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda kaynaklı patojenlere bağlı yılda 9000'den fazla kişi yaşamını yitirmekte ve 81 milyon hastalığın 6 milyonunu gıda kaynaklı hastalıklar oluşturmaktadır (Mead ve ark., 1999; Toroğlu ve Çenet, 2006).

Gıda üretiminde uzun zamandır sentetik katkı maddeleri kullanılmaktadır. Fakat bu katkıların güvenilir olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir (Toroğlu ve Çenet, 2006). Bitki ve baharatların, doğal olmaları ve kalıntı sorununun olmaması nedeniyle antimikrobiyal madde olarak organik gıda üretiminde kullanımının artacağı düşünülmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Doğal antimikrobiyal etkili bitkiler diğer sentetik katkı maddelerine göre daha güvenlidir. Uygun yöntemle elde edilen ekstraktlar aroma-lezzet bileşeni olmanın yanında gıda muhafazasında antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu sayede yiyeceklerin depolanma ömrünü arttırmaktadır

(Koyuncu ve ark., 2008; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Antimikrobiyal özellik gösteren bitkiler arasında zencefil (*Zingiber officinale*), sarımsak (*Allium sativum*), fesleğen (*Ocimum basilicum*) ve tarçın (*Cinnamomum*) gibi bitkiler bulunmaktadır (Koyuncu ve ark., 2008). Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) antibakteriyel özelliğinin yanında et, tavuk, balık gibi gıdalarının raf ömrünü uzatmak için antioksidan olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, adaçayı ve biberiye kullanılarak elde edilen karışımın soya yağı ve patates cipsinin stabilitesini arttırdığı saptanmıştır (Bahtiyarca Bağdat, 2006). Ak ve Gülçin (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, fenolik bir bileşik olan ve zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinde yüksek oranda bulunan kurkuminin antioksidan özelliği araştırılmıştır. Araştırma sonunda, kurkuminin farmakoloji alanında ve gıda sektöründe güvenle kullanılabilir bir antioksidan olduğu saptanmıştır.

#### **2.1.4. Anti-Helmintik Olarak Kullanımları**

Anti-helmintik ilaçlar, sindirim sisteminde bulunan parazitleri kontrol altına almak için kullanılmaktadır. Hayvansal ürünlerde bu ilaç artıklarının görülmesi tüketicileri tedirgin etmektedir. Bu nedenle bu ilaçların kullanımını azaltmak için parazit sayısı ve etkilerini azaltan bitki türlerinin beslenmeye eklenmesi gerekmektedir (Toroğlu ve Çenet, 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

*Lantana camara* (Büyük adaçayı (Malezya), Vahşi adaçayı, Kırmızı adaçayı, Beyaz adaçayı (Karayip))'nın nematotların ve sindirim sistemindeki diğer parazitlerin kontrolünde önemli bir bitki olduğu bilinmektedir. *Eucalyptus* türlerinin keçilerde anti-helmintik etkisi bulunmaktadır (Toroğlu ve Çenet, 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Kekik bitkisi hayvan yemlerinde doğal antibiyotik ve anti-helmintik olarak kullanılmaktadır (Bahtiyarca Bağdat, 2006). Ayrıca *Artemisia* türleri de insanlar tarafından anti-helmintik olarak kullanılmaktadır (Ramezani ve ark., 2004; Toroğlu ve Çenet, 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

#### **2.1.5. Zirai Mücadelede Kullanımları**

Bitki koruma çalışmalarının amacı, bitkileri ve bitkisel ürünleri hastalık, zararlı ve yabancı otlardan kaynaklanan zararlara karşı koruyarak üretimini ve ürün kalitesini arttırmaktır. Bu amaç için zirai mücadelede kimyasal metodlar kullanılmaktadır. Kimyasal mücadele metodları uygulanırken insan ve gıda sağlığına, ayrıca çevre ve doğal hayatı korumaya dikkat edilmelidir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Zirai

ürünleri korumak amacıyla kullanılan pestisit, gübre ve büyüme düzenleyici kimyasallar bitki üzerinde kalıntı bırakmaktadır. Bu kalıntıların toprak, su, hava ve diğer canlılar üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Toroğlu ve Çenet, 2006). Uygulamalarda kimyasallarla ilgili tavsiye ve teknik talimatlara uyulması gerekmektedir. Bunu sağlamak için tarım ile ilgilenen kişi ve kuruluşlar bilinçlendirilmeli ve doğru kullanım yolu öğretilmelidir. Kimyasal yöntemlere alternatif olarak, bitki ve toprağın verimini arttırmak için diğer canlılara zararsız olan doğal bitki ekstraktlarından elde edilen maddeler biyolojik savaş yöntemi olarak kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Bakteriler, bitki ve bitkisel ürünlerde tarla döneminde ya da depolanma sırasında ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ülkemizde ve dünyada bakterilere karşı antibiyotikler dışında etkili bir pestisit bulunmamaktadır. Kekik bitkisi, bitki koruma alanında pestisitlere alternatif olarak ön plana çıkmıştır. Depolanmış ürünlere zarar veren böcekler üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda böcekler üzerinde toksik, uzaklaştırıcı, beslenme ve üremeyi engelleyen etkileri saptanmıştır (Altundağ ve Aslım, 2005).

#### **2.1.6. Hayvanlar Üzerinde Kullanımları**

Hayvan sağlığını korumak, hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesini yükseltmek, hayvan beslemede performansı arttırmak için hayvan yemlerinde çeşitli katkı maddeleri kullanılmaktadır. 2002 yılında Avrupa Birliği'nin aldığı bir kararla, hayvan yemlerine 2006 yılından itibaren katkı maddelerinin (antibiyotik) eklenmesi engellenmiş ve bu nedenle bilim insanları doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya başlamıştır (Bilal ve ark., 2008; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Modern hayvan üretiminde hayvan hastalıklarını önlemek için yüksek dozlarda antibiyotik kullanılmakta ve buna bağlı olarak dirençli bakteriler oluşmaktadır. Hayvansal gıdaların tüketilmesi ile dirençli bakteriler insana geçmekte ve çeşitli sağlık problemlerine neden olabilmektedir (Yıldırım, 2010). Araştırmalarda bitkilerden elde edilen yağların insan ve hayvan sağlığına zararı olmadığı saptanmış ve güvenli katkı maddesi olarak belirlenmiştir (Bilal ve ark., 2008). Aromatik bitkiler ve esansiyel yağların hayvanlar üzerinde kullanılmasının pek çok olumlu etkileri bulunmaktadır. Hayvanların çevre şartlarına dayanıklılığı, yemde lezzeti artırması, yemden faydalanma oranının artması, sindirimi

stimüle etmesi ve antiseptik özelliğinin olması olumlu etkileri arasında sayılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Kekik yağı içeren uçucu yağ formüllerinin eklendiği yemlerin piliçlerde mortalite oranını azalttığı, kesim süresini kısalttığı, et ağırlığını artırdığı saptanmıştır. Ayrıca kekikle beslenen hayvanların etlerinin buzdolabında daha uzun süre saklanabildiği belirtilmiştir. Kekik yağının bileşiminde bulunan timol yumurta sarısına geçerek antioksidan etki göstermektedir. Ayrıca yumurta verimini olumlu yönde etkilediği ve ortalama 1 g civarında yumurta ağırlığını artırdığı belirtilmiştir. Etlik piliçler üzerinde yapılan bir araştırmada, piliç yemlerine 500 mg/kg adaçayı veya biberiye ekstraktı eklenmesi ile göğüs ve but etlerindeki lipid oksidasyonunun azaldığı saptanmıştır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bunların yanın da kekik arı hastalık ve zararlılarını önlemede kullanılmaktadır (Bahtiyarca Bağdat, 2006). Japon bildircinleri üzerinde 38 günlük bir çalışmada büyüme performansı izlenmiştir. Denek grubuna flavomycin (10 mg/kg), kekik esans yağı (60 mg/kg) ve çörek otu (*Nigella sativa*) tohumu esans yağı (60 mg/kg) kullanılmış ve deney sonunda kontrol grubuna göre canlı ağırlık ve yemden yararlanma derecesinde artış olduğu saptanmıştır (Bilal ve ark., 2008).

Ekici ve ark. (2011) balıklarda hastalık yapan *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* ve *Lactococcus garviae* suşları üzerinde kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), zencefil (*Zingiber officinale*) bitkilerinin antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Bitki yağları metanolla homojenize edilmiş ve disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Araştırma sonunda kekik yağının %1, 2.5, 5, 7.5 ve 10'luk konsantrasyonlarının her biri *F. psychrophilum*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Hussain ve ark., (2011) çiftlik hayvanlarında hastalığa neden olan *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium bovis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. *Carum copticum*, *Mallotus philippensis*, *Citrullus colocynthis*, *Calotropis procera*, *Embellia ribes*, *Ricinus communis*, *Lawsonia inermis*, *Amomum subulatum*, *Operculina turpethum* ve *Santalum album* bitkilerinin metanol ekstraktı kullanılmıştır. *Santalum album*, *Lawsonia inermis* ve *Embellia ribes* test edilen tüm mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir.

### 2.1.7. Doğal Boyamacılıkta Kullanımları

Çevreyi kirletmeyen doğal boya bitkileri yıllık veya iki yıllık, toksik ve kanserojen özelliği bulunmayan bitkilerdir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bitkinin yaprak, çiçek, kabuk ve kök gibi kısımlarından elde edilen, üzerinde herhangi bir kimyasal işlem uygulanmayan ya da en az seviyede kimyasal kullanılan boyalar bitkisel boya olarak adlandırılmaktadır. 19. yüzyılın ortalarında sentetik boyalar keşfedilmiş ve doğal boyalara ilgi azalmıştır. Bitkisel boyaların uzun zaman alması, maliyetli ve zahmetli olması nedeniyle sentetik boyalar tercih edilmiştir (Mert ve ark., 1992).

Adi karamuk (*Berberis vulgaris* L.) ya da kadıntuzluğu olarak da bilinen karamuk bitkisinin 14. yüzyıldan beri boya olarak kullanıldığı birçok kaynakta belirtilmektedir. Farklı türdeki maddeleri çok basit ve çabuk olarak boyayabilmektedir. Boyama işleminden sonra zamanla renk kahverengiye dönüşmektedir. Bu nedenle I. Dünya Savaşı sırasında Osmanlı Orduları'nın çadırlarını boyamak için kullanılmıştır. Halen Anadolu'da yün boyamasında bitkinin sarı renkli kökleri kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013) . *Cotinus coggyria* Scop. (Dumanağacı, Boyacı sumacı, Sarı sumak) Akdeniz ve Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılım göstermekte ve sarı, portakal ve kahverengi renk elde etmek için kullanılmaktadır (Mert ve ark., 1992). Aslında yağ bitkisi olarak yetiştirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) resim, kâğıt, tekstil, gıda ve kozmetik gibi alanlarda boyarmadde olarak kullanılmıştır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Ceviz (*Juglans regia* L.), ebe gümece (*Malva sylvestris*), kekik (*Thymus sp.*), civanperçemi (*Achillea sp.*), kökboya (*Rubia tinctorum* L.), mazı meşesi (*Quercus infectoria Olivier*), kayısı (*Armenica vulgaris* Lam.), şeftali (*Persica vulgaris* Miller), armut (*Pyrus communis* L.) ve ısırgan otu (*Urtica dioica* L.) boyamacılıkta kullanılan bazı bitkilerdir (Mert ve ark., 1992; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

### 2.1.8. Anti-Fungal Olarak Kullanılmaları

Antifungal ilaçların sınırlı olması, bu ilaçlara direnç gelişmesi, ilaçların pahalı olması ve ilaç yönetiminin zor olması nedeniyle yeni antifungal ajanların keşfedilmesi gerekmektedir (Shokri ve ark, 2012). Uzun yıllardır bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağların bakteri ve mantarlar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir (Dağcı ve Dığrak, 2005). Tüm dünya ülkeleri tarafından patojen funguslara karşı bitki

ekstraktlarının kullanımı, etkili bitkilerin ve içeriklerinin tespit edilmesi için yoğun çalışmalar bulunmaktadır (Toroğlu ve Çenet, 2006).

Navarro ve ark. (1996), Meksika’da ilaç olarak kullanılan geleneksel bitkiler üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada 12 bitkinin metanolik ekstraktını *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonunda *Punica granatum*'un test edilen mikroorganizmalara karşı güçlü bir aktivite gösterdiği saptanmıştır. Dağcı ve Dığrak (2005) tarafından yapılan çalışmada *Punica granatum* L. (*Punicaceae*) “Nar”, *Citrus paradisi* Mc. Fad. (*Rutaceae*) “Greyfurt”, *Cydonia oblonga* Miller (*Rosaceae*) “Ayva”, *Musa sapientum* L. (*Musaceae*) “Muz” meyve suları ile kabuk ekstraktlarının bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. *Punica granatum*'un aseton, etil alkol ve sulu ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalar üzerinde en etkili olduğu tespit edilmiştir. *Punica granatum*'un etil alkol ekstraktı ve *Citrus paradisi*'nin sulu ekstraktının *Pseudomonas aeruginosa* üzerine en güçlü etkiyi gösterdiği saptanmıştır.

*Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar son yıllarda artmıştır. Genellikle bu mantar enfeksiyonlarının %90'ından *Candida albicans* sorumludur. *Candida zeylanoides* tarafından oluşturulan bir artrit vakası bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada İran’da yetişen 5 bitki türünün (*Heracleum persicum*, *Nigella sativa*, *Trachyspermum copticum*, *Zataria multiflora*, *Ziziphora clinopodioides*) *Candida zeylanoides* üzerinde antifungal etkileri araştırılmıştır. Disk difüzyon sonuçlarına göre en yüksek inhibisyon zonunu *Trachyspermum copticum* ve *Zataria multiflora* oluşturarak antifungal aktivite göstermiştir (Shokri ve ark, 2012).

## 2.2. Tıbbi Bitkilerdeki Etken Maddeler

Bitkisel diyetlerin, içerdiği antioksidan maddeler sayesinde koruyucu etkileri bulunduğu ve antioksidanların doğal oksidasyon reaksiyonlarının yıkıcı etkilerinden hücreleri koruduğu saptanmıştır. Böylece araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Günümüzde ise, bitkisel ürünlerde mevcut olan ve fitokimyasallar olarak adlandırılan on binlerce madde üzerinde durulmaktadır (Dündar, 2001). Bitkilerin sekonder faaliyetleri sırasında ortaya çıkarak depolanan, tüketildiklerinde sağlık için faydalı ancak besin değeri bulunmayan bileşiklere fitokimyasal adı verilmektedir (Erbaş, 2006; Uzunhan, 2013).

Son yıllarda fitokimyasal kavramının ve fitokimyasalların diyetteki yerinin önem kazanması aşağıdaki faktörlere bağlanmaktadır (Dündar, 2001; Uzunhan, 2013);

- Bilim ve teknoloji alanındaki hızlı gelişim ve araştırma bulguları,
- DSÖ'nün meyve ve sebzelerden oluşan sağlıklı diyet önerisi,
- Sağlık için harcanan giderlerin yüksek olması,
- Toplumun sağlık açısından ve diyet alternatifleri konusunda daha bilinçli hale gelmesi,
- Yaygın olarak görülen kanser ve kardiyovasküler sistem hastalıklarının çoğunun ortaya çıkmasında, hayvansal gıdaların yoğun tüketiminin rol oynaması,
- Hayvansal ürünlere karşı doygunluk hissedilmesi,
- Tüketicilerin fitokimyasal içeren yeni beslenme şekline talep göstermesidir.

Amerika'da ölüme yol açan en önemli dört hastalık olan kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyonun önlenmesi ve/veya tedavisinde fitokimyasallar ve diğer bitkisel kaynaklı besin bileşenlerinin etkili olduğu bulunmuştur (Dündar, 2001; Coşkun, 2005). Bunun yanında nöral tüp defektleri, osteoporoz, anormal bağırsak hareketleri ve artiritlerin önlenmesinde ve tedavisinde de rol oynamaktadırlar (Coşkun, 2005).

Fitokimyasallar bitkilerin kendine özgü olan renk, koku ve tat gibi özelliklerinin oluşumunda etkili olmaktadır. Uzun süredir yapılan çalışmalar sonunda fitokimyasalların bir kısmı saflaştırılmış ve saf olarak elde edilip kullanılması tartışılmaya başlanmıştır. Örneğin, bazı sebze türlerinde bulunan fitokimyasallardan elde edilen konsantre preparatlar piyasada bulunmaktadır. Bu gelişmelere bakarak önümüzdeki yıllarda fitokimyasallardan üretilen hapların yaygın hale gelebileceği düşünülmektedir (Dündar, 2001).

Bitkilerin yapısındaki fitokimyasalların sayısı ile ifade edilmesi oldukça güçtür. Örneğin sadece domateste 10 bini aşkın fitokimyasal madde bulunmaktadır. İzoflavonlar, ellagik asit, fitatlar, indoller, flavonoidler, terpenler, fenolik asit, kumarinler, polifenoller, likopenler, glissirizin, izotiyosiyanatlar, karotenoidler, sülfidler ve taninler bazı sebze ve meyvelerde bulunan kullanımı yaygınlaşmış, etkileri büyük oranda belirlenmiş fitokimyasallar arasında bulunmaktadır (Dündar, 2001; Uzunhan, 2013).

### **2.2.1. Fenolik Bileşikler**

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunan fitokimyasallardır. Bu bileşikler bitkilerin patojenlere karşı korunması, bitkinin büyüme ve üremesinde rol oynamaktadır. Sebze ve meyvelerle tüketilen fenolik bileşiklerin sağlık için olumlu faydaları bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda antialerjik, antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik, kalp ve damar genişletici etkileri olduğu saptanmıştır (Balasundram ve ark., 2006). Ayrıca fenolik maddelerden bazıları, örneğin antosiyaninler meyve ve sebzelerin kendine özgü olan renklerini oluşturmaktadır (Er, 2011). Doğal olarak meydana gelen 8000'den fazla fenolik bileşik bilinmektedir ve hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre çok çeşitli şekilde sınıflandırılmaktadır. Fenolik asitler, flavonoidler ve taninler fenolik bileşiklerden bazılarıdır (Robards ve Antolovich, 1997; Balasundram ve ark., 2006; Turhan ve Üstün, 2006; Arkan, 2011).

#### **Fenolik Asit**

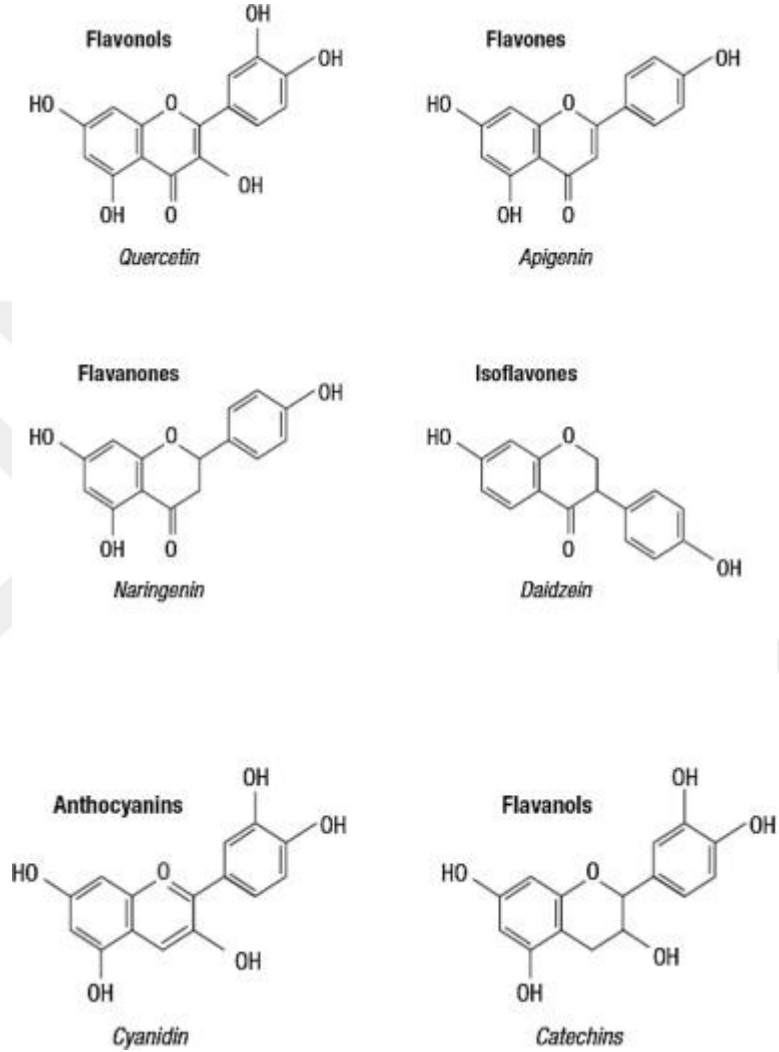
Fenolik asitler bitkilerde bulunan fenollerin yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır (Ignat ve ark., 2011). Meyve ve sebzelerin kendine has olan buruk tadını fenolik bileşikler vermektedir. Bu buruk tadın fenolik bileşiklerin ağız mukozasında bulunan protein ve polisakkaritlerle tepkimeye girmesi sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Er, 2011). Kan lipid düzeyinde oluşabilecek dengesizliklerin giderilmesi, nitrozaminlerin meydana gelmesinin engellenmesi ve enzim aktivitelerinde aktif rol oynamaktadır. Fındık, ceviz gibi kabuklu çerezler, havuç, kiraz, vişne, elma, brokoli, portakal, domates, çilek, frambuaz ve kepekli tahıllar fenolik asit içeren başlıca gıdalardır (Dündar, 2001).

#### **Flavonoidler**

Flavonoidler en önemli fenolik gruplardır. Kimyasal yapıları çeşitlilik göstermekte ve farklı biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır (Robards ve Antolovich, 1997). Flavonoidler yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar yaygın olarak bulunan bir bileşiktir. Genellikle bitkilerin kök, gövde, kabuk, dal, yaprak, çiçek ve meyve gibi tüm organlarında bulunmaktadır. Flavonoidler bitkilerdeki büyüme hormonları ve enerji dönüşümüne etki etmektedir. Solunum ve fotosentez olaylarını düzenleme fonksiyonları bulunmaktadır (Işık, 2005). Günümüze kadar bitkisel kökenli gıdalarda 4000'den fazla farklı flavonoid çeşidi tespit edilmiştir (Lebeau ve ark., 2000; Ren ve ark., 2003; Çapanoğlu ve Boyacıoğlu, 2009). Bu bileşikler, ortak bir



phenylbenzopyrone yapısına sahiptir. Doğunluk düzeyi ve piran halkasının açılımına göre flavonlar, flavanollar, izoflavonlar, flavonollar, flavanonlar ve antosiyaninler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1) (Rice-Evans ve ark., 1996; Çimen, 1999; Ren ve ark., 2003; Ignat ve ark., 2011). Flavonoid içeren bitkisel ilaçlar özellikle Çin olmak üzere tüm dünyada kullanılmaktadır (Ren ve ark., 2003).



Şekil 2. 1. Flavonoidlerin kimyasal yapıları (Ignat ve ark., 2011)

1970'li yıllarda flavonoidlerin kullanım amaçlarına yönelik araştırmalar artmıştır. Bu araştırmalar sonucunda çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelerinin bulunduğu saptanmıştır. Bunlar arasında antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, hepatoprotektif, antitrombotik özellikler ve iltihaba karşı etkilerinin mevcut olduğu açıklanmıştır (Lebeau ve ark., 2000; Işık, 2005). Flavonoidlerin hormonların normal fizyolojik etkileri dışında ortaya çıkabilecek zararlı etkilerini ve antioksidan etki göstererek hücrelerde oluşan mikrozomal lipid peroksidasyonu

olaylarını önleyebildikleri belirtilmektedir (Rice-Evans ve ark., 1996; Dündar, 2001). Flavonoidler antioksidan etkisini, peroksi radikalleri ile elektron transferi yolu ile tepkimeye girip hidroksil ve süperoksit radikallerini yakalayarak göstermektedir (Turhan ve Üstün, 2006). Flavonoidlerin antiviral etkisinin yüksek oranda proteinlere bağlanma özelliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Ayrıca koroner kalp hastalığı riski ile diyetle tüketilen flavonoid miktarı arasında ters bir ilişki bulunmaktadır (Lebeau ve ark., 2000; Ignat ve ark., 2011). Ayrıca flavonoidlerin antimutajenetik ve antikarsinojenik etkilerinin bulunduğu *in vitro* ve *in vivo* şartlarda saptanmıştır (Işık, 2005). Finlandiya’da 9959 kadın ve erkek denek üzerinde yapılan bir araştırmada kanser ve flavonoid alımı arasında ters bir ilişki bulunmuştur. 24 yıllık izlem sonucunda flavonoid alımı yüksek olan kişilerde akciğer kanseri görülme oranının %50 azaldığı saptanmıştır (Coşkun, 2005). Meyan kökü ekstresinden elde edilen flavonoidlerin *Helicobacter pylori* nedenli peptik ülser ve mide kanseri için fayda sağladığı belirtilmektedir (Ren ve ark., 2003). UV ışınlarından koruma özelliğine sahip olması nedeniyle kozmetik ürünlerde önemli bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Işık, 2005). Ancak bazı çalışmalarda flavonoidlerin mutajenetik etkileri hakkında *in vitro* veriler bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda DNA, protein ve karbonhidrat metabolizmasında oksidatif hasarı hızlandırabileceği belirtilmektedir (Çimen, 1999). Havuç, narenciye, çilek, elma, brokoli, siyah ve yeşil çay, maydanoz, soya fasulyesi, tahıllar, lahana, kabak, patates, domates, salatalık gibi sebze ve meyveler flavonoidlerce zengin kaynaklardır. Çay bitkisi tüm toplumlar tarafından yaygın olarak tüketilmekte ve yaşantımızda önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle siyah ve yeşil çayla ilgili oldukça fazla araştırma bulunmaktadır. Çalışmaların çoğunda çayın antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve bazı hastalıkların oluşumunu engellediği saptanmıştır. Çayın bu etkisinin içinde bulunan flavonoidlere bağlı olduğu ve siyah ya da yeşil çay arasında antioksidan aktiviteyi artırma açısından önemli bir fark olmadığı çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Dündar, 2001).

İzoflavonlar, sağlığını kaybetmiş, yaşlanmış ve oksidasyon sonucunda hasara uğramış olan hücrelerin büyümesini durdurabilmektedir. Prostaglandinin katabolik enzim faaliyetini engellediği belirtilmektedir (Dündar, 2001). Ateroskleroz ve kanser gibi hastalıkları önlemek ya da tedavi etmek amacıyla kullanılabilirdiği belirtilmektedir (Ignat ve ark., 2011). *Erythrina variegata*’dan ayrıştırılan bazı izoflavonoidlerin *Streptococcus*

*mutans* hücreleri üzerinde potansiyel birer antibakteriyel ajan oldukları bildirilmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Baklagiller, kuru fasulye, soya ezmesi ve soya sütünün izoflavanlar açısından zengin olduğu bildirilmektedir (Dündar, 2001). Ayrıca siyah çayın içinde %30 oranında bulunan polifenoller de izoflavon yapıda bileşiklerdir (Erdoğan ve Everest, 2013).

Antosiyaninler, pH değerine bağlı olarak suda çözüldüğünde kırmızı, mor ya da mavi renk olarak görünen pigmentlerdir. Bitkilerin yaprak, kök, sap, çiçek gibi tüm dokularında bulunmaktadır (Ignat ve ark., 2011). Antosiyaninler, insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Antioksidan özelliği sayesinde kanser, koroner kalp hastalığı, diyabet ve diğer dejeneratif hastalıkların oluşumunu önleyebilmektedir (Cujic ve ark., 2015). Flavanonlar turunçgillerde yüksek konsantrasyonda, ayrıca domates ve nane gibi aromatik bitkilerde bulunmaktadır (Ignat ve ark., 2011).

### **Taninler**

Otsu ve odunsu bitkilerde taninler yaygın olarak bulunmaktadır. Uzun zamandır taninlerin *Staphylococcus aureus*'a karşı bakteriyostatik ya da bakterisidal etki gösterdiği bilinmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Tannik asit pomat ya da sprey çözelti halinde yaralarda, tannik asit gliseriti şeklinde ağız ve boğaz iltihaplanmalarında lokal olarak kullanılmaktadır. Tannik asitten elde edilen suppozituarlar ise hemoroid tedavisinde kullanılmıştır (Özacar ve Şengil, 1998).

### **Stilbenler ve Lignanlar**

Stilbenler düşük miktarda insan diyetinde bulunmaktadır. Bitkilerde enfeksiyon ve stres koşullarında cevap olarak üretilmektedir. Üzüm, çilek ve fıstık dahil olmak üzere 70'den fazla bitki türünde tespit edilmiştir. Lignan ve sentetik türevlerine olan ilgi kemoterapi ve çeşitli farmakolojik uygulamalardaki etkileri nedeniyle artmaktadır (Ignat ve ark., 2011).

### **2.2.2. Polifenoller**

Polifenoller antioksidan etkinliği yüksek fitokimyasallar arasında yer almaktadır. Bu özelliği sayesinde oksidasyonun sonucu oluşan tahribata karşı LDL oksidasyonunu inhibe ederek hücrelerin korunmasını sağlamaktadır. Şerbetçi otu, yeşil çay, zeytinyağı

ve üzüm çeşitleri başlıca kaynakları arasında bulunmaktadır (Dündar, 2001). Son zamanlarda çikolatanın da polifenoller bakımından zengin olduğu ve kalp üzerine olumlu etkileri bulunduğu belirlenmiştir (Coşkun, 2005). Şerbetçi otunun içerdiği polifenollerin mutagenik etkili streptotokokları baskıladığı düşünülmektedir. Sık olarak tüketilen çayda bol miktarda polifenol bulunmakta ve çayın antioksidan etki mekanizmasını anlamak amacıyla yoğun şekilde araştırılmaktadır (Dündar, 2001).

Fransa'nın belli yerlerinde yaşayan ve bol miktarda kırmızı şarap tüketen bireylerin fazla miktarda yağ tüketmelerine karşın diğer batı toplumlarından daha az kalp hastalığı görülmesi araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Araştırmalarda kırmızı üzümün kabuk kısmında antioksidan özellik gösteren polifenolik bileşikler saptanmıştır. Kırmızı şarap polifenolik bileşikler açısından beyaz şaraptan 25-50 kat daha zengindir. Kırmızı üzümün suyunu tüketen kişilerde de aynı etki elde edilebilmektedir. Ayrıca üzüm suyu tüketiminin trombosit agregasyonunu azalttığı saptanmıştır (Coşkun, 2005).

### **2.2.3. Karotenoidler**

Karotenoidler gelişmekte olan ülkelerde en önemli A vitamini kaynağıdır. Karotenoidler en yaygın olan renk pigmentleri arasında yer almaktadır ve karotenoid adının havuç (*Daucus carota*) kökünde bulunan baskın pigment olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Karotenoidler açık sarıdan koyu kırmızıya kadar farklı renk tonlarının oluşumundan sorumludur ve proteinlerle kompleks yapılar oluşturduklarında yeşil ve mavi renk verirler (Ötleş ve Atlı, 1997). Karotenoidlerin oksidatif kaynaklı hasarı önemli ölçüde azalttığı, DNA sarmalındaki kırılmaları önlediği ve kanser oluşumunu önlediği kabul edilmektedir. Domates, havuç, ıspanak, beyaz ve kırmızıturp, patlıcan ve kereviz karotenoid kaynaklarını oluşturmaktadır (Dündar, 2001).

Günümüzde yaklaşık olarak 600 çeşit karotenoid tespit edilmiştir.  $\beta$ -karoten, likopen, lutein,  $\alpha$ -karoten en çok bilinenleridir (Ötleş ve Atlı, 1997). Domateste en çok dikkat çeken fitokimyasal olan likopenler, antikarsinojenik, antioksidan ve erkek cinsiyet hormonlarının düzey ve aktivitesini düzenleyici olarak etkinlik göstermektedir (Dündar, 2001). Prostat, mesane, meme, deri, sindirim sistemi ve serviks kanseri riskini azaltmaktadır. Likopenin antioksidan özelliği sayesinde antikarsinojenik etki sağladığı düşünülmektedir (Coşkun, 2005).

## **2.2.4. Diğer Tanınmış Fitokimyasallar**

### **Ellagik Asit**

Hücreleri, genotoksik etkenlere karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Kas hücresi sarkoplazmik retikulumundan salınan kalsiyum üzerinde etkin bir kontrolü olduğu ileri sürülmektedir (Dündar, 2001). Ellagik asit, polifenoller arasında oldukça stabil olması nedeniyle biyolojik gösterge olarak kullanılmaktadır (Yılmaz ve Usta, 2010). Başlıca kaynakları, üzüm, ahududu, elma, çilek, hint safranıdır (Dündar, 2001). Ayrıca nar suyu ve nar yağı da ellagik asit içermektedir. Yapılan bir araştırmaya göre, 180 mL nar suyu 25 mg ellagik asit içermektedir ve içiminden 1 saat sonra tüm vücut sıvılarında ellagik asit saptanmaktadır (Yılmaz ve Usta, 2010).

### **Fitatlar**

Demir emilimini kontrol ederek oksidatif stres oluşumu önleyebildikleri saptanmıştır. Acı bakla, soya fasulyesi gibi bitkilerde bulunmaktadır. Bunun dışında pirinç, buğday, darı, mısır ve yulaf gibi kepekli tahıllarda da mevcuttur (Dündar, 2001).

### **İndoller**

Merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının düzenlenmesi, östrojen hormonunun yararlı olan alt gruplarının yapımı ve salınımı, hipoglisemi ve hipotansiyon durumunun ortaya çıkması gibi fizyolojik olaylarda rol oynayan antioksidan özellikli bir fitokimyasaldır. Brokoli, brüksel lahanası, lahana, karnabahar, şalgam ve yaprakları, hardal yaprağı, susam yağı, su kabağı, yeşil sebzeler ve yumru kökler indoller yönünden zengin besinlerdir (Dündar, 2001).

### **Terpenler**

Terpenler tüm canlı organizmalarda bulunduğu için oldukça fazla araştırılmaktadır. Terpenler bitkisel dokularda sıklıkla serbest şekilde, bazen organik asit esteri ya da glikozitleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş olarak bulunmaktadır (Işık, 2005). Hücrelerde oluşan mikrozomal lipid peroksidasyonunu ve dokularda meydana gelen oksidatif stresi önlemektedir. Kiraz, vişne, narenciye gibi meyvelerde bulunmaktadır (Dündar, 2001).

## **Kumarinler**

Kumarinler bitkilerin yapısında serbest ya da glikozit halinde bulunmaktadır (Işık, 2005). Hücre DNA'sına zarar veren maddelerin etkilerini önlemektedir (Dündar, 2001). Kumarinler antiviral aktivite de göstermektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Bazı kaynaklarda kumarinlerin bir kısmının antikoagülan, diüretik, antibakteriyel, hepatotoksik ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmektedir (Işık, 2005). Maydanoz yaprağında kumarinler bol miktarda bulunmaktadır. Kereviz tohumu yağı, maydanoz yağı, D vitamini, kalsiyum, koenzim Q, izoflavonlar ve lignanlar gibi fitokimyasallar kumarinlere benzer etkiler göstermektedir (Dündar, 2001).

## **Glissirizin**

DNA hasarını, hormonların ve metabolitlerin neden olabileceği istenmeyen etkilerin oluşmasını önleyebilmektedir. Antioksidan savunma sisteminde görevlidir ve yüksek düzeyde antiviral etki göstermektedir. Meyan kökü bilinen en önemli glissirizin kaynağıdır (Dündar, 2001).

## **İzotiyosiyanatlar**

DNA hasarını önlemedeki başarısı bilinen en önemli etkisidir. Enzimsel aktiviteleri yönlendirerek bu işlevi yaptığı düşünülmektedir. Su teresi, turp, lahana gibi kaynaklarda bulunmaktadır (Dündar, 2001).

## **Sülfitler**

Toksik etkili kimyasal maddelerin ve bu maddelerin metabolitlerinin vücuttan atılmasını sağlamaktadır. Ayrıca antioksidan savunmada görev aldıkları saptanmıştır. Sarımsak, soğan, frenk soğanı, pırasa, ananas ve brokoliden yüksek miktarda izole edilmiştir (Dündar, 2001).

### 2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri

Karışımında bulunan bir maddenin bir fazdan başka bir faza çekilerek ayırma işlemine ekstraksiyon denir. Elde edilen ürüne ekstre ya da ekstrakt adı verilmektedir. Avrupa Farmakopesi'ne göre ekstre, genellikle kuru haldeki bitkisel ya da hayvansal kökenli hammaddelerin farklı işlemlerden geçirildikten sonra elde edilen sıvı, katı veya yarı katı preparatlar olarak tanımlanmaktadır (Başer, 2010). Soxhlet ekstraksiyonu laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen az gelişmiş bir yöntemdir. Kirliliği önleyen, örnek hazırlama maliyetini azaltan, daha kısa sürede ekstrakt elde edilmesini sağlayan ve daha az çözücü kullanılan yeni tekniklere talep artmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ya da süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi gelişmiş yöntemler ekstre elde etme süresini azaltmanın yanında yüksek sıcaklık ve basınç altında çalışma olanağı sağlamaktadır (Eskilsson ve Björklund, 2000). Saim ve ark. (1997) soxhlet ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonunu ekstraksiyon verimi, maliyet, kullanılan çözücü miktarı, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon için kullanılacak hammadde açısından karşılaştırmıştır. Araştırma sonunda en az ekstraksiyon verimi, en az maliyet, en fazla kullanılan çözücü ve en uzun ekstraksiyon süresinin soxhlet ekstraksiyonunda; en az hammadde kullanımının süperkritik akışkan ekstraksiyonunda, en fazla hammadde kullanımının soxhlet ekstraksiyonunda olduğu saptanmıştır.

Ekstraksiyon yöntemlerini mekanik ve mekanik olmayan şeklinde ikiye ayırmak mümkündür. Mekanik ekstraksiyon sıkma ve çizme işlemleri olarak adlandırılır. Mekanik olmayan ekstraksiyon ise çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyondur. Çözücü olarak gaz, sıvı ya da materyale uygun olan bir akışkan kullanılabilir (Başer, 2010). Bazı kaynaklarda ise geleneksel ve yeni yöntemler olarak ayrılmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu ve maserasyon işlemi geleneksel yöntemler arasında sayılmaktadır. Süper kritik sıvı ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga ekstraksiyonu ise modern yöntemler arasında bulunmaktadır (Moyler,1993; Kılıç, 2008; Cujic ve ark., 2015). Geleneksel yöntemler doğru çözücü içinde ısı kullanılarak maddenin çözünmesi esasına dayanmaktadır. Geleneksel yöntemlerde ekstraksiyon süresi uzun ve verimlilik düşük olmaktadır. Ayrıca ısı değişimine bağlı olarak birçok ürünün yapısı bozulmaktadır. Bu nedenle modern yöntemlere ilgi artmaktadır (Wu ve ark., 2001). Her

yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak seçilen yöntemin temel amacı, bileşiklerin tam olarak elde edilmesidir (Cujic ve ark, 2015).

### **2.3.1. Ekstraksiyon Parametreleri**

Ekstraksiyon işleminde istenilen kalite ve verimde ürün almak için uygun ekstraksiyon yönteminin seçilmesi yanında ekstraksiyon işlemi öncesi ve işlem sırasında bazı parametrelere dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu parametrelerden en önemli olanları sıcaklık, basınç, çözücü, parçacık büyüklüğü ve nem olarak sayılabilir (Başer, 2010; Cujic ve ark., 2015).

#### **Sıcaklık**

En önemli parametrelerden birini sıcaklık oluşturmaktadır. Bazı maddelerin sıcaklıkla beraber çözünürlüğü artarken bazı maddeler yüksek sıcaklıkta bozunma olayına maruz kalabilmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon uygulanacak materyalin en verimli hangi sıcaklıkta kullanılabileceğinin bilinmesi gerekmektedir. Özellikle ısıya hassas olan maddelerde uygulanan yüksek ısı istenen etken madde yerine istenmeyen birçok maddenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Başer, 2010). Altın ve ark. (2013) tarafından yapılan bir araştırmada jojoba tohumlarından yağ eldesinde sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Çözücü olarak hekzan kullanılmış ve test edilen değişken dışında diğer değişkenler sabit tutulmuştur. Araştırma sonunda ekstraksiyon verimi 65°C'ye kadar artmış ve bu sıcaklıkta sabit kalmıştır.

#### **Basınç**

Ekstraksiyon işlemi çoğunluklu atmosferik basınç altında yapılmaktadır. Ancak yüksek ısıya duyarlı maddelerde bozunma olayının önüne geçebilmek için ortam basıncı düşürülebilmektedir. Basınç düşürüldüğü zaman sıcaklıkta düşeceği için oluşabilecek bozunma olayı engellenebilmektedir (Başer, 2010).

#### **Çözücü**

Kullanılacak çözücüde aranan en önemli özellik, ekstre edilecek olan materyalleri tam olarak çözebilme yeteneğinin olmasıdır. Ayrıca çözücünün istenmeyen maddeleri de çözmemesi gerekmektedir. Bu özelliği sağlayabilmek için çözücünün polaritesi ile çözünen madde arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Genellikle polar maddeleri çözmek için yine polar yapıdaki su en çok tercih edilen çözücüdür. İnsan sağlığına çok



büyük tehlikesi olmaması ve suda çözünürlüğü çok az olan veya çözünemeyen maddeleri çözme özelliğinden dolayı sudan sonra en çok tercih edilen organik çözücü etil alkoldür. Etil alkol hem saf olarak hem de farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir (Başer, 2010).

Tosun ve ark. (2006), kırmızı üzümün çekirdek ve kabuğunu kullanarak, farklı çözücülerin ekstraksiyon ve fenolik bileşen verimi ile antioksidan aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Üzüm kabuğu ve çekirdeklerinin, diğer parametreler sabit tutularak farklı çözücüler (su, etanol, aseton, etilasetat ve bu çözücülerin %50 ve %70 lik sulu ve asitli (HCl) karışımları) ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. DPPH ile antioksidan aktivite ve Folin Ciocoltaeu yöntemi ile toplam fenolik bileşen miktarları saptanmıştır. Çekirdek ekstresindeki en yüksek verim %50 aseton çözücüsü, kabuk ekstresindeki en yüksek verim %70 aseton çözücüsü ile elde edilmiştir. En yüksek antioksidan kapasite %70 aseton çözücüsü, en yüksek fenolik bileşen miktarı %50 aseton çözücüsünde bulunmuştur. Araştırma sonunda, karışım olan çözücülerin saf çözücülere göre daha yüksek verim sağladığı belirlenmiştir. Özcan ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada *Thymus sipyleus* subsp. *rosulans* bitkisini metanol, aseton, diklorometan, kloroform ve hekzan çözücülerini kullanarak antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Kullanılan çözücüye göre ekstraksiyon verimi karşılaştırıldığında en verimli kuru madde metanol ekstraktından elde edilmiştir. Ekstraktlar kullanılan test mikroorganizmaları üzerine farklı oranlarda antimikrobiyal etki göstermiş ve artan konsantrasyonlarda inhibisyon zonu çaplarının da arttığı tespit edilmiştir.

### **Parçacık büyüklüğü**

Ekstraksiyon sırasında en yüksek verim ve en iyi ürün elde edilmesi için önemli parametrelerden biridir. Parçacık büyüklüğü küçüldükçe ekstraksiyon işlemi kolaylaşmakta ve ekstraksiyon verimi artmaktadır. Ancak çok küçük taneciklerin yığın hareketi oluşturması kütle transfer hızını azaltır ve bir noktaya kadar artış gösteren ekstraksiyon verimi belli bir noktadan sonra ya durur ya da azalır. Yani iyice toz haline getirilen maddelerde ekstraksiyon işlemi zorlaşmaktadır. Bu nedenle en yüksek kalite ve verimi elde etmek için hammaddenin en uygun parçacık büyüklüğüne getirilmesi gerekmektedir (Başer, 2010). Cujic ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada örneklerin parçacık boyutu 0,75-1-2-3 mm olarak belirlenmiştir. 0,75 mm parçacık boyutundaki verim diğerlerine göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

## **Nem**

Ekstre edilecek maddenin taşıdığı nem önem taşımaktadır. Hammaddede bulunan su ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan çözücünün konsantrasyonunu değiştirerek farklı özellikteki ürünlerin alınmasına neden olabilmektedir. Ayrıca neme bağlı olarak bakteri ve mantarlar kısa sürede üreyerek hammaddenin yapısını bozmaktadır (Başer, 2010).

### **2.3.2. Mekanik Ekstraksiyon**

Mekanik ekstraksiyon, uygun bir mekanik işlem ya da düzenele yapılan ekstraksiyon işlemini tanımlamaktadır. Mekanik ekstraksiyonla elde edilen ürünler doğrudan elde edildiği şekilde ya da bazı işlemlerden geçirilip saflaştırılarak kullanılmaktadır. Sıkma ve çizme yöntemi başlıca mekanik ekstraksiyon yöntemleridir (Başer, 2010).

#### **2.3.2.1. Sıkma Yöntemi**

Uygun bir sıkıştırma aracıyla sıkılarak yapılan ekstraksiyon işlemidir (Başer, 2010). Limon ve portakal gibi turuncgillerin kabuğunda bulunan uçucu bileşikleri ve tohumlarda bulunan sabit yağları elde etmek için uygulanmaktadır (Kılıç, 2008; Başer, 2010). Narenciye meyvelerinin taze kabuklarında bulunan uçucu bileşiklerin yapısı destilasyon işlemi uygulandığında bozulduğu için bu yöntem tercih edilmektedir (Kaya ve Ergönül, 2015). Sıkma yönteminde narenciye kabukları bez bir torbaya koyularak soğuk hidrolik preslerde sıkılmaktadır (Kılıç, 2008; Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). Soğuk hidrolik presleme sırasında sıcaklık olmaması uçucu bileşenlerin kaybedilmesini önlemekte ve elde edilen yağların daha üstün aromaya sahip olmasını sağlamaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015).

#### **2.3.2.2. Çizme Yöntemi**

Bitkisel materyalin uygun bir bıçak ya da kesici aletle çizilerek yaralanması ve bitkinin kendini iyileştirmek için ortaya çıkardığı salgının toplanması esasına dayanmaktadır. Çizme işlemi çok dikkatli ve işleme özel olan aletlerle yapılmaktadır. Yapılan yanlış ya da aşırı yaralamalar bitkide hasara ya da bitkinin ölümüne neden olmaktadır. Bazen çizmek yerine bitki ağır darbelerle yaralanarak da bu işlem yapılabilir. Bu yöntemin en güzel örneği haşhaş bitkisinin olgunlaşmadan çizilerek “Afyon” maddesinin elde edilmesidir (Başer, 2010).

### **2.3.3. Çözücü Ekstraksiyonu**

Bitki materyali oda sıcaklığında direkt olarak çözücü içine batırılmakta ya da organik çözücülerle soxhlet içerisinde kaynatılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sonunda destilasyon işlemi ile organik çözücü ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Sıcaklık daldırma yönteminde 5-25°C arasında, soxhlet cihazında 60°C'den düşük olmaktadır. Düşük sıcaklık kullanılması bu yöntemin buhar destilasyonuna göre avantajıdır ve elde edilen ürün daha doğal bir içerikte olmaktadır. Ancak çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyon sonrası uygulanan yoğunlaştırma işlemi sırasında molekül ağırlığı düşük olan uçucu yağlar kaybedilmektedir. Ayrıca ekstraksiyon sonrası kalan çözücü hem çevre kirliliği açısından hem de ekonomik açıdan önemlidir. Özellikle pahalı ve büyük miktarlarda kullanılan kaliteli çözücüler maddi olarak yük getirmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Ayrıca çözücüler toksik özelliği nedeniyle son zamanlarda tercih edilmemektedir (Kaya ve Ergönül, 2015). Ekstre edilecek maddeye bağlı olarak katı-sıvı ya da sıvı-sıvı ekstraksiyonu olarak sınıflandırılmaktadır (Başer, 2010; Kaya ve Ergönül, 2015).

#### **2.3.3.1. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Sıvı çözücüler yardımıyla katı maddelerden etken madde izolasyonunda sık olarak bu yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemde seçilen çözücü, etken maddeyi çözebilmeli ancak istenmeyen maddeleri çözmemesi gerekmektedir. Ekstraksiyon işlemi çözücü ve çözünen madde arasında denge olana kadar devam etmektedir (Başer, 2010). Katı-sıvı ekstraksiyonunda işlem daha hızlı yapılmakta, az miktarda çözücü kullanılmakta, maliyeti daha düşük olmakta ve ekstrakt daha saf olarak elde edilebilmektedir. Bunun yanında seçilen çözücünün maddeyi çözmemesi sorun teşkil etmektedir (Arısoy ve Şener, 1994; Yavuz ve Aksoy, 2006). Sıcaklık, sıvı-katı oranı, akış hızı, parçacık büyüklüğü gibi etkenler özüt konsantrasyonunu etkilemektedir (Ignat ve ark., 2011).

#### **Maserasyon**

Çiçeklerden uçucu yağ elde etmek amacıyla kullanılan ilkel yöntemlerden biridir (Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). Ekstre edilecek olan maddenin uygun çözücü içinde ve bir süre temas halinde olmasını sağlayarak yapılmaktadır (Başer, 2010). Bitkisel yağ veya 60-70°C de eritilmiş hayvansal yağın içine çiçekler atılarak içindeki aroma maddelerinin yağa geçmesi sağlanmaktadır (Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). Kullanılacak maddenin küçük parçalar halinde olması gerekmektedir. Ancak toz

halinde olursa çözücünün maddeye yeterli nüfuz etmesi ve ekstraksiyon veriminin yeterli olması için uygun bir karıştırma işlemi yapılmalıdır (Başer, 2010). Maserasyon işlemi verimsiz ve zaman alan bir işlemdir (Cellat, 2011).

### **İnfüzyon**

Bu işlem ekstre edilecek maddenin üzerine sıcak su eklenip, kaynar su banyosu üzerinde kaynatılarak soğuduktan sonra süzülmesi esasına dayanmaktadır. Kaynar su banyosu üzerinde ısıtılırken sık sık karıştırma işleminin uygulanması gerekmektedir. Isıtma işlemi sırasında ısıya hassas olan maddelere dikkat edilmelidir. Genellikle infüzyon hazırlarken çözücü olarak su kullanılmaktadır. Suyun içindeki tuz ve mineraller, suyun asidik ya da bazik olması ekstraksiyon işlemine etki etmektedir. Örneğin, suyun içinde bulunan demir tanenlerle birleşerek infüzyon işleminin bozulmasına neden olabilmektedir (Başer, 2010).

### **Dekoksiyon**

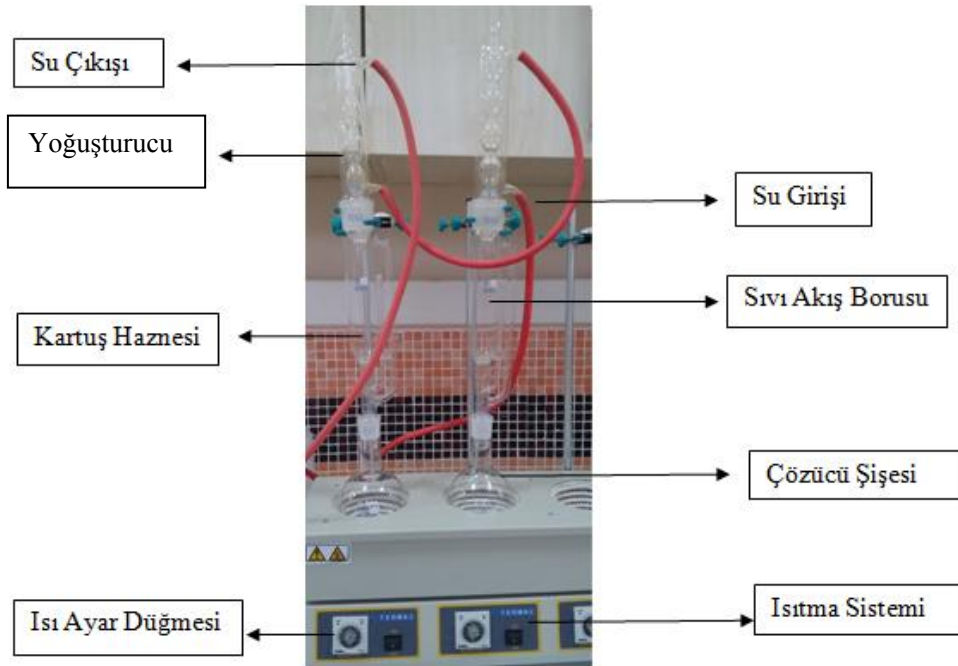
Bu yöntemde, ekstre edilecek madde üzerine soğuk su eklenir ve 30 dakika su banyosu üzerinde kaynatıldıktan sonra sıcakken süzme işlemi uygulanmaktadır. Su banyosundaki ısıtma süresi ekstre edilmek istenen maddeye göre değişiklik gösterebilmektedir. Isıtma süresinin uzun olması ısıya hassas olan maddelerde bozunma riski oluşturmakta ancak ekstraksiyon verimini arttırmaktadır (Başer, 2010).

### **Anfloraj**

Yasemin gibi farklı çiçeklerin ekstraksiyon işleminde kullanılmaktadır (Başer, 2010). Yasemin, sümbülteper gibi çiçeklerin uçucu yağları, az miktarda yağ içerdikleri ya da yapılarının narin olması nedeniyle destilasyonla elde edilememektedir. Bu gibi durumlarda uçucu yağları elde etmek için zahmetli ve uzun süren anfloraj işlemi uygulanmaktadır (Cellat, 2011). Bu yöntemde çözücü olarak sığır don yağı ve domuz don yağının karışımı kullanılmaktadır (Başer, 2010). Örneklerin soğuk hayvansal yağa doğrudan temas ettirilmesi şeklinde uygulanmaktadır (Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). İstenilen kalitede ürün elde etmek için her iki yağın da saf ve kokusuz olması gerekmektedir. Bu yöntemin günümüzde kullanımı azalmıştır (Başer, 2010).

## Soxhlet Ekstraksiyonu

Franz von Soxhlet tarafından geliştirilen, 1980'li yılların ortalarına doğru popüler olan Soxhlet ekstraksiyonu günümüzde laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu katı örneklerdeki organik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü olarak adlandırılan özel bir cihazla yapılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü ısıtma sistemi, bunun üzerine yerleştirilen çözücü şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon) ve soğutulmuş bir kondansörden (yoğuşturucu) oluşmaktadır (Şekil 2.2). Çözücü şişeye doldurularak ısıtma sistemi üzerine yerleştirilmektedir. Ekstraksiyon bölgesine katı olan örnek koyularak çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılmaktadır. Kaynayan çözücünden oluşan buharlar kondansatöre hareket ederek buharlaşır ve örneğin üzerine damlayarak örneği ıslatmaktadır. Ekstraksiyon bölgesindeki çözücünün seviyesi sifonun üstüne ulaştığında örnek bölmesi boşalarak çözücü şişesine akmaktadır. Her seferinde ekstre edilen materyaller şişede kalırken temiz çözücü bu sirkülasyona devam etmektedir (Büyüktuncel, 2012).



Soxhlet ekstraksiyonunun cazip avantajları bulunmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonunda örneğin sürekli taze çözücüyle temas etmesi, örnekten daha fazla ekstrakt uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca özütleme işleminden sonra filtrasyona ihtiyaç

olmamaktadır. Az uğraş ve düşük maliyetli basit ekipmanlar kullanılarak uygulanmaktadır (Luque-Garcia ve de Castro, 2004; de Castro ve Priego-Capote, 2010; Büyüktünel, 2012).

Soxhlet ekstraksiyonu kullanılırken ortaya çıkan en önemli problem örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kullanmadan önce temiz bir çözücü ile ekstrakte edilerek temizlenmelidir. Bunun yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. Ekstraksiyon için uzun zaman gerekmekte ve fazla miktarda organik çözücü kullanılmaktadır. Kullanılan bu çözücü çevresel bir problem oluşturmakta ve zararsız hale getirilmesi pahalı olmaktadır. Soxhlet yöntemi çözücünün seçiciliği ile sınırlı kalmaktadır (de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998; de Castro ve Priego-Capote, 2010; Büyüktünel, 2012).

#### **2.3.3.2. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu**

Çoğunlukla bir sıvıda bulunan istenmeyen maddeleri arındırmak veya sıvıyı saf hale getirmek amacıyla yapılmaktadır. Bu işlemde birbiriyle karışmayan iki veya daha fazla sıvı kullanılmaktadır (Başer, 2010; Ignat ve ark., 2011). Uzun yıllardır kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları bulunmaktadır. Fazla miktarda çözücü kullanılması, gerekli saflıkta ekstrakt elde edilmemesi, çözücü olarak kullanılan sıvının yeterince uzaklaştırılmaması, emülsiyon faz oluşması ve miktarsal sonuçların elde edilememesi gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

#### **2.3.4. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon**

Gazlarla ekstraksiyon endüstriyel uygulamalarda önemli bir yere sahiptir ve sık olarak kullanılmaktadır. Gazların sahip olduğu difüzyon özelliği nedeniyle tercih edilmektedir. Atmosferik basınç altında gaz halinde bulunan çözücüler sıkıştırılıp sıvı hale getirilerek uygulanmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sonunda da tekrar gaz haline gelerek ortamdan kolayca uzaklaştırılmaktadır. Bu özellik sıvı çözücülerin kullanımıyla son ürün olarak ortaya çıkan çözücü atıkları gibi tehlikeli faktörlerin oluşumunu engellemektedir (Başer, 2010).

### **2.3.5. Süperkritik Akışkanlarla Ekstraksiyon (SAE- Supercritical Fluid Extraction, SFE)**

Son yıllarda gerek çevresel gerekse sağlık açısından, doğal ürünlerin organik çözücülerle işlenmesi istenmeyen bir durum haline gelmiştir. Bu nedenle geleneksel çözücü ekstraksiyonuna alternatif olarak süperkritik akışkanlarla ekstraksiyona her geçen gün ilgi artmaktadır (Kılıç, 2008; Rai ve ark., 2015).

Süperkritik akışkan kendi kritik sıcaklığı ve kendi kritik basıncı üzerinde sıcaklık ve basınç uygulanan bir element, madde ya da karışım olarak tanımlanmaktadır (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012). Süperkritik akışkan, bir maddenin gaz ve sıvı arasındaki bir ara formunu göstermektedir (Büyüktuncel, 2012; Kaya ve Ergönül, 2015). Çözücüler süper kritik koşullarda hem gazın hem de sıvının özelliğini aynı anda taşımaktadır (Başer, 2010). Süperkritik akışkanın düşük basınç ve yüksek sıcaklık altında yoğunluğu azalmakta ve gazlarda bulunan düşük vizikosite, sıfır yüzey gerilimi ve yüksek difüzyon hızı özelliklerini göstermektedir (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012). Aynı şekilde yüksek basınç ve düşük sıcaklık altında yoğunluğu artmakta ve sıvılarda bulunan yüksek çözme gücüne sahip olmaktadır (Kılıç, 2008; Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012).

Süperkritik akışkanların yüzey gerilimi olmadığı için çözme özellikleri sıvı çözücülere benzerken, maddeye nüfus etme özellikleri yüksek basınçtaki bir gaz gibi olmaktadır. Basınç ve sıcaklığa bağlı olarak çözme gücü değişmektedir. Yüksek sıcaklık ve düşük basınç altında çözme gücü azalırken, yüksek basınç altında artış göstermektedir (Başer, 2010). Ayrıca süperkritik akışkanların çözme gücü genel olarak yoğunluklarının artmasıyla sağlanmaktadır (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012). Eğer çözme gücü yeterli değilse belirli oranda polar çözücü ilave edilerek çözme gücü artırılmaktadır (Başer, 2010). SAE'de basınç, sıcaklık ve akış hızının kontrolünü sağlayan bir cihazla süperkritik akışkan üretimi sağlanmaktadır. Ekstrakt ya katı-faz tuzağında (trap) ya da uygun bir çözücü içinde toplanmaktadır. Ekstraksiyon işlemi 10-20 mL çözücü ile 20-60 dakika arasında bir sürede gerçekleşmektedir (Büyüktuncel, 2012).

SAE'de organik çözücüler yerine süperkritik sıvı özelliği gösteren çözücüler kullanılmaktadır (Kılıç, 2008). Süperkritik özelliği sayesinde etken madde seçici olarak elde edilmektedir (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012; Kaya ve Ergönül, 2015). Genellikle, düşük kritik sıcaklık ve basınca sahip olduğu, toksik olmaması, alev

almaması, apolar olması, ucuz olması ve daha yüksek ekstraksiyon oranı sağlaması nedeniyle süperkritik akışkan olarak karbondioksit (Kritik koşulları = 30.9°C ve 73.8 bar) yaygın olarak kullanılmaktadır (Ignat ve ark., 2011; Büyüktuncel, 2012; Rai ve ark., 2016).

Geleneksel yöntemlere göre ekstraksiyon zamanının kısa olması ve organik çözücülerin az kullanılması, süper kritik sıvıların yüksek kütle transferi özelliği göstermesi, küçük bir sıcaklık ve basınç değişiminde verimin artması avantaj sağlamaktadır (Ignat ve ark., 2011; Büyüktuncel, 2012; Rai ve ark., 2014). Bazı çalışmalar 20-60 dakikalık SAE'de elde edilen geri kazanımın birkaç saatlik soxhlet ekstraksiyonundan daha yüksek olduğunu göstermektedir (Büyüktuncel, 2012).

### **2.3.6. Diğer Ekstraksiyon Yöntemleri**

#### **2.3.6.1. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (KFME-Solid Phase Microextraction, SPME)**

Analitik metodlar genellikle örnek toplama, hazırlama, ayrıştırma, tespit ve sonuçları yorumlama basamaklarından oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar örnek toplama ve hazırlamanın analiz süresinin %80'ini oluşturduğunu göstermektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Pawliszyn ve arkadaşları tarafından 1989 yılında bulunan katı-faz mikroekstraksiyon (KFME) yöntemi ile örnek hazırlanması, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma çözücü bulunmayan tek bir aşamada birleştirilmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). Çözücüsüz bir yöntem olduğu için çevre dostu olarak kabul edilmektedir (Başer, 2010).

Katı faz mikro ekstraksiyon metodu çevre araştırmaları, koku ve parfümeri araştırmalarında uygulanmaktadır (Başer, 2010). Çevresel, biyolojik ve gıda örneklerinin yapısında bulunan yarı uçucu ve uçucu organik bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Alver ve ark., 2012; Kaya ve Ergönül, 2015). Örnek olarak, suda bulunan uçucu organik bileşiklerin, fenollerin, pestisitlerin ve poliaromatik hidrokarbonların belirlenmesinde kullanılmıştır (Alver ve ark., 2012).

KFME ekstraksiyon işleminin süresi 1-20 dakika arasında değişmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). KFME'nin diğer klasik yöntemlere göre avantajı, hızlı, basit, düşük



maliyetli, çözücü kullanılmadan ekstraksiyon işleminin yapılması (Kafkas ve ark., 2005; Kılıç, 2008; Alver ve ark., 2012; Cellat, 2011), temiz ve konsantre ekstrakt elde edilebilmesidir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Enjektör biçiminde tasarlanan şekli uygulama açısından kolaylık sağlamaktadır (Başer, 2010). Kafkas ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada KFME ile sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğini karşılaştırmıştır. Üç farklı çilek çeşidi denenmiştir. Araştırma sonunda kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre aroma profilinin farklılık gösterdiği saptanmıştır. KFME’de 32 tane çilek esteri belirlenirken, sıvı-sıvı yönteminde 10 ester belirlenmiştir. Bu nedenle KFME çilek esterlerini saptamada daha faydalı bulunmuştur.

### **2.3.6.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MDE-Microwave-Assisted Extraction, MAE)**

Mikrodalga teknolojisi ikinci dünya savaşından beri kullanılmaktadır (Cellat, 2011). İlk defa 1980’li yılların sonlarında ev sistemlerinin kullanılmasıyla uygulanmıştır (Camel, 2000). Yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalar (300-300000 MHz) mikrodalga olarak adlandırılmaktadır (Büyüktuncel, 2012). Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ekstraksiyon için gereken ısı enerjisinin mikrodalga enerjisiyle sağlandığı, mikrodalgaya duyarlı çözücüler kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemini tanımlamaktadır (Başer, 2010). Bu yöntemde, klasik temas yoluyla ısı iletim sistemlerinden farklı olarak mikrodalgaların etkisiyle aynı anda örneğin tamamını ısıtmak mümkündür (Camel, 2000; Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Mikrodalga ekstraksiyonu bitkilerde bulunan polifenoller ve lignanların ayrıştırılmasında kullanılmaktadır (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Hızlı, basit ve düşük maliyetli bir ekstraksiyon tekniği olduğu kanıtlanmıştır (Wu ve ark., 2015)

Çözücünün içeriği, bitkisel materyal ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olarak mikrodalga enerjisinin etkinliği değişmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi için aranan en önemli özellik, kullanılacak çözücünün mikrodalga enerjisi alabilmesidir (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012). Bu nedenle mikrodalga enerjisi absorblayan polar çözücüler kullanılmaktadır. Eğer apolar çözücüler kullanılarak yapılmak istenirse, çözücünün bulunduğu kabın içine mikrodalga enerjisi absorbe etme özelliği olan maddelerle kaplanmış karıştırıcılar konarak karıştırma ve ısı transferi sağlanmaktadır (Başer, 2010).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon açık kap sistemi ve kapalı kap sistemi olarak ikiye ayrılmaktadır (Camel, 2000; Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Açık kap sistemi, açık kap içinde atmosferik basınç altında uygulanmaktadır (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Açık kap sisteminde uygulanan sıcaklık çözücünün atmosferik basınç altındaki kaynama noktasıyla sınırlıdır (Camel, 2000; Büyüktuncel, 2012). Kapalı kap sistemi ise basınç ve sıcaklığın kontrol edilebildiği kapalı kaplar içinde gerçekleşmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Bu durum basıncın artmasını ve çözücünün kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılmasını sağlamaktadır (Büyüktuncel, 2012). Kapalı kap sisteminde ekstraksiyon işlemi için kullanılan çözücü miktarının az, ekstre edilebilen numune sayısının fazla ve ekstraksiyonun süresinin daha kısa olması avantaj sağlamaktadır (Camel, 2000; Eskilsson ve Björklund, 2000; Kılıç, 2008; Cellat, 2011; Kaya ve Ergönül, 2015). Ayrıca uçucu bileşikler elde etmek için kapalı kap sistemi en uygun yöntem olarak görünmektedir. Uçucu analitlerin kaybını önlemek için kapak açılmadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulması gerekmektedir (Saim ve ark. 1997; Büyüktuncel, 2012; Wu ve ark., 2015).

Pan ve ark. (2003) yeşil çay yapraklarından polifenol bileşiklerin elde edilmesinde mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ultrasonik ve soxhlet ekstraksiyonunu karşılaştırmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun diğer yöntemlere göre yüksek verimli, yüksek ekstraksiyon seçiciliğine sahip, daha az zaman ve daha az emek gerektiren bir yöntem olduğu saptanmıştır. Gıda endüstrisi ve tıp alanında diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre hızlı, güvenli ve çevre dostu olduğu belirtilmiştir.

### **2.3.6.3. Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (SÇE-Pressurised Solvent Extraction, PSE)**

Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu, klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Yöntemin etkisini arttırmak için yüksek sıcaklık ve basınçta organik çözücüler kullanılmaktadır. Yüksek basınç, çözücünün sıvı halde kalmasını ve deney materyalinin içine iyice nüfuz etmesini sağlamaktadır (Kılıç, 2008; Cellat, 2011; Büyüktuncel, 2012). Yüksek sıcaklık ise, ekstraksiyon kinetiğini hızlandırmaktadır (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Sıcaklığın artmasıyla, sıvı çözücünün vizikositesi azalarak partiküllerin içine daha kolay girmekte ve ekstraksiyon verimi artmaktadır (Büyüktuncel, 2012). Bu özellikler sayesinde güvenli ve hızlı bir şekilde

ekstraksiyon işlemi gerçekleşmektedir (Kılıç, 2008; Cellat, 2011). Bu yöntem her zaman en yüksek verimle sonuçlanmamaktadır. Bazen yüksek sıcaklık ve basınç bozucu etki yaparak ekstraksiyon verimini etkileyebilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

#### **2.3.6.4. Ultrasonik Enerji Destekli Ekstraksiyon (UEDE-Sonation-Assisted Liquid Extraction, SAE)**

Bu yöntemde, örneğe 20 KHz üstünde frekanslarla akustik titreşimler uygulanmaktadır (Büyüktuncel, 2012). Ultrasonik enerji hücre duvarı üzerine mekanik olarak gerilim uygulayarak hücre içindeki madde transferini kolaylaştırmaktadır. Ultrasonik enerji destekli ekstraksiyon katı madde içindeki sıvının elde edilmesi amacıyla uygulanmaktadır. Ultrasonik enerji sayesinde hücre duvarları kolaylıkla yıkılmaktadır. Buna bağlı olarak madde transferi hızlandığı için ekstraksiyon işlemi daha verimli ve kısa sürede gerçekleşmektedir (Başer, 2010).

Ultrasonik enerji destekli ekstraksiyon katı-sıvı ekstraksiyonu şeklinde gerçekleşmektedir (Başer, 2010). Akustik titreşimlerin sıvının içinden geçerken oluşturduğu kavitasyon (boşluk oluşumu) sıvı ortamda kabarcık üretir ve katı maddelerin sarsılarak partiküllerin kopmasını sağlamaktadır (Büyüktuncel, 2012). Ultrasonik enerji ile parçacık boyutunda mekanik olarak oluşan küçülme çözücü ile materyal arasındaki temas yüzeyini arttırmaktadır. Bu etkisi sayesinde çözücünün hücre içine difüzyonunu ve ekstraksiyon veriminin artışı sağlamaktadır (Başer, 2010; Büyüktuncel, 2012).

Ultrason enerjisi ile kullanılan çözücü miktarı ve işlem süresi kısaltılmaktadır. Daha düşük sıcaklıklarda madde yapısına hasar vermeden ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir (Wu ve ark., 2001). Ultrasonik enerji ekstraksiyonunun etkin, emniyetli, güvenilir, basit ve kolay uygulanabilmesi yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (Başer, 2010). Ultrasonik banyo en sık kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı olarak bilinmektedir (Büyüktuncel, 2012). Ultrasonik destekli ekstraksiyon gıda sanayisinde verim arttırmak, mikrobiyal ve enzim inaktivasyonu amaçlarıyla kullanılmaktadır (Başer, 2010). Wu ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada *Panax ginseng* (Kore ve Çin ginseng) ve *P. quinquefolium* (Amerikan ginsengi) bitkilerini kullanarak ultrasonik enerji destekli ekstraksiyon ve soxhlet ekstraksiyon verimini karşılaştırmışlardır. Bu araştırmaya göre, 2 saatlik ultrasonik ekstraksiyon

veriminin 8 saatlik soxhlet ekstraksiyon veriminden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca ekstraksiyon hızının soxhlet ekstraksiyon hızından yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

#### **2.3.6.5. Elektrik Akımlı Ekstraksiyon**

Elektrik enerjisi kullanılarak elektriksel ve manyetik alan oluşturulmakta ve bu sayede ekstraksiyon veriminin artması sağlanmaktadır. Ortaya çıkan elektriksel ve manyetik alan sıvı ortamdaki madde iyon etkileşimini olumlu yönde etkileyerek madde transferini kolaylaştırmaktadır. Bu yöntem bitkisel hammaddelerden alkaloid elde etmek için kullanılmıştır (Başer, 2010).

#### **2.4. Antimikrobiyal Aktivite**

Antimikrobiyal madde, düşük dozlarda bile bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmaların gelişimini önleyen, biyolojik kökenli sekonder metabolitlerdir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Altaş, 2009; Topal, 2013). Antimikrobiyaller, Pasteur ve Joubert tarafından bir bakterinin diğer bakteri üzerinde üremeyi engelleyen etkisi gözlemlenerek keşfedilmiştir. Ancak üremenin durma nedeninin diğer bakterinin sentezlediği antibiyotikten kaynaklandığı bilinmemekteydi (Altaş, 2009). Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma üremesini engelleyen mikrobiyostatik; mikroorganizmanın ölmesine neden olan mikrobisit gibi maddeler olabilmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; zgmş, 2010; Topal, 2013).

Antibiyotik, sadece tek bir mikroorganizma tarafından sentezlenen ve bakterilerin üremesini engelleyen veya öldüren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antimikrobiyaller yalnızca antibiyotiklerden oluşmamaktadır. Antimikrobiyaller arasında sentetik olarak oluşturulan ve antibiyotiklere benzer özellik gösteren kemoterapötik maddelerde bulunmaktadır (Altaş, 2009; Topal, 2013). Kemoterapötik maddeler, insanların ve hayvanların enfeksiyon hastalıklarından korunması ve tedavisinde kullanılmaktadır (Topal, 2013).

Antimikrobiyal maddelerin sahip olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir (zgmş, 2010; Topal, 2013). Seçici toksisite; antimikrobik maddenin konağa zarar vermeyip sadece hastalık yapan mikroorganizma üzerinde, düşük konsantrasyonda bile etki göstermesidir (Akşit, 1993; Topal, 2013). Böyle bir etki oluşması için,

antimikrobiyal maddenin memeli hücrelerini değil mikroorganizma hücrelerini hedef alması gerekmektedir. Bakteriler prokaryot, memeliler ökaryot olduğu için prokaryot hücrelerde spesifik olarak bulunan molekülleri hedef alan antimikrobiyal maddeler yüksek oranda seçici toksisite özelliği göstermektedir (Topal, 2013).

Antimikrobiyal maddeler dar ya da geniş spektrumlu olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlama etki gösterdikleri mikroorganizma cins sayısının az ya da çok oluşuna göre yapılmaktadır (Özgümüş, 2010; Topal, 2013). Tedavide en ideal olan antimikrobiyal madde, dar spektrumlu olup etkisini enfeksiyon etkeni olan mikroorganizma üzerinde gösterendir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler ise normal flora olarak adlandırılan, konağın bağışıklık sisteminde görev alan ve ekolojik dengeyi sağlayan mikroorganizma yapısını bozmaktadır. Ancak tek bir patojene bağlı olmayan enfeksiyonlarda ya da laboratuvar sonuçlarının beklenemeyeceği acil vakalarda geniş spektrumlu antimikrobiyaller kullanılmaktadır (Topal, 2013).

Antimikrobik maddeler, mikroorganizmaların çeşitli yapı ve işlevleri üzerine beş farklı yoldan etki etmektedir (Akşit, 1993; Van Boxtel, 2007; Özgümüş, 2010; Topal, 2013);

- Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu
- Stoplazma zarının işlev ve yapısının bozulması
- Protein sentezinin inhibisyonu
- Nükleik asit sentez ve işlevinin bozulması
- Kimyasal yapılarındaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulması

Antibiyotik ve kemoterapötikler mikroorganizmalara bağlı gelişen hastalıklarla mücadelede önemli bir yere sahip olmasına rağmen kullanırken dikkat edilmelidir. Bu maddelerin bilinçsiz ve gereğinden fazla kullanılması sonucunda; sekonder enfeksiyonlar oluşabilmekte, mikroorganizma suşları antibiyotik ve kemoterapötiklere karşı direnç geliştirebilmekte ve enfeksiyonların tedavisinde etki göstermemektedir (Topal, 2013). Antimikrobiyal maddelere karşı gelişen direnç her geçen gün ciddi bir sorun haline gelmektedir (Hussain, 2011; Topal, 2013). Direnç gelişmesine neden olan başlıca etken antimikrobiyallerin irrasyonel kullanımınıdır. Örneğin, kümes hayvanlarında et üretimini arttırmak için antibiyotiklerin kullanılması, hekim bilgisi dışında antibiyotik alınması ya da hastanelerde tedavi için yoğun şekilde antibiyotik uygulanması gibi faktörler dirençli mikroorganizmaların meydana gelmesine ve hızla yayılmasına neden olmaktadır (Özgümüş, 2010). Yeni ilaçlar bakterilerin direnç mekanizmalarına dikkat

edilerek geliştirilse de kısa süre içinde bakteriler bu ilaçlara da direnç kazanabilmektedir (Topal, 2013).

Mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı gösterdiği direnç mekanizmaları aşağıdaki gibi gruplanabilmektedir (Akşit, 1993; Özgümüş, 2010);

- Mikroorganizmanın kendine etki gösteren ilaçları parçalamak için enzim sentezlemesi
- Mikroorganizmanın kendi stoplazma zarının geçirgenliğini değiştirerek antibiyotığın hücre içine girişini engellemesi
- Mikroorganizmanın ilacın etkilediği bölgedeki yapı enzimlerini değiştirmesi
- Antibiyotığın aktif olarak hücre içinden dışarı atılması
- Mikroorganizmanın ilaçtan etkilenmeyen yeni bir metabolik yol geliştirmesi

Antimikrobik maddeler 17. yüzyıldan beri enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Akşit, 1993). Modern kemoterapinin yani kimyasal maddelerle tedavinin temelleri Paul Ehrlich tarafından 20. yüzyılda atılmıştır (Akşit, 1993; Özgümüş, 2010). Alexander Fleming'in 1929 yılında penisilini keşfetmesi (Özgümüş, 2010; Topal, 2013), Ernst Chain ve Howard Florey'in 1940 yılında penisilini kullanılabilir hale getirmeleri enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni bir dönem başlatmıştır (Özgümüş, 2010). 1943 yılında ilaç firmaları tarafından kitleler halinde üretilen penisilin, enfeksiyon hastalıklarında etkili bir tedavi sağlamış ancak 1947 yılının başlarında dirençli mikroorganizma suşları meydana gelmiştir (Topal, 2013). Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde penisilin ve diğer antibiyotiklerin gösterdiği başarı gereksiz ve yaygın olarak kullanıma neden olmuştur. Buna bağlı olarak günümüzde 'antibiyotik dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonlar' tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Topal, 2013). Son yıllarda, önceki yıllarda kullanılan antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı ikili direnç geliştiren çok sayıda mikroorganizma klinik olarak izole edilmiştir. Bu mikroorganizmalarla tek yönlü etki gösteren antibiyotiklerin mücadelesinin zor olacağı saptanmıştır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Patojen bir bakterinin birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirmesi nedeniyle enfeksiyon hastalıklarını önlemek, direnç sorununu engellemek, günümüzde kullanılan antimikrobiyallerin yan etkilerini ve sentetik ilaçların yüksek maliyetini azaltmak için

yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması gerekmektedir (Hussain, 2011; Topal, 2013). Antibiyotik kullanımına bağlı ortaya çıkan sorunlar nedeniyle antimikrobiyal özelliği olan bitkilere ilgi yeniden artmaktadır (Emori ve Gaynes 1993; Topal, 2013). Bitkilerde bulunan antimikrobiyal bileşenler, günümüzde kullanılan antimikrobiyal ajanlardan farklı mekanizmalarla bakteri gelişimi engelleyebilmekte ve dirençli suşlara bağlı hastalıkların tedavisinde başarılı sonuçlar sağlayabilmektedir (Topal, 2013).

Benli ve Yiğit (2005) yaptıkları çalışmada aseton, dimetilsülfoksit (DMSO), etil asetat, kloroform, etanol, metanol, distile su ve %5'lik Tween karışımı gibi farklı çözücülerle kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin ekstraktlarını hazırlamış ve 14 farklı mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal özelliklerini disk difüzyon metodu kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda en fazla inhibisyon zonu 13 mm ile metanol çözeltisinde oluşmuştur.

Burt ve Reinders (2003) defne, karanfil tomurcuğu, keklikotu ve kekik bitkisinin iki varyetesinin *Escherichia coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite belirlemede disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Kullanılan bitkiler arasında kekiğin iki varyetesinin de güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Ertaş ve ark. (2012), Doğu Anadolu Bölgesinde (Van-Hakkari) tıbbi amaçlarla kullanılan *Ferrula haussknechtii* Wolff. Ex. Rech. f. ve *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* (Schultz Bip.) Grierson. bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Bitki ekstraktlarını hazırlamak için kloroform, etanol ve metanol çözücülerini kullanılmıştır. Disk difüzyon metodu kullanılarak 7 farklı mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. *Ferrula haussknechtii* Wolff. Ex. Rech. f. bitkisi tüm test mikroorganizmalarının tamamının büyümesini engellerken, *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamitoides* (Schultz Bip.) Grierson bitkisi özellikle *Salmonella typhinum* ve *Bacillus substilis* test organizmalarının büyümesini engellemiştir. Metanol kullanılarak elde edilen ekstraktların diğerlerine göre daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır.

Machado ve ark. (2003), Brezilya'da bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan 14 tıbbi bitki ekstraktını, *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) ve ATCC 33591 (MRSA) üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri yönünden incelemişlerdir. Araştırma sonunda, *P.*

*granatum*'un test edilen tüm *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Dülger ve ark. (2002) tarafında Urfa (Siverek) bölgesinde çeşitli hastalıklara karşı halk arasında kullanılan *Vitex agnuscastus* L. bitkisinin Gram(+), Gram(-) bakteriler ve mayalar üzerinde antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Bitki kloroform, aseton, etil asetat ve etanol çözücülerini ile ekstrakte edilmiştir. Aseton ekstresi *Mycobacterium smegmatis*, kloroform ekstresi *Micrococcus roseus*, etil asetat ekstresi *Micrococcus luteus* ve *Micrococcus roseus*, etanol ekstresi *Micrococcus luteus* üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Kullanılan çözücüye bağlı olarak antimikrobiyal aktivitenin değiştiği saptanmıştır.

Rifai ve ark. (2005) tarafından Fas'ta toplanan deniz süngerinin (*Phylum porifera*) 4 bakteri (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*) ve 5 mantar (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* R, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) türüne karşı, disk difüzyon metoduyla antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Süngerler aseton ile homojenleştirilerek süzümüştür. Daha sonra kloroform kullanılarak ekstreler elde edilmiştir. Kullanılan deniz süngerleri test edilen mikroorganizmaların en az birine karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. %50 oranında antibakteriyel etki, %20 oranında antifungal etki saptanmıştır.

Ertürk ve Demirbağ (2003) tarafından, kurutulup kökleri sebze olarak tüketilen *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) bitkisinin kök ve gövde kısmının antimikrobiyal ve antifungal aktivitesi araştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sırasında farklı bir metod kullanılmıştır. Blendırda parçalanmış 50 g örneğin üzerine çözücü (aseton, etil asetat, kloroform, etanol, metanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve %5'lik tween 20 karışımı su) eklenerek 5-6 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 24 saat boyunca dolapta bekletilip filtreden geçirilmiştir. Çözgenler rotary ile uçurulmuş ve özüt elde edilmiştir. Elde edilen özüt disk difüzyon metodu kullanılarak *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris* bakteri kültürlerine ve *Candida albicans* maya kültürüne karşı denenmiştir. Sonuç olarak ekstrelerin farklı oranlarda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Araştırmada aynı çözücüler kullanılmasına rağmen yaprak ekstresi kök



ekstresine göre daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir. Kök ve yaprak kısımlarının farklı etken maddeler içerdiği için farklı antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmektedir.

Oskay ve ark. (2007) beyaz çiriş, yalancı çiriş, çiriş otu gibi isimlerle anılan *Asphodelus aestivus* (Liliaceae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için çukur ve disk difüzyon metodunu karşılaştırmıştır. Bu bitkinin hemoroid ve saçkıran gibi hastalıklarda kullanıldığı belirtilmektedir. Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak %96'lık etil alkol ve n-bütanol kullanılmıştır. Aynı çözücü kullanılmasına rağmen çukur difüzyon inhibisyon zonu ortalamaları, disk difüzyon inhibisyon zonu ortalamalarından biraz daha yüksek bulunmuştur.

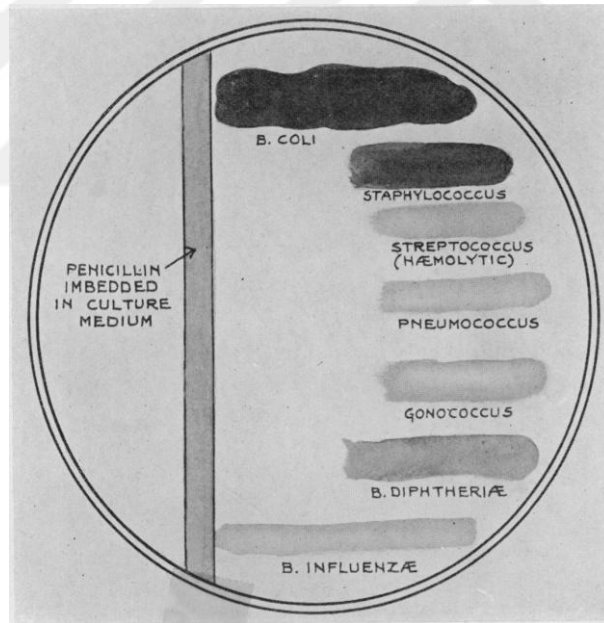
Kırbağ ve Zengin (2006), Elazığ yöresinde tıbbi amaçlarla kullanılan bazı bitkilerin antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda, bazı ekstraktların test edilen mikroorganizmaların gelişmelerini değişik oranlarda engellediklerini saptamışlardır.

Yiğit ve ark. (2009) ceviz yeşil kabukları ve yapraklarının antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Çözücü olarak su ve metanol kullanılmıştır. Kan, idrar, yara, kulak sürüntüsü, boğaz ve ağız örneklerinden izole edilen 299 suş test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile ceviz (*Juglans regia* L.) yeşil kabuk ve yaprak ekstraları *S.aureus*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.kefyr* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Metanol ile hazırlanan ekstraların antimikrobiyal aktivitesi su ekstralarından fazla olarak saptanmıştır.

Erdoğan ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada Konya ilinde endemik olarak yetişen *Sartoria hedyaroides* bitkisinin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Aseton, etanol ve metanol ekstralarının üç farklı konsantrasyonu (50, 100, 150 µg/plak) hazırlanmıştır. Ekstreler *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Yersinia enterocolitica* üzerinde test edilmiştir. Çalışma sonunda ekstralar test edilen mikroorganizmalara farklı oranlarda antimikrobiyal aktivite göstermiş ve konsantrasyon arttıkça antimikrobiyal aktivite de artış görülmüştür.

## 2.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, belirlenen bir bakteri türünün bir antimikrobiyal ajana karşı duyarlılığını saptamak amacıyla *in vitro* koşullarda uygulanan testlerdir (Kaygusuz, 2013). Antibiyotik duyarlılık testi, antibiyotik rezistans testi ya da antibiyogram olarak adlandırılmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarının en etkili tedavisi için uygun antibiyotik seçilmesini sağlamaktadır (Anonim, 2013). İlk antibiyotik duyarlılık deneyini, Fleming (1929) geliştirdiği yöntemle uygulamıştır. Bu yöntemde; agar besiyeri bulunan petri kutusunun kenara yakın yerinden dik olarak keserek şerit halinde dışarı almıştır. Küf özeti içeren besiyeri açılan boşluğa yerleştirilmiştir. Yayma yöntemiyle farklı bakteri kültürleri boşluğa dik bir açıyla ekilmektedir (Şekil 2.3). İnokulasyon sonunda bakteri kültürlerinin üreme ve inhibisyon alanları gözlemlenerek duyarlılığı değerlendirilmektedir. Antibiyotik emdirilen süzgeç kağıtların kullanımı ise Foster ve Woodruff tarafından önerilmiştir (Topal, 2013).



Şekil 2. 3 Fleming tarafından uygulanan antibiyotik duyarlılık deneyi (Fleming, 1929)

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, hastaların tedavilerine yol göstermek, ampirik tedavi için alt yapı oluşturmak, epidemiyolojik değişimi değerlendirmek, yeni antimikrobiyal ilaçların etkilerini değerlendirmek, antimikrobiyal ajanlara karşı oluşan yeni dirençleri saptamak ve direnç nedeniyle ortaya çıkabilecek tedavideki başarısızlıkları en aza indirmek, yeni ilaçları geliştirmek için uygulanmaktadır (Sümerkan, 2009).

Kullanılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinin (Töreci, 1995);

1. Tekrarlanabilir olması gerekmektedir. Aynı gün veya takip eden günlerde, aynı suş üzerinde denendiğinde aynı veya kabul edilebilir farklılıkta zon çapı ya da MİK değeri elde edilmelidir.
2. Doğru olması gerekmektedir. 15 mm zon oluşması gerekirken yapılan birçok denemede zon çapı 20 mm olarak ölçülüyorsa kendi içinde tutarlı, tekrarlanabilir ancak doğru sonuç değildir.
3. Yapılan duyarlılık testi sonucu değerlendirilirken, antimikrobiyal maddenin kullanıldığında ortaya çıkabilecek klinik sonuçlar öngörülebilir olmalıdır.

Ancak bu testler bazen hatalı sonuçlar vermektedir. Örneğin, bakterilerde var olan direnç mekanizmaları nedeniyle hatalı sonuçlar oluşabilmektedir. Klinik örneklerden elde edilen bakteri ne kadar saf olursa duyarlılık sonucu da o kadar başarılı elde edilmektedir. Ancak yavaş ve zor üreyen bakterilerde zaman faktörü önemli bir yer tutmaktadır. Hatalı sonuçlar ya da direnç tespit edilmesinde geç kalınması, dirençli suşların kontrol ve tedavisini zorlaştırmaktadır (Kaygusuz, 2013).

Bu testler, kolay uygulanabilen ve standartları önceden belirlenmiş testlerdir (Kaygusuz, 2013). Antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili standartlar Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI; önceden NCCLS), Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Avrupa Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) veya diğer kuruluşlar tarafından belli zaman aralıklarıyla gözden geçirilip güncellenerek yayımlanmaktadır (Gür, 1999; Sümerkan, 2009; Kaygusuz, 2013). Antibiyotiklerin kullanım sıklığına bağlı olarak MİK değerleri ve direnç özellikleri ülkelere göre farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle ülkeler kendi standartlarını geliştirmelidir (Gülay, 2000). Türkiye’de ise Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti’nin bir alt grubu olan “Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS)” grubu antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu için çalışmalar yapmaktadır (Gür, 1999).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, difüzyon ve dilüsyon testleri olarak iki temele dayanmaktadır (Kaygusuz, 2013). Difüzyon testleri, bir ortamda bulunan antimikrobiyal madde varlığını ya da test edilmek istenen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılığını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntemin temeli, agarlı besiyeri bulunan petri kutularına test mikroorganizmalarının ekiminin yapılması, antibiyotiğin

uygun şekilde besiyerine eklenerek diffüze olması (yayılması) ve test mikroorganizmalarının antibiyotiğin diffüze olduğu alanda gelişip gelişmediği esasına dayanmaktadır. Difüzyon testleri; disk difüzyon ve E-test yöntemleridir (Anonim, 2011). Dilüsyon testleri ise, belli bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini durdurmak ya da öldürmek için gerekli olan minimum antimikrobiyal madde konsantrasyonunu belirlemek için uygulanmaktadır (Kaygusuz, 2013). Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal maddenin farklı yoğunluktaki konsantrasyonları besiyerine eklenerek minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenmektedir (Gür, 1999). MİK; bir mikroorganizmanın üremesini engellemek için gereken en düşük ilaç konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2013). Disk difüzyon metodunun uygulanamadığı bazı bakterilerde kullanılabilir. Uygulaması diğer yöntemlere göre daha pahalı ve güçtür ancak MİK değerini verdiği için tercih edilmektedir (Gür, 1999). Dilüsyon testleri; tüp dilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleridir (Kaygusuz, 2013).

### **2.5.1. Disk Difüzyon Yöntemi**

Kirby-Bauer tarafından geliştirilen, uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olması nedeniyle en sık kullanılan yöntemdir (Kaygusuz, 2013). Antibiyotiğin kağıt disklere emdirilip, bakteri ekilen besiyerine difüze olması temeline dayanan bir test yöntemidir (Özgümüş, 2010; Kaygusuz, 2013). Bu yöntemde, test edilecek mikroorganizma belirli sayıda (0,5 McFarland bulanıklığında=  $\sim 1.5 \times 10^5$  KOB/mL) hazırlanarak agar yüzeyine ekilmektedir (Özgümüş, 2010; Kaygusuz, 2013). Yapılan standart çalışmalarda çoğunlukla Mueller Hinton Agar besiyeri kullanılmaktadır (Anonim, 2013). Kağıt diskler, belirli miktarda antibiyotik emdirilerek ekim yapılan agar plaklar üzerine steril bir pens yardımıyla yerleştirilmektedir (Gür, 1999; Gülay, 2002; Kaygusuz, 2013). İnkübasyon dönemi sonunda antibiyotiğin difüze olduğu alanda duyarlı mikroorganizmaların üreyemediği bir alan oluşmaktadır (Gülay, 2002; Özgümüş, 2010; Kaygusuz, 2013). İnhibisyon zonu olarak adlandırılan bu alanın çap ölçümü yapılmaktadır (Gür, 1999; Özgümüş, 2010; Kaygusuz, 2013). Zon çapları mm olarak ölçülüp, standart zon tablolarına bakılarak değerlendirilmektedir. Bu değerlendirme sonucunda mikroorganizmanın duyarlılık durumu belirlenmektedir (Kaygusuz, 2013). Kağıt disk etrafında inhibisyon zonu oluşmaması test edilen mikroorganizmanın o antimikrobiyal maddeye karşı dirençli olduğunu göstermektedir (Anonim, 2011).

Maliyeti düşük ve istenen mikroorganizma ile çalışma esnekliği mevcuttur. Diğer yöntemlere göre daha çok denenmiş ve standardize edilmiş bir yöntemdir. Bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Güç üreyen mikroorganizmalarda hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca okuması ve yorumlanması çıplak gözle yapıldığı için hatalara neden olabilmektedir (Gür, 1999; Gülay, 2002).

### **2.5.2. E-Test Yöntemi**

E-test yöntemi, disk difüzyon ve agar dilüsyon testlerinin beraber uygulanması esasına dayanmaktadır (Tunçkanat, 1999; Anonim, 2011). Son yıllarda geliştirilmiş olan E-test yöntemi, difüzyon temeline dayanır ancak katı besiyerinde MİK değeri saptanmasına olanak sağlamaktadır (Gür, 1999; Anonim, 2013; Kaygusuz, 2013).

Bir yüzünde antibiyotiğin farklı konsantrasyonları, diğer yüzünde rakamlar bulunan ince plastik şeritler (strip) kullanılmaktadır (Gür, 1999; Tunçkanat, 1999; Anonim, 2011). Disk difüzyon testindeki gibi 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan mikroorganizma Mueller Hinton agar yüzeyine ekilmekte ve E-test stripleri agar yüzeyine yerleştirilmektedir (Gür, 1999; Tunçkanat, 1999; Anonim, 2013; Kaygusuz, 2013). 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, E-test striplerinin çevresinde oluşan elips şeklindeki inhibisyon alanlarının stripi kestiği noktaya denk gelen antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmektedir (Gür, 1999; Tunçkanat, 1999; Gülay, 2002; Özgümüş, 2010; Anonim, 2013).

Özellikle *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea* gibi üremesi güç olan bakteri türlerinin MİK değerinin saptanmasında sık olarak kullanılmaktadır (Gülay, 2002). Rutin kullanımda kolay ve pratik olarak uygulanabilmektedir. Ancak diğer test yöntemlerine göre maliyeti daha fazla olmaktadır (Gür, 1999; Tunçkanat, 1999).

### **2.5.3. Tüp Dilüsyon Yöntemi**

Makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olarak iki şekilde uygulanmaktadır. Makrodilüsyon için test tüpleri, mikrodilüsyon için mikropate'ler kullanılmaktadır (Kaygusuz, 2013). Makrodilüsyon yöntemi, CLSI önerileri arasında bulunan ancak pratik olmadığı için yaygın olarak kullanılmayan bir yöntemdir (Tunçkanat, 1999; Anonim, 2011). Kullanılacak olan antibiyotik sıvı besiyeri kullanılarak seri halde sulandırılmaktadır.

Seri halindeki tüplerden her birine farklı konsantrasyonda antibiyotik, eşit sayıda mikroorganizma içeren süspansiyon ve eşit miktarda besiyeri eklenmektedir. Besiyeleri 35°C’de bir gecelik inkübasyon sonunda bulanıklık yönünden incelenir. Bakteri üremesini engelleyen, gözle görünür bulanıklığın olmadığı tüpteki ilaç konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir (Kaygusuz, 2013). *Clostridium* gibi besiyerinin üst kısmında yayılan bakterilerin duyarlılıklarını saptamak için veya test edilecek örnek sayısının az olduğu durumlarda kullanılmaktadır (Tunçkanat, 1999). Mikrodilüsyon yöntemi, kolay uygulanan, pratik ve ekonomik bir yöntemdir (Tunçkanat, 1999). Bu yöntemde 80, 96 veya daha fazla kuyucuğu bulunan ticari olarak geliştirilmiş plaklar kullanılmaktadır (Çelik ve Yuvalı Çelik, 2007). Bu seri kuyucukların içerisine belli miktarda kültür ve farklı dilüsyonları hazırlanan antimikrobiyal madde ilave edilerek etkileştirilmektedir (Tunçkanat, 1999; Çelik ve Yuvalı Çelik, 2007). İnkübasyon süresince oluşacak buharlaşma ve buna bağlı antimikrobiyal madde konsantrasyonundaki artışı engellemek için her çukurda en az 100 µL hacimde sıvı bulunmalıdır (Tunçkanat, 1999). İnkübasyon süresi sonunda üremenin olup olmasına göre antimikrobiyal maddenin etkili olduğu konsantrasyon belirlenmektedir (Çelik ve Yuvalı Çelik, 2007). Üreme olup olmadığı gözle görünür bulanıklık tayiniyle yapılmaktadır. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenmektedir (Tunçkanat, 1999; Çelik ve Yuvalı Çelik, 2007).

#### **2.5.4. Agar Dilüsyon Yöntemi**

Tüp dilüsyondan farklı olarak yoğunlukları farklı antibiyotik sulandırılmaları 1/10 oranında agar içine eklenerek petrilere dökülmektedir. Böylece her petride antibiyotik konsantrasyonu farklı olmaktadır. Yoğunluğu 0,5 McFarland standardına göre hazırlanan mikroorganizma süspansiyonu 1/10 oranında sulandırılıp, en düşük ilaç konsantrasyonunun olduğu petriden başlayarak ekilmektedir (Tunçkanat, 1999; Kaygusuz, 2013). Ayrıca üreme kontrolü ve kontaminasyon kontrolü için antibiyotik içermeyen iki petriye daha ekim yapılmaktadır (Tunçkanat, 1999). 35°C’de 18-24 saat inkübasyondan sonra üremenin olmadığı agar plaktaki ilaç yoğunluğu MİK değeri olarak belirlenmektedir (Kaygusuz, 2013). Uygulaması zahmetli ve diğer test yöntemlerine göre pahalı olduğu için rutin olarak kullanılmamaktadır (Tunçkanat, 1999).

## 2.6. Antioksidan Aktivite

Oksidan; ortamda beraber bulunduğu diğer biyokimyasal bileşenleri oksitleme özelliği olan maddelere verilen addır (Tokbaş, 2009). Oksidasyon, elektronların bir atom ya da molekülden ayrılması ile oluşan yükseltgenme olayıdır (Arıduru ve Arabacı, 2013). Oksidasyon, lipit içeren gıdaların koku, renk ve tatlarında veya canlı hücrelerde oksijenin etkisiyle ortaya çıkan istenmeyen değişimlerdir (Çimen, 1999; Tokbaş, 2009). İnsan vücudunda ve besinlerde lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller bulunmakta ve oksidasyona uğrayabilmektedir (Arıduru ve Arabacı, 2013).

Serbest radikaller, en dış yörüngeden kaybettiği elektron açığını başka atomların elektronlarını paylaşarak kapatmaya çalışan atomlardır (Metin, 2012; Dasgupta ve Klein, 2014). Hücrelerde endojen ve eksojen kaynaklı üretilen serbest radikaller, bir yada birden fazla eşlenmemiş elektrona sahip, yüksek oranda kararsız, kısa ömürlü, düşük molekül ağırlığı olan etkin moleküllerdir (Okan ve ark., 2013). Serbest radikaller “reaktif oksijen türleri (ROS)” olarak adlandırılır ve süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), singlet oksijen ( $O_2$ ), radikalik olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ) en önemli serbest radikallerdir (Çizelge 2.1) (Gök ve ark., 2006; Arıduru ve Arabacı, 2013). ROS’lar organizmada bulunan lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girerek yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, katarakt, diyabet, böbrek ve karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır (Gani ve ark., 2000; Metin, 2012; Arıduru ve Arabacı, 2013).

Serbest radikal yaratan kaynaklar; organizma içindeki normal metabolik faaliyetler, radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliği yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda oluşan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir (Gani ve ark., 2000; Gök ve ark., 2006; Metin, 2012; Arıduru ve Arabacı, 2013). Bunun yanında hipoksi, inflamasyon, aşırı egzersiz, dokulara giden kan akımının bozulması, intoksikasyon gibi faktörlerin de serbest radikal oluşumunu tetiklediği ileri sürülmektedir (Gani ve ark., 2000).

**Çizelge 2. 1** Bazı serbest radikal türleri (Tulunoglu, 1999; Gök ve ark., 2006; Koç, 2012; Dasgupta ve Klein, 2014)

Adı	Formülü	Tanımı
Hidrojen atomu	$H^{\bullet}$	En basit serbest radikal.
Süperoksit	$O_2^{\bullet -}$	Oksijen merkezli, hidroksil radikaline göre stabil olmayan bir radikaldir.
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	İnsan vücudundaki tüm moleküllere saldıran, substratlarla sınırsız tepkimeye girebilen, en fazla reaktif oksijen radikalidir.
Tiyil	$RS^{\bullet}$	Kükürt üzerinde eşleşmiş elektron bulunduran türlerin genel adı.
Peroksil, Alkoksil	$RO_2^{\bullet}$ , $RO^{\bullet}$	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	L- arginin amino asitinden in vivo koşullarda üretilir.
Azotdioksit	$NO_2^{\bullet}$	$NO^{\bullet}$ nun $O_2$ ile reaksiyonundan oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği en düşük radikaldir. Reaktif oksijen türevidir.
Perhidroksil radikali	$HO_2^{\bullet}$	Hidrojen peroksiti oluşturmaktadır.
Singlet oksijen	$O_2$	Oksijenin güçlü oksidatif formu

Antioksidanlar; oksidasyon zincir reaksiyonların başlangıcını ya da ilerlemesini önleyerek diğer moleküllerin oksidasyonunu yavaşlatan veya engelleyen bileşenlerdir (Tokbaş, 2009; Arkan, 2011). Antioksidanlar kararlı bileşenlerdir. Serbest radikallere kendi elektronlarını vererek etkisiz hale getirir ancak elektron vermelerine rağmen serbest radikallere dönüşmezler (Tokbaş, 2009). Antioksidan miktarı az bile olsa, kolayca okside olabilen maddelerin oksidasyonunu büyük oranda engellemektedir (Albayrak ve ark., 2010).

Vücutta serbest radikallerin oluşumunu ve serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyen birçok koruyucu mekanizma bulunmaktadır (Aydın, 2011). Besinlerden alınan ve insan vücudunda üretilen antioksidanlar, serbest radikaller ve Reaktif Oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif hasara karşı hayati önem taşımaktadır (Okan ve ark., 2013). Antioksidan savunma sisteminin; serbest radikal oluşumunu engellemek, radikal reaksiyonları sonlandırmak, ortaya çıkan radikalleri etkisiz hale getirmek ve hasarlı olan molekülleri ortadan kaldırmak ya da onarmak gibi görevleri bulunmaktadır (Arıduro ve



Arabacı, 2013). Antioksidanlar doğrudan ya da dolaylı olarak ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri korumaktadır (Aydın, 2011). Antioksidanların koruma özelliği antioksidan miktarı arttıkça belli bir noktaya kadar artış göstermekte, ancak miktar aşıldığı zaman antioksidan etki azalmaktadır. Bunun nedeni antioksidanın, zincirleme tepkimeye kendisi girmeden yükseltgenbilmesidir (Baladura ve Şimşek, 2013). İnsan vücudunda antioksidan savunma sisteminde görevli başlıca moleküller; enzimler, suda veya yağda çözünebilen radikal tutucular ve metal iyonlarını bağlayan proteinlerdir (Aydın, 2011). Antioksidanların tüm vücut bölümlerine girmesi teorik olarak mümkün görünse de beyin omurilik sıvısı (BOS), kemik iliği gibi bazı dokulara kandaki konsantrasyon da girmesi mümkün değildir (Metin, 2012).

İnsan vücudundaki biyolojik sistemler tarafından üretilen antioksidanların koruma etkisi sınırlı olup ROS oluşumu antioksidan kapasitesini aşarsa oksidatif stres oluşabilmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Bu nedenle gıdalarla alınan antioksidanlar yaşlanma sürecini yavaşlatma, kanser, katarakt, artrit ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları engellemede önemli rol oynamaktadır (Tokbaş, 2009; Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013; Almeida ve ark. 2016). Önemli antioksidan kaynakları arasında; bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, ağaç kabukları, kökler, baharatlar), hayvansal ürünler (peptidler, aminoasitler ve karotenoidler), enzimler (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) ve bazı mikroorganizmalar bulunmaktadır (Turhan ve Üstün, 2006; Arkan, 2011; Aydın, 2011; Arıduru ve Arabacı, 2013; Shahidi ve Zhong, 2015). Bunların antioksidan aktiviteleri içerdiği antioksidan özellikli bileşiklerden (karotenoidler, flavonoidler, kumarinler, fenolik asitler gibi) kaynaklanmaktadır (Aydın, 2011). Meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan bileşikler, hücrelerde meydana gelen oksidatif hasara bağlı ortaya çıkan birçok hastalığı önlemektedir (Çalışkan ve Polat, 2012).

Antioksidanları doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki grupta incelenmektedir (Arkan, 2011). Sentetik antioksidanlar kozmetik ürünler, ilaçlar ve besinlere ilave edilmektedir. Ancak sentetik antioksidanların bazı sağlık sorunlarına neden olabileceği tespit edildikten sonra birçok ülkede kullanımı kısıtlanmıştır (Arkan, 2011). Bu nedenle doğal antioksidanlara ilgi artmış ve sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilecek doğal antioksidanlar araştırılmaya başlanmıştır (Turhan ve Üstün, 2006; Arkan, 2011;

Baladura ve Şimşek, 2013). Doğal antioksidanlar insanlar tarafından uzun süredir tüketilen veya gıdalara eklenen katkı maddeleri olduğu için tüketiciler tarafından daha güvenilir olduğu düşünülmektedir (Turhan ve Üstün, 2006; Baladura ve Şimşek, 2013). Doğal antioksidanlar bitki ve hayvan dokularının ekstraksiyonu ya da gıdaların işlenmesi sırasında açığa çıkan bileşenlerdir (Ağbaş ve ark., 2013). Doğal antioksidanların çoğu antibakterial, antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik, antitrombotik, antimutajenik, antikarsinojenik ve antiaging gibi geniş bir biyolojik etki alanı göstermektedir (Arkan, 2011).

Son yıllarda, gıdalardaki antioksidanları belirlemeye yönelik yapılan araştırmalar artmıştır (Albayrak ve ark., 2010). Hallaç Türk ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada kırmızı üzüm suyu ve sirkenin antiradikal kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarını araştırmışlardır. Çalışmada örneklerin toplam fenolik madde miktarını tayin etmek için spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu metodunu, antiradikal kapasiteyi tayin etmek için DPPH metodu kullanmışlardır. Çalışma sonucunda kırmızı üzüm suyunun sirkeye göre antiradikal kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı ve demir bağlama yeteneğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Ertürk ve ark. (2014) Doğu Karadeniz bölgesinden elde edilen balların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Antioksidan aktivite tayini için demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) testi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme aktivitesi testi ve bakır indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) testi; antimikrobiyal aktivite tayini için disk difüzyon metodunu kullanmışlardır. Çalışmada incelenen bal örneklerinin önemli derecede antioksidan ve çoğu mikroorganizmaya karşı orta derecede antimikrobiyal etkisi olduğu saptanmıştır.

Yeşil çay yaprakları çay polifenollerini, kafein, saponinler, taninler ve amino asitleri içermektedir. Çay polifenolleri kateşinler, flavanollar, flavonlar, fenolik asitler ve glikozitlerdir. Su, aseton, etanol ve metanol gibi çözücüler kullanılarak yeşil çay yapraklarından izole edilmektedir. Çözünen polifenollerin doğal bir antioksidan olduğu ve serbest oksijen radikallerini temizleme etkisi bilinmektedir (Pan ve ark., 2003).

### **2.6.1. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri**

Serbest radikallerin, biyolojik sistemler üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır (Topal, 2013). Serbest radikallerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi hücreler için önemli olan bileşiklere etki etmesi sonucunda hücrelerde hasar oluşmaktadır (Aydın, 2011; Dasgupta ve Klein, 2014).

#### **Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri**

Serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküller lipidlerdir (Aydın, 2011). Lipidler ortamda bulunan radikal başlatıcı ya da oksijenle reaksiyona girerek oksidasyona uğramaktadır (Topal, 2013). Serbest radikaller, lipid hücre membranlarında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır (Aydın, 2011). Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, bir başka deyişle hücrede bulunan zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (Yarsan, 1998; Aydın, 2011; Dasgupta ve Klein, 2014). Lipid peroksidasyonu oldukça zararlı ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlemektedir. Lipid peroksidasyonu, doğrudan membran yapısına ve dolaylı olarak oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine zarar vermektedir. ROS'ların hücreye verdiği hasarın en önemli özelliği, hücre membranlarında lipid peroksit radikalleri ( $LOO^{\bullet}$ ) ve lipid serbest radikallerinin ( $L^{\bullet}$ ) oluşmasıdır (Aydın, 2011). Oluşan lipid peroksitlerin içerdiği kimyasal maddeler hücrelerde hasara neden olmakta ve dokulara giden kan akımını azaltmaktadır (Topal, 2013).

Lipid peroksidasyon olayı üç aşamalı olarak meydana gelmektedir (Yarsan, 1998). Birinci aşamada, oksijen köklerinin çok zincirli doymamış yağ asitlerinin yapısına katılması ya da molekülden çıkması sonucunda lipid gruplarının oluşmasıdır (Yarsan, 1998; Dasgupta ve Klein, 2014). İkinci aşamada, oluşan dayanıksız lipid radikalleri moleküler oksijenle ( $O_2$ ) etkileşerek lipid peroksit radikalleri şeklinde değişmektedir (Yarsan, 1998; Aydın, 2011). Oluşan lipid peroksit radikallerinin diğer doymamış yağ asitleriyle etkileşime girmesi sonucunda yeni lipid radikalleri oluşmaktadır. Lipid peroksit radikalleri bu etkileşim sırasında açığa çıkan hidrojen atomunu kullanarak lipid peroksitlerine ( $LOOH$ ) dönüşmektedir (Aydın, 2011). Tepkimeye diğer yağ asitleri girerek yeni lipid gruplarını oluşturmakta ve bu olay kendi kendini katalizleyerek zincir

tepkime şeklinde sürmektedir (Yarsan,1998; Aydın, 2011). Üçüncü aşama yıkımlanma aşamasıdır ve iki şekilde meydana gelmektedir. Oluşan gruplar ya birbirleri ile tepkimeye girerek etkisiz hale gelirler ya da antioksidanlarla tepkimeye girerek tepkimeyi sonlandırırlar (Yarsan,1998).

### **Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Serbest radikallerin proteinleri etkileme derecesi aminoasit kompozisyonuna göre değişmektedir (Aydın, 2011). Yapısında doymamış bağ ve kükürt bulunan triptofan, fenilalanin, histidin ve metiyonin gibi aminoasitler ve bu aminoasitlerden oluşan proteinler, serbest radikallerden daha kolay etkilenmektedir (Yarsan, 1998; Aydın, 2011; Topal, 2013). Karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri bu etki sonucunda ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin etkisiyle, immünoglobülin G (Ig G) ve albümin gibi yapılarında çok sayıda disülfid bağı bulunan proteinlerin tersiyer yapıları bozularak işlev göremez hale gelmektedir. Serbest radikaller hemoglobin gibi HEM proteinlerine de etki ederek zarar vermektedir. Süperoksit radikali veya hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) oksihemoglobinle reaksiyona girmesi sonucunda methemoglobin oluşmaktadır (Aydın, 2011).

### **Serbest Radikallerin DNA ve Nükleik Asitlere Etkisi**

İyonize edici radyasyonla meydana gelen serbest radikaller DNA'ya etki ederek iplikçik kopmasına bağlı mutasyon oluşumu, DNA'daki genetik kodları değiştirerek hücrelerin ölümü ve buna bağlı erken yaşlanmaya neden olmaktadır hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Yarsan, 1998; Arkan, 2011; Aydın, 2011; Topal, 2013; Dasgupta ve Klein, 2014). Ayrıca genetik kodların değişmesine bağlı olarak kanser gibi hastalıklara neden olan hücre grupları oluşabilmektedir (Arkan, 2011). Deoksiriboz ve bazlar hidroksil radikali ile reaksiyona girerek değişikliğe uğramaktadır. Nötrofillerin aktive olmasıyla ortaya çıkan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA'nın hasarına neden olmaktadır (Aydın, 2011).

### **Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi**

Serbest radikallerin etkisiyle monosakkarit otooksidasyonu ve polisakkarit depolimerizasyonu oluşmaktadır. Diyabet ve sigara kullanımı ile ilgili patolojik olaylarda, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan süperoksitler ve

okzaldehitler rol oynamaktadır. Ayrıca okzaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstermektedir (Aydın, 2011). Hiyaluronik asit bağ dokunun dayanıklılığını sağlamada görev almaktadır. Özellikle süperoksit grubundaki radikaller hiyaluronik asit üzerinde etki göstererek bağ doku bozulmalarına ve bağ doku sıvısının akışkanlığının kaybolmasına neden olmaktadır (Yarsan, 1998).

### **2.6.2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları**

Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini aşağıdaki yollarla gösterirler:

1. Süpürücü/temizleyici (Scavenging) etki: Serbest radikallerin oluşmasını önleyerek ve oluşmuş olan radikallerin daha az zararsız hale getirilmesini sağlayarak etki göstermektedir. (Arkan, 2011; Metin, 2012).
2. Bastırıcı/ Giderici/Söndürücü (Queching) etki: Oksidanlarla etkileşime girerek, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen molekülü aktararak aktivitelerini azaltarak ya da inaktif hale getirerek etki göstermektedir (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Arkan, 2011; Metin, 2012). Vitaminler ve flavanoidler bastırıcı etki gösteren antioksidanlardır (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).
3. Zincir kırıcı (Chain breaking) etki: Serbest radikallerin oluşmasına neden olan zincirleme reaksiyonların belirli yerlerinden kırılmasını sağlamaktadır. Bu sayede kimyasal reaksiyonları ve oksidan etkiyi durdurmaktadır (Dündar ve Aslan, 1999; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Metin, 2012; Dasgupta ve Klein, 2014). Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki göstermektedir (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).
4. Onarıcı (Repair) etki: Serbest radikallerin; lipid, protein ve DNA gibi yapılarda oluşturduğu biyolojik moleküler hasarı düzelterek zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır (Dündar ve Aslan, 1999; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Arkan, 2011). Bu grupta DNA'daki oluşan hasarı tamir eden enzimler sayılabilir (Metin, 2012).
5. Hücrel kinaz kayıplarını önleme etkisi: Hücrel kinaz kayıplarını önleyerek oksidasyon reaksiyonlarını durdurmaktadır (Dündar ve Aslan, 1999; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).
6. Enzimatik etki: Enzimatik (Süperoksit dismutaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidan sentezini arttırarak etki göstermektedir (Dündar ve Aslan, 1999; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).

### **2.6.3. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılmalarına rağmen genellikle endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki başlık altında toplanabilmektedir (Kurt, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Aydın, 2011).

Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde iki gruba ayrılmaktadır (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009). Enzimatik olan antioksidanlar, bazı düşük molekül ağırlıklı olanlar ve enzimatik kofaktörler gibi enzimleri içermektedir (Okan ve ark., 2013). Enzimatik olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Glutasyon redüktaz, Hidroperoksidaz (Kurt, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Aydın, 2011; Almeida ve ark., 2016). Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Laktoferrin, Glutasyon, Sistein, Ürik asit, Glikoz, Albümin, Bilirubin, Metiyonin (Kurt, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Almeida ve ark., 2016).

Eksojen kaynaklı antioksidanlar, vitaminler ve ilaç antioksidanları olarak iki gruba ayrılmaktadır (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009). Vitamin eksojen antioksidanlar şunlardır: Vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol), B-karoten, Vitamin C (askorbikasit), Koenzim Q (ubikinon), Folik asit (Kurt, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Aydın, 2011). İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır: Ksantin oksidaz inhibitörleri (Allopurinol, oksipurinol, pterin aldehit, tungsten), Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antienflamatuarlar, Trolox-C, Ebselen, asetilsistein, Mannitol, Desferroksamin, Demir şelatörleri (Kurt, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009).

### **2.7. Antioksidan Özelliklerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

Günümüze kadar antioksidan kapasiteyi ölçmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferi (ET) reaksiyonlarına dayanan yöntemler olarak iki grupta incelenebilir (Albayrak ve ark., 2010; Metin, 2012; Shahidi ve Zhong, 2015). HAT ve ET temelli yöntemler örnekteki koruyucu antioksidan kapasitesini değil, örneğin radikal süpürücü kapasitesini ölçmeye yöneliktir (Metin, 2012; Dasgupta ve Klein, 2014).

### **2.7.1. Hidrojen Atomu Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayanan Yöntemler**

HAT temeline dayanan yöntemlerde antioksidan ve substratın, peroksil radikali için girdiği rekabete bağlı ortaya çıkan yarışmacı reaksiyonlar izlenmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Metin, 2012). Oksijen radikal absorbands kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemleri HAT temelli yöntemler olarak bilinmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Dasgupta ve Klein, 2014).

#### **2.7.1.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi**

ORAC yöntemi ilk olarak Cao, Alessio, ve Cutler tarafından geliştirilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Bu yöntem, 37°C'de bulunan 2,2-azobis (2-aminopropan) diklorit'in (AAPH) uyarılarak peroksi radikallerine karşı antioksidan temizleme fonksiyonunun ölçümü esasına dayanmaktadır (Okan ve ark., 2013). Maddelerin toplam antioksidan güçleri kimyasal biyomarkırlar kullanılarak *in vivo* veya *in vitro* olarak ölçülmektedir (Albayrak ve ark., 2010). Fitokimyasalların ve farklı ekstraktların antioksidan aktivitesini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Peroksil radikalinden kaynaklanan oksidasyonun antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alan bu yöntem plazma ve doku örneklerinde bulunan doğal antioksidanların etkinliğini ölçmek için kullanılmaktadır. Hem lipofilik hemde hidrofilik ekstrelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Shahidi ve Zhong, 2015).

İlk kullanılmaya başlandığında ışımaya probu olarak  $\beta$ -fikoeritrin ve peroksil radikal üreticisi olarak AAPH ile çalışılmıştır (Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013; Shahidi ve Zhong, 2015). Ancak kullanılan probun fenolik maddelerle etkileşime girmesi ve fotostabil olmaması nedeniyle  $\beta$ -fikoeritrin yerine protein olmayan sentetik bir prob fluoresein kullanılmıştır (Aydın, 2011). ORAC analizinde AAPH peroksi radikal üreticisi veya  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  hidroksi radikal üreticisi olarak kullanılmaktadır (Okan ve ark., 2013). Peroksil radikalleri, AAPH gibi azo-bileşiklerin sıcaklıkla bozulması sonucunda oluşmaktadır (Albayrak ve ark., 2010). Bu yöntemde ışımaya (floresan) probu olan fluoresein AAPH tarafından azaltılmakta (Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013) ve ışımadaki azalma fluoresein'in bozulma derecesi hakkında bilgi vermektedir (Okan ve ark., 2013). Reaksiyon ilerledikçe ortamdaki fluoresein tükenmektedir. Ortamda

antioksidan varlığında AAPH radikalleri giderilerek floresan azalması engellenmektedir (Aydın, 2011).

ORAC yönteminin FRAP yöntemine göre daha duyarlı ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu belirtilmektedir. FRAP ve ORAC yöntemi dondurularak kurutulan 927 adet sebze örneği için denenmiş ve aralarında uyum olmadığı, ama yaban mersini meyvesi için bu yöntemlerin uyum gösterdiği saptanmıştır. Farklı laboratuvarlarda; çay, meyve, sebze ve hayvan dokuları gibi biyolojik örnekler ile melatonin, dopamin ve flavonoid gibi saf bileşikler üzerinde uygulanan ORAC yöntemi örneklerin antioksidan kapasitelerine yönelik önemli bilgiler sağlamıştır (Albayrak ve ark., 2010).

### **2.7.1.2. Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre (TRAP) Yöntemi**

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi 1985 yılında ilk defa Wayner ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve sonraki yıllarda Ghiselli ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Son yıllarda serum ve plazmadaki antioksidan kapasitesini ölçmede sık olarak kullanılmaktadır (Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Bu yöntemin temeli sıcaklıkla bir azo bileşiğin bozunması sağlanarak, oluşan kontrollü lipid peroksidasyonu süresince tüketilen oksijenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010).

TRAP yönteminde 2,2'-azobis (2-aminopropan) diklorit (AAPH) kullanılarak peroksi radikali üretilmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). AAPH plazmaya eklendikten sonra okside olabilen materyalin oksidasyonu, reaksiyon boyunca tükenen oksijen miktarının ölçülmesi ile izlenmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Plazmada bulunan antioksidanlar oksidasyon reaksiyonunu yavaşlatmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Floresan probu olarak R-fikoeritrin (R-PE) kullanılmaktadır ve antioksidanın R-PE'yi AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinden koruma özelliği ölçülmektedir (Okan ve ark., 2013). Sonuçlar Troloks C (6- hidroksil-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)'nin sonuçları ile karşılaştırılmakta ve plazmadaki antioksidant kapasiteyle miktar olarak ilişkilendirilmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013).

TRAP yöntemi tüm bilinen zincir kırıcı antioksidanlara karşı hassastır. Lipid peroksidasyonunun başlatılması ve suda çözünebilir peroksil radikallerinin üretimi ile ilgilidir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, reaksiyon için gereken süre boyunca



oksijen elektrodunun uç noktalarının stabilizasyonunun sağlanamamasıdır. Ayrıca kompleks bir yöntem olup tecrübe gerektirmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013).

### **2.7.1.3. Krosin Beyazlatma Yöntemi**

Kolorometrik bir yöntem olan krosin beyazlatma yöntemi ilk olarak Lussignoli ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Hem tekli bileşenleri hemde kompleks yapıları analiz etmek için kullanılabilir. Ayrıca farklı çözücüler kullanarak lipofilik ve hidrofilik bileşenlere uygulanabilmektedir (Okan ve ark., 2013).

Bu yöntemde, sıcaklıkla azo başlatıcısının bozulması sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır (Albayrak ve ark., 2010). Antioksidan aktivite, serbest radikallerin bir karotenoid olan krosini beyazlatma derecesi ölçülerek saptanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011). Deneysel olarak, krosin içeren fosfat tamponu ve antioksidan ile reaksiyon gerçekleştirilir. Ortama AAPH eklenmesi reaksiyonu başlatır ve 443 nm dalga boyunda krosinin beyazlama derecesi spektrofotometre ile gözlenmektedir. AAPH ilavesinden sonraki 10 dakika beyazlama oranı takip edilmektedir. Beyazlatmayı karışıma eklenen antioksidanlar önlemektedir (Albayrak ve ark., 2010). Trolox C kullanılarak antioksidan kapasite göreceli olarak hesaplanmaktadır (Okan ve ark., 2013).

Krosin safrandan elde edilen, doğal karotenoid türevidir ve pigment karışımı olduğu için çok fazla çeşitliliğe sahiptir. Diğer gıda pigmentleride karotenoidler gibi aynı dalga boyunda ışık absorblamaktadır. Bu durum krosinin endüstriyel uygulamasını sınırlamaktadır (Aydın, 2011). Gıda örnekleri için uygulanması sınırlı olan bu yöntem antioksidanların değişen konsantrasyonlarına duyarlı değildir (Albayrak ve ark., 2010).

### **2.7.2. Elektron Transferi (ET) Reaksiyonlarına Dayanan Yöntemler**

ET temelli yöntemlerde renk değişimi antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini göstermektedir (Albayrak ve ark., 2010; Metin, 2012). Toplam Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik yöntemi (FCR), troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidant olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

yöntemi ET temelli yöntemler olarak bilinmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Dasgupta ve Klein, 2014).

### **2.7.2.1. Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi**

Bu yöntem, 1999 yılında Singleton ve arkadaşları tarafından şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için geliştirilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Metin, 2012; Okan ve ark., 2013). Başlangıçta Folin- Ciocalteu ayırıcı ile proteinlerde fenol grubu içeren tirozin kalıntısı etkileşimi nedeniyle protein analizi için düşünülmüştür (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011). Ancak günümüzde toplam fenolik yöntem olarak bilinmesine rağmen, gerçekte örneğin toplam indirgeyici kapasitesini ölçmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Metin, 2012). Bu yöntem, su yada diğer organik çözücüler içinde çözülmüş fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (Arkan, 2011).

FCR yönteminde, molibdenyum'a fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden elektron transfer edilmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Molibdenyumun, fenolik antioksidanların varlığında indirgenmesiyle renk sarıdan maviye dönmektedir (Aydın, 2011). 750-765 nm dalga boyunda mavi renkli kompleks oluşumu spektrofotometrik olarak belirlenmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Folin reaktifi aracılığıyla oluşan renk değişimine göre absorbans ölçülmektedir. Analiz sonuçları gallik asit ya da kateşin gibi standart bir fenolik maddeye eşdeğer olarak verilmektedir (Arkan, 2011). Yapılan bazı çalışmalarda gallik asit yerine tannik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferrulik asit de kullanılmaktadır (Okan ve ark., 2013).

Folin-Ciocalteu ayırıcı ticari olarak satılmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Gıdaların ve bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin tayininde basit, tekrarlanabilen, güvenilir ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Ayrıca ilaç analizlerinde, idrar gibi biyolojik örneklerde, gıda ürünlerindeki fenolik bileşik düzeyi veya total indirgeme kapasitesi ölçümleri için bu reaktifin genişletilmiş veya değiştirilmiş uygulamaları bulunmaktadır (Metin, 2012). Bu yöntemin dezavantajları analiz süresinin uzun olması nedeniyle rutin uygulanmasının zor olması, sulu fazda gerçekleştiği için lipofilik bileşiklerde uygulanamaması ve FCR'nin fenol bileşiklerle sadece bazik koşullarda reaksiyona

girmesi olarak belirtilmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). FCR fenolik bileşiklere spesifik bir yöntem değildir (Arkan, 2011; Aydın, 2011). Yöntem gıdaların yapısında bulunan proteinleri de ekstrakte ettiği için bütün fenol gruplarını ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca fenolik olmayan Cu<sup>+</sup>, C vitamini gibi bileşikler tarafından da indirgenebilmektedir. Bu nedenle toplam fenolik içeriği tam olarak yansıtmadığı belirtilmektedir (Arkan, 2011; Aydın, 2011).

### **2.7.2.2. Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC)Yöntemi**

İlk kez 1993 yılında Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve daha sonra Re ve arkadaşları tarafından değiştirilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Gıdaların antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Albayrak ve ark., 2010). TEAC yöntemi; antioksidanlar tarafından, ABTS (2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat)) radikal katyonunun absorbansının engellenmesi esasına dayanmaktadır. TEAC maksimum absorbansını 660, 734 ve 820 nm dalga boyunda yapmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013).

Orijinal yöntemde, hidrojen peroksit ile metmiyoglobinin oluşturduğu ferrilmiyoglobin, ABTS ile etkileşime girerek ABTS'nin katyonik radikalini üretmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010; Aydın, 2011). Oluşan ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren örnek eklenmektedir. Radikalin indirgenmesi sonucunda ABTS<sup>•+</sup> radikali mavi/yeşil renk oluşturmaktadır (Oğraşıcı, 2010). Antioksidanın, meydana gelen katyonik radikali giderme kapasitesi 734 nm dalga boyunda absorbansın azalması ile takip edilmektedir (Aydın, 2011). Reaksiyon sonucunda harcanan ABTS<sup>•+</sup> miktarı, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Troloks C (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman- 2-karboksilik asit) standardı kullanılarak hesaplanmakta ve TEAC değeri olarak belirlenmektedir (Oğraşıcı, 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013).

TEAC yöntemini uygulaması kolay olduğu için antioksidan kapasite ölçümünde sık olarak kullanılmış, çok sayıda gıda örneği ve bileşenin TEAC değeri kaydedilmiştir (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010). Uygulama kolaylığı yanında hem sulu hem lipit fazlarda kullanılması avantaj sağlamaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010; Okan ve ark., 2013). Ayrıca TEAC yöntem kitleri daha hızlı ve ticari olarak elde edilebilmektedir (Albayrak ve ark., 2010). TEAC ucuz, pH değişimlerinde stabil ve

hızlı reaksiyon veren bir yöntemdir (Oğraşıcı, 2010). TEAC yöntemi geniş bir pH aralığında kullanılabilirdiği için pH'nin antioksidan mekanizması üzerine etkisinin çalışılmasına olanak sağlamaktadır (Albayrak ve ark., 2010). Biyolojik sistemlerde sentetik ABTS radikalinin bulunmaması ve bu sistemlerdeki radikallere benzememesi problem oluşturmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011).

### **2.7.2.3. Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi**

FRAP yöntemi Benzei ve Strain tarafından geliştirilmiştir. Antioksidanların toplam miktarı demir (III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla tayin edilmektedir (Okan ve ark., 2013). FRAP ve TEAC yöntemleri bir birine benzemektedir. Aralarındaki fark, FRAP asidik koşullarda (pH = 3.6) TEAC ise nötr pH'da gerçekleşmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

Asidik koşullarda, ferrictripirydyltriazine kompleksi ortamda antioksidan varsa  $Fe^{+2}$ 'ye indirgenmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Bu indirgenme sonucunda oluşan koyu mavi renkli çözelti 595-593 nm dalga boyunda absorban artışına neden olmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). 593 nm de oluşan kompleksin absorbanı ölçülmektedir (Aydın, 2011). Sonuçlar troloks standardı kullanılarak hesaplanmakta ve FRAP değeri olarak belirlenmektedir. Orijinal yöntemde, absorban izlem süresi 4 dakika iken, bu sürede reaksiyon tamamlanamadığı için izlem süresinin 30 dakikaya uzatılması önerilmektedir. Özellikle bazı polifenollerin hareketinin yavaş olması nedeniyle daha uzun reaksiyon süresi gerekmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013).

Yöntem sadece demir iyonunu temel aldığı için mekanik ve fizyolojik olarak antioksidan aktivite tayini için uygun değildir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Bu yöntem içeriğinde okside olma özelliği olan bir substrat olmadığı için antioksidanların koruyucu özellikleri ile ilgili bilgi sağlamamaktadır (Aydın, 2011). Diğer yöntemlerden avantajı, özel alet gerektirmeyen basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olmasıdır (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013).

#### **2.7.2.4. Oksidan Olarak Cu (II) Kullanılan Toplam Antioksidan Kapasite**

##### **Yöntemi (CUPRAC)**

CUPRAC yöntemi Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Okan ve ark., 2013). Yöntem, Cu (II)'nin, örnekte bulunan antioksidanlar tarafından Cu (I)'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010).

2,9-dimetil-1, 10-fenantrolin (Neokuproin Nc)'in Cu (II) ile tepkimeye girmesi sonucunda bakır (II)-neokuproin kompleksi (Cu(II)-Nc) oluşmaktadır (Okan ve ark., 2013). Gıda maddelerinde çok bulunan sitrat ve glikoz gibi bileşenlerle Cu(II)-neokuproin reaktifi reaksiyon vermemektedir. Sadece antioksidanları yükseltgemekte ve Cu(I)-neokuproin bu reaksiyon sonucunda oluşmaktadır (Arkan, 2011). Antioksidan kapasite, reaksiyon ürünü olan bakır (I)-neokuproin'in 450 nm de absorbans ölçümleri okunarak saptanmaktadır (Arkan, 2011; Okan ve ark., 2013). Kersetin standart olarak kullanılmaktadır. CUPRAC analizi askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kersetin için birkaç dakikada tamamlanırken, daha kompleks yapılı moleküller için 30-60 dakika sürebilmektedir (Albayrak ve ark., 2010).

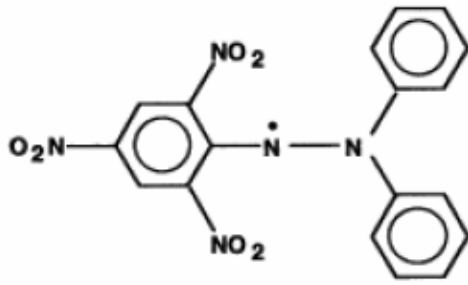
CUPRAC yöntemi pH=7 ortamında yürütülmektedir. Bu pH değeri fizyolojik pH'lara yakın olduğu için fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı bulunmaktadır. Bu yöntemde pH kolay ayarlanabilir, maliyeti düşüktür ve uygun çözücüler kullanılarak hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir (Arkan, 2011; Okan ve ark., 2013). Diğer avantajları, çok fazla uzmanlık gerektirmemesi ve analiz için kullanılan ayraçların ucuz olmasıdır. Ayrıca bakır demirden daha hızlı bir reaksiyon kinetiğine sahiptir (Albayrak ve ark., 2010).

#### **2.7.2.5. 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi**

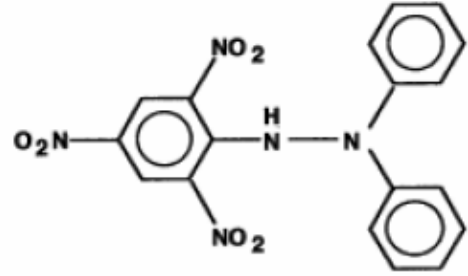
Antioksidan molekül tayininde DPPH radikalinin kullanılabilmesi önerisi ilk kez Blois tarafından ifade edilmiştir (Milardovic ve ark., 2006; Metin, 2012). 1995 yılında Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, sonrasında 1998 yılında Sanchez ve arkadaşları tarafından değiştirilerek kullanılmaya başlanmıştır (Milardovic ve ark., 2006; Metin, 2012; Okan ve ark., 2013). Araştırmacılar, bitki ve gıdalardan elde edilen ekstraktların ya da bileşiklerin serbest radikal söndürücü aktivitesini tayin etmek için bu yöntemi yaygın olarak kullanmaktadır (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010; Okan ve ark., 2013). Yöntem antioksidan maddelerin, organik azot radikali olan DPPH (2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerinin ölçümü esasına dayanmaktadır (Metin, 2012).

DPPH stabil bir organik nitrojen radikalidir ve ticari olarak elde edilebilmektedir (Şekil 2.4) (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Okan ve ark., 2013). Etonoldeki çözeltisi mor renklidir ve maksimum absorbanısı 515 nm dalga boyunda vermektedir (Albayrak ve ark., 2010; Aydın, 2011; Metin, 2012). Molekülde bulunan bir serbest elektronun yer değiştirmesi ile menekşe rengi oluşmaktadır (Albayrak ve ark., 2010). DPPH radikali antioksidanla karşılaştığında koyu menekşe olan renk sarıya dönmekte ve indirgenerek hidrozine dönüşmektedir (Albayrak ve ark., 2010; Oğraşıcı, 2010; Metin, 2012). Antioksidan madde tarafından indirgenince renk solduğu için tepkime spektrofotometre ile 515-517 nm' de absorbanı değeri izlenmektedir. Antioksidan konsantrasyonu ile DPPH'nin renginin solması orantılıdır. Çözeltinin rengi indirgenme reaksiyonu süresince açılmaya devam etmektedir (Oğraşıcı, 2010; Arkan, 2011; Aydın, 2011). Antiradikal etkinlik, DPPH'nin başlangıç konsantrasyonunu %50 azaltmak için gereken antioksidan miktarını ifade eder ve EC<sub>50</sub> (mg/mL) olarak adlandırılır (Milardovic ve ark., 2006; Kelebek ve Canbaş, 2010; Aydın, 2011). Düşük EC<sub>50</sub> değeri yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir (Kelebek ve Canbaş, 2010).



1: Difenilpikrilhidrazil (serbest radikal)



2: Difenilpikrilhidrazin (radikal değil)

**Şekil 2. 4** 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı (Albayrak ve ark., 2010)

Bu metot basit, hızlı ve birçok örneğin farklı çözünürlükteki radikal süpürme aktivitesinin tayini için elverişlidir (Albayrak ve ark., 2010; Okan ve ark., 2013). Kolay ve geçerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Arkan, 2011; Metin, 2012). Yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. DPPH peroksil radikallerine benzerlik göstermediği için, peroksil radikalleri ile kolayca reaksiyon veren birçok antioksidan DPPH ile yavaş hatta hiç reaksiyon vermeyebilir (Albayrak ve ark., 2010). Fizyolojik şartlarda reaktif oksijen ve azot türlerinin süpürülme yeteneğini birebir yansıtmamaktadır (Arkan, 2011).

Aynı zamanda ışık, oksijen, karışımın pH değeri ve kirliliğe olan hassasiyeti yöntemde sınırlamalara neden olmaktadır (Sharma ve Bhat, 2009; Okan ve ark., 2013).

## **2.8. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri**

### ***Alkanna orientalis* (Tosbağa Otu)**

*Boraginaceae* ailesinde yer almaktadır. Güney Yunanistan, Suriye, Lübnan, Filistin, Transkafkasya ve Kuzey İran'da dağılım göstermektedir. Ülkemizde Kuzeybatı, Güneybatı ve Anadolu'nun karasal kesimlerinde görülmektedir. Kayalık yerler, bozkır ve volkanik yamaçlarda yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil Ek A.1) (Bakış ve ark, 2011). Bitkinin kurutulan yaprakları idrar yolu enfeksiyonlarını önlemek için çay olarak ya da havanda dövülerek yara iyileşmesi için yara üzerine sürülmektedir. Ayrıca kök kısımları temizlenip kaynatılarak mide rahatsızlıklarını önlemek için içilmektedir (Kurnaz Karagöz ve Serteser, 2014). Aynı zamanda köklerinden elde edilen çay adet kesici olarak kullanılmaktadır (Tuttu, 2014). Yapılan bir çalışmada *A. orientalis*'in kökleri etanolle ekstre edilerek fare ve ratların patilerindeki ödem üzerinde antienflamatuar ve antinosiseptif etkisi araştırılmıştır. Antinosiseptif etkiye sahip olduğunu belirtilmiştir (Yaman ve Coşge Şenkal, 2014). Soğuk algınlığı, faranjit, romatizma ve diş ağrısı tedavisinde de kullanılmaktadır (Mothana ve ark, 2010).

### ***Anchusa officinalis* (Sığır Dili)**

*Boraginaceae* ailesinde yer almaktadır. Güney ve Orta Avrupa'da dağılım göstermektedir. Ülkemizde Kuzeybatı ve Güney Anadolu'da görülmektedir. Pinus brutia ormanı ve tarlalarda yetişen çok yıllık bitkilerdir (Şekil Ek A.2) (Bakış ve ark, 2011). Rosmarinik asit ihtiva etmektedir (Al-Sereitia ve ark, 1999). Rosmarinik asit *Boraginaceae* ve *Lamiaceae* ailesinde yaygın olarak bulunan önemli bir fenolik bileşiktir. Antiviral, antibakteriyel, anti-inflamatuar ve antioksidan aktivitesi bulunmaktadır (Park ve ark, 2008).

### ***Cruciata taurica***

*Rubiaceae* ailesinde yer almaktadır. Doğu Yunanistan, Kırım ve Güney Batı Asya'da dağılım göstermektedir. Bu türlerin kökeni ve çeşitlilik merkezi İran-Turan bölgesidir (De Rosa ve ark., 2003). Kuru kayalıklar, taşlı yerler, kıraç meralar ve steplerde

yetiştirilmektedir (Mart, 2006; Kırat, 2009). Bir veya çok yıllık, sarımsı-yeşil renkli ve sarı çiçekleri bulunmaktadır (Şekil Ek A.3) (Kırat, 2009). Tohum ve yaprakları ezilerek elde edilen su maya olarak kullanılmaktadır (Mart, 2006).

### ***Delphinium peregrinum* (Hezaren Saray Çiçeği)**

*Ranunculaceae* ailesinde yer almaktadır. Ülkemizde Trakya, Batı, Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde dağılım göstermektedir. Kalker yamaçlar, ekili tarlalar ve bağlarda yetişmektedir. Tek yıllık ve otsu bir bitkidir (Bakış ve ark, 2011). Koyu mor çiçekleri ile karakterizedir (Şekil Ek A.4). Memeliler için toksik olduğu bilinmektedir. İçeriğinde 40'ın üzerinde alkaloid bulundurmaktadır. Yapılan bir olgu bildiriminde 13 yaşında bayan hastanın baş ağrısı, boyun sertliği, yüksek ateş (38°C) ve solunum yetersizliği (8 /dakika) ile acil servise başvurduğu bildirilmektedir. Hastanın ebeveynlerinin detaylı sorgulamasında migren tedavisi için yaklaşık olarak 30 mg bir bitki tükettiği ve bu bitki türünün *Delphinium peregrinum* olduğu saptanmıştır. Literatürde bu bitki sınıfının toksisite belirtileri; nöromusküler felç, kas yorgunluğu ve solunum depresyonu olarak belirtilmektedir (Rachid ve ark., 2011).

### ***Euphorbia macroclada* (Sütleğen)**

*Euphorbiaceae* ailesinde yer almaktadır. Batı Suriye, Kuzey Irak, Ermenistan, Kuzeybatı, Batı ve Orta İran bölgelerinde dağılım göstermektedir. Ülkemizde Güney Anadolu'nun karasal bölgelerinde görülmektedir. Kayalık yamaçlar, meşe ve çam ormanlarında yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil Ek A.5) (Bakış ve ark, 2011). Egzema, mantar enfeksiyonları, arı ve akrep ısırıklarında kullanıldığı belirtilmektedir (Tuzlacı ve Doğan, 2010). Karaman ilinde hemoroid tedavisi için kullanılmaktadır (Gürhan ve Ezer, 2004). Sütü siğillere karşı haricen sürülmekte ve kuvvetli müshil etkisi bulunmaktadır (Tuttu, 2014). *Euphorbia* türlerinin kanser, lösemi ve astım tedavisinde de kullanıldığı; bazı türlerinin sitotoksik, antiviral, antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sahip olduğu belirtilmektedir (Sadeghi-Aliabadi ve ark., 2009).

### ***Moltkia coerulea* (Anadolu Taşkesen Otu)**

*Boraginaceae* ailesinde yer almaktadır. Türkiye, Kuzeybatı ve Batı İran bölgesinde dağılım göstermektedir. Ülkemizde Anadolu'nun karasal iklim olan bölgelerinde görülmektedir. Taşlı bozkırlar, tarlalar ve tarla kenarlarında yetişen çok yıllık otsu bir



bitkidir (Şekil Ek A.6) (Bakış ve ark, 2011). *Moltkia coerulea* flavonoid ve fenollerini içermektedir. Bu maddelerin antioksidan kapasiteyi arttıran güçlü antioksidanlar olduğu bilinmektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda yara iyileşme sürecinde inflamasyonu önlediği belirtilmektedir (Frahpour ve ark., 2015).

#### ***Myosotis ramosissima* (Unutma Beni Çiçeği)**

*Boraginaceae* ailesinde yer almaktadır. Endemik bir bitki türüdür ve ülkemizde Güney Anadolu (İçel) bölgesinde dağılım göstermektedir. Tek yıllık ve otsu bir bitkidir (Şekil Ek A.7) (Bakış ve ark, 2011).

#### ***Ranunculus argyraeus* (Düğün Çiçeği)**

*Ranunculaceae* ailesinde yer almaktadır. Kuzey Irak bölgesinde dağılım göstermektedir. Ülkemizde Batı, Orta, Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görülmektedir. Çıplak çalılık ve taşlık alanlarda yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil Ek A.8) (Bakış ve ark, 2011). *Ranunculus* türleri ülkemizde “basurotu, düğün çiçeği, katır nalı, yağ çanağı” gibi isimlerle bilinmektedir. Halk arasında bu genusa ait bitkiler genel olarak; cilt hastalıklarının tedavisi, haricen hemoroid tedavisi, yara iyileşmesi, antiromatizmal, tüberküloz tedavisi, ödem, abse ve kabızlığa karşı kullanılmaktadır. *Ranunculus* türleri flavonoidler, saponinler, alkoloitler, yağ asitleri ve organik asit gibi fitokimyasalları içermektedir. *Ranunculus* türlerinin antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri olduğu belirtilmektedir (Fafal Erdoğan, 2013).

#### ***Veronica multifida* (Mine Çiçeği)**

*Scrophulariaceae* ailesinde yer almaktadır. Doğu Bulgaristan ve Kafkasya bölgelerinde dağılım göstermektedir. Seyrek ormanlar, çalılıklar, kayalık yamaçlar, bozkırlar, otlaklar ve nadas tarlalarda yetişen çok yıllık odunsu otlardır (Şekil Ek A.9) (Bakış ve ark, 2011).

#### ***Vicia canescens* ssp. *gregaria* (Fiğ)**

*Fabaceae* ailesinde yer almaktadır. Kuzey Irak'ta dağılım göstermektedir. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu'da görülmektedir. Kayalık yamaçlarda yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil Ek A.10) (Bakış ve ark, 2011)

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada; Termal marka Soxhlet Ekstraktörü, IKA HB 10 marka Rotary Evaporatör, Nüve marka otoklav ve etüv, Thermo MultiScanGO marka mikroplaka spektrofotometresi, mikro pipetler kullanıldı.

Deneylerde AppliChem marka DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Merck marka Gallik asit, Merck marka Folin reaktifi, Merck marka Sodyum karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Merck marka Sodyum klorür (NaCl), Merck marka Etanol, Merck marka Hekzan ve Sigma-Aldrich marka Metanol kullanıldı.

Mikroorganizmaların üretilmesi, antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için Mueller Hinton Agar (Fluka marka) ve Mueller Hinton Broth (Merck marka) besiyerleri kullanıldı. Besiyeri içerikleri distile suda çözülerek, pH ayarlamaları yapıldıktan sonra, otoklavda 1,1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika süre ile steril edildi. Çalışmada kullanılan besiyerleri Merck ve Fluka firmalarından temin edildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Bitkiler

Bu çalışmada, *Rubiaceae* Familyasına ait *Cruciata taurica*, *Euphorbiaceae* Familyasına ait *Euphorbia macroclada*, *Scrophulariaceae* Familyasına ait *Veronica multifida*, *Fabaceae* Familyasına ait *Vicia canescens* ssp. *gregaria*, *Ranunculaceae* Familyasına ait *Delphinium peregrinum* ve *Ranunculus argyraeus*, *Boraginaceae* Familyasına ait *Alkanna orientalis*, *Anchusa officinalis*, *Moltkia coerulea*, *Myosotis ramosissima* bitkileri kullanıldı. Belirlenen bitkiler İlkbahar döneminde Karadağ, Karaman-Ereğli yolu ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi kampüs alanından toplandı. İlgili literatür (Alkan ve Koçak, 2012) yardımıyla tür tanımları yapıldı.

##### 3.1.1. Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Elde edilen bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için bakteri suşları, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada kullanılan gram pozitif olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis*; gram negatif olarak

*Escherichia coli* ATCC 43895, *Proteus vulgaris*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Klebsiella pneumonia* adlı test mikroorganizma kültürleri kullanıldı. *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* dışındaki mikroorganizmalar laboratuvar izolatuvar olarak elde edildi.

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Elde Edilmesi

Bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini belirlemek için farklı çözücüler (su ve hekzan) kullanılarak ekstraktları elde edildi. Bitkilerin gövde kısımları kullanıldı. Kurutulan bitkiler porselen havanda parçalanarak toz haline getirildi. *Moltkia coerulea*, *Euphorbia macroclada*, *Veronica multifida* ve *Anchusa officinalis*'den 10'er g; *Ranunculus argyraeus*'den 6 g; *Cruciata taurica*, *Myosotis ramosissima* ve *Alkanna orientalis*'den 5'er g; *Vicia canescens* ssp. *gregaria* ve *Delphinium peregrinum*'den 4'er g tartılarak kartuşlara koyuldu. 300 mL saf su ve hekzan kullanılarak Soxhlet ekstraktörü ile bitki ekstraktları elde edildi. Rotary evaporatör kullanılarak elde edilen ekstraktlerdeki çözücüler uçuruldu (Nostro ve ark., 2000; Toroğlu ve Çenet, 2006). Her bir bitki ekstresi için uygun çözücü kullanılarak konsantrasyonlar hazırlandı.

#### 3.2.2. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği Singleton ve Rossi (1965)'nin uyguladığı yöntemle göre belirlendi. Ekstrelerin 10 mg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı. Saf su ile elde edilen ekstraktlar için her kuyucuğa 20 µL örnek üzerine 20 µL Folin reaktif (2N) eklenerek pipetajlama ile karıştırıldı ve 3 dk karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından üzerine 20 µL %35 'lik sodyum karbonat ve 140 µL dH<sub>2</sub>O eklenerek 10 dk karanlık ortamda bekletildi. Hekzan ile elde edilen ekstraktlar için kendi çözücüsü kullanıldı. 725 nm 'de kör tüpe karşı absorbans değerleri belirlendi. Standart olarak gallik asit (0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5- 1 mM) kullanıldı. Gallik asit kalibrasyon eğrisindeki denklemden yararlanarak her 1 mg ekstre içinde bulunan toplam fenolik madde içeriği belirlendi. Her bir örnek 3 tekrarla test edildi. Standart hatalar Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplandı.

### 3.2.3. DPPH Radikal Yakalama Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi DPPH radikalini süpürme kapasitesi ölçülerek belirlendi. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna (1958) göre yapıldı. Bitki ekstraktları farklı konsantrasyonlarda (0,1- 0,2- 0,3- 0,4- 0,5- 1- 2- 4- 6- 8- 10- 40 mg/mL) ve uygun solvent kullanılarak hazırlandı. Yönteme göre her bir mikropipeteye 20 µL ekstre üzerine 180 µL DPPH (metanol içerisinde 0,06 mM) eklenerek 60 dk karanlık ortamda bekletildi. 517 nm'de kör tüpe karşı absorbans değerleri ölçülerek DPPH serbest radikalının indirgenmesi belirlendi. Standart olarak galik asit (0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5- 1 mM) kullanıldı. DPPH inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı. Elde edilen inhibisyon verileri özüt konsantrasyonuna göre grafiğe geçirildi ve elde edilen grafik denklemleri kullanılarak başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli olan örnek konsantrasyonu (EC<sub>50</sub>) hesaplandı (Sutay Kocabaş ve ark., 2015). Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalının % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu EC<sub>50</sub> (veya IC<sub>50</sub>) değeri olarak tanımlanmaktadır. Her bir örnek 3 tekrarla test edildi. Standart hatalar Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Radikal yakalama aktivitesi (\%)} = 100 \times \frac{\text{DPPH'in absorbans değeri} - \text{Ekstrenin absorbans değeri}}{\text{DPPH'in absorbans değeri}}$$

### 3.2.4. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

#### 3.2.4.1. Antimikrobiyal Etkinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumonia*) mikroorganizmalara karşı test edildi. Belirlenen mikroorganizmalar Mueller hinton broth besiyerinde üretildi. Bir gece inkübasyondan sonra üretilen mikroorganizmalar 0,5 Mc Farland (10<sup>8</sup>KOB/mL) standardına eşit olacak şekilde hazırlandı. Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine 100 µL hazırlanan test mikroorganizmalarından alınarak steril drigalski özesi ile petrinin her yerine homojen olacak şekilde yayma ekim yapıldı. Bitki

ekstreleri 6 mm çapında boş antimikrobiyal test disklerine tek yüze 20 L olarak emdirildi ve steril pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirildi. *E. coli*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. vulgaris*, *K.pneumonia* 35°C ye *A. tumefaciens* ise 28°C ye konularak 16 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde meydana gelen inhibisyon zonlarının çapları llerek antimikrobiyal aktivite incelenip kaydedildi (CLSI, 2006). Her bir örnek 3 tekrarla test edildi. Standart antibiyotik olarak Penisilin (10 u/disk), Gentamisin (10 g/disk), Tetrasiklin (30 g/disk), Ampisilin (10 g/disk) ve Oksasilin (1 g/disk) kullanıldı.

### 3.2.4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerinin Saptanması

Yapılan antibiyogram testi sonuçlarına göre, kullanılan mikroorganizmalar üzerine 8 mm ve üzerinde inhibisyon zonu oluşturan bitkilerin MİK alışması yapıldı. MİK değerini belirlemek için mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Bitki ekstreleri 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.35, 0.5, 1, 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda steril olarak hazırlandı. Bir gün önceden ekilen (18-24 saat) ve uygun sıcaklıkta inkübe edilen test organizmalarının (*B. licheniformis*, *A. tumefaciens*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*) konsantrasyonları 0,5 Mc Farland standardı (10<sup>8</sup>KOB/mL) kullanılarak 10<sup>4</sup>KOB/mL olacak şekilde steril Mueller Hinton broth besiyeri kullanılarak ayarlandı. Mikro plaka üzerinde kuyucuklar uygun konsantrasyonlara göre belirlendi. Kuyucuklara 100 l uygun konsantrasyonda hazırlanan organizma ve 100 l uygun konsantrasyonda hazırlanan bitki örnekleri ekildi. 5 farklı şahit hazırlandı,

- 100 l uygun hazırlanmış organizma+ 100 l steril besiyeri
- 100 l uygun konsantrasyonda örnek +100 l steril besiyeri
- 100 l steril besiyeri+ 100 l steril su
- 100 l steril besiyeri+ 100 l hekzan
- 200 l steril besiyeri

Mikro plakaların üzeri steril bir alüminyum folyo ile kapatıldı ve *B. licheniformis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* 35°C' de; *A. tumefaciens* 28°C' de inkübe edildi. 18-20 saat sonunda hem gözleme yoluyla hem de 660 nm'de absorbans değerleri lld. %0,1'lik kristal viyole hazırlandı. Her kuyucuğa 75 l eklenerek 5 dakika bekletildi. 595 nm'de absorbansı lld (Andrews, 2001). Her bir örnek 3 tekrarla test edildi.

#### 4. BULGULAR

Gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucu, bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin miktarı 81-808 mg/g kurutulmuş bitki materyali aralığında değişmektedir. Bitkilerden ekstrakte edilebilen bileşiklerin ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.1’de görülmektedir. En düşük ekstraksiyon veriminin 81 mg/g olarak *Euphorbia macroclada* ve *Moltkia coerulea* bitkilerinin hekzanlı ekstraksiyonunda olduğu belirlendi. En yüksek verim ise 808 mg/g olarak *Alkanna orientalis* bitkisinin su ekstraksiyonunda olduğu saptandı. Çizelge 4.1’e göre su kullanılarak elde edilen ekstraksiyon verimi hekzan ekstraktlarından daha fazla olarak belirlendi. 1 mL’deki özüt konsantrasyonları Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4. 1 Örneklerin ekstraksiyon verimi

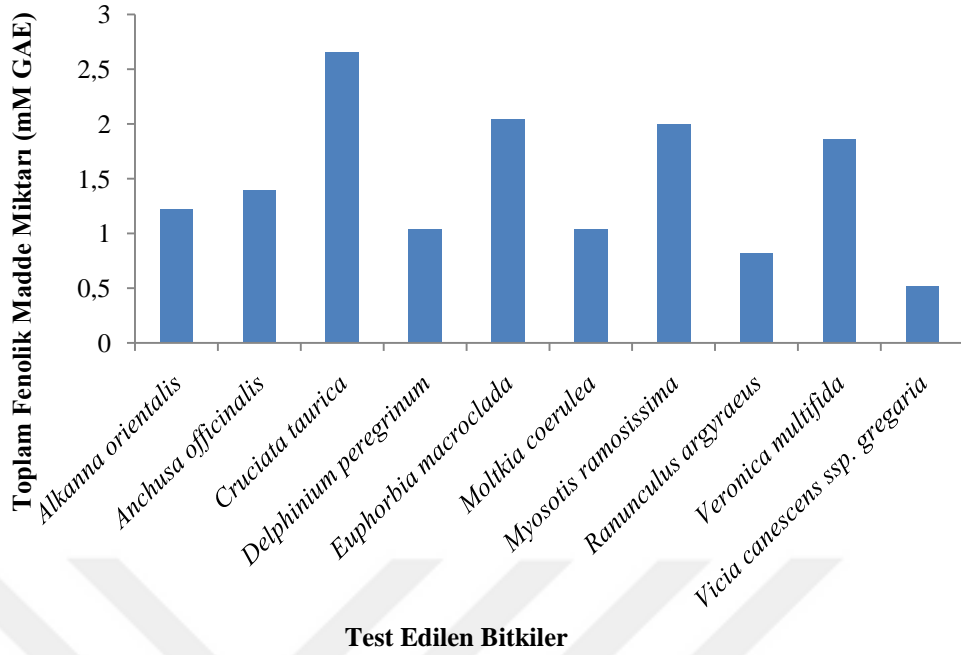
	Kullanılan Bitkiler	Ekstrakt			
		Su Özütü (mg/g)	Hekzan Özütü (mg/g)	Su Özütü Konsantrasyonu (mg/mL)	Hekzan Özütü Konsantrasyonu (mg/mL)
Kurutulmuş bitki gramındaki mg ekstrakt verimi	<i>Alkanna orientalis</i>	808	112	449	182
	<i>Anchusa officinalis</i>	515	122	429	245
	<i>Cruciata taurica</i>	520	184	433	184
	<i>Delphinium peregrinum</i>	583	188	466	250
	<i>Euphorbia macroclada</i>	459	81	656	203
	<i>Moltkia coerulea</i>	643	81	643	270
	<i>Myosotis ramosissima</i>	724	142	453	236
	<i>Ranunculus argyraeus</i>	558	201	558	450
	<i>Veronica multifida</i>	576	106	720	353
	<i>Vicia canescens ssp. gregaria</i>	578	233	578	232

#### 4.1. Toplam Fenolik Madde İçeriği

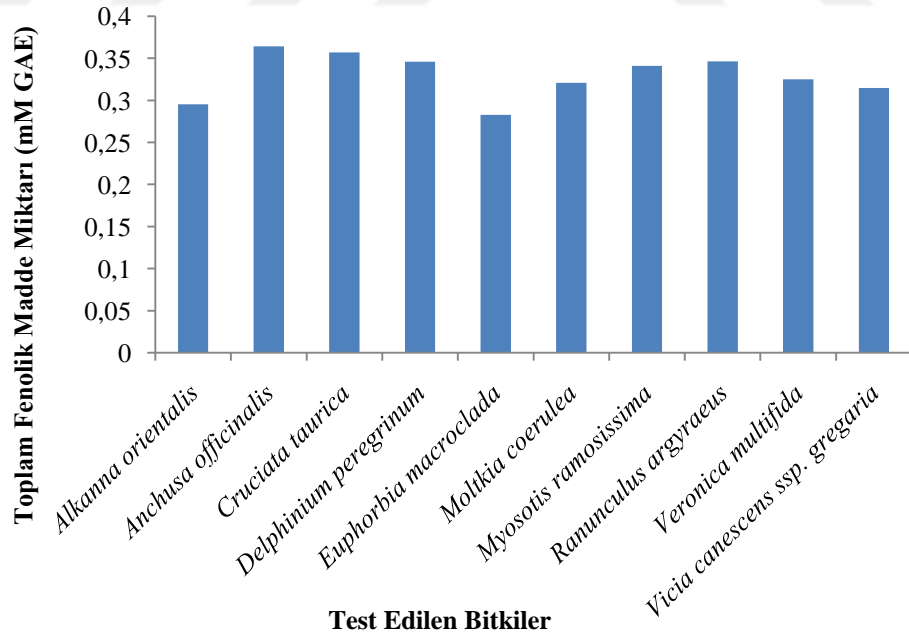
Fenolik bileşiklerin, antioksidan aktivitesinde belirleyici grup olmalarından dolayı, örneklerin ilk olarak toplam fenolik madde miktarı analizleri yapıldı. Toplam fenolik madde tayini için ekstrelerin 10 mg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı. Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için gallik asit kalibrasyon eğrisi çizildi ve buradan elde edilen gallik asit denklemi hesaplamalar için kullanıldı (Şekil Ek B.1).

Örneklerin su ekstresinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek 2,65 mM GAE (Gallik asit eşdeğeri) olarak *Cruciata taurica* olarak saptandı. Sırasıyla *Euphorbia macroclada*, *Myosotis ramosissima*, *Veronica multifida*, *Anchusa officinalis*, *Alkanna orientalis*, *Moltkia coerulea*, *Delphinium peregrinum* ve *Ranunculus argyraeus* şeklinde sıralandı. En düşük toplam fenolik madde miktarının ise 0,52 mM GAE olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde olduğu görüldü (Şekil 4.1). Örneklerin hekzan ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları ise 0,28-0,36 mM GAE arasında değişen değerler olarak saptandı. Sonuçlara bakıldığında hekzan özütlerinin toplam fenolik madde miktarı genel olarak birbirine yakın değerler olarak elde edildi (Şekil 4.2). Su özütlerinin toplam fenolik madde miktarının hekzan özütlerinden yüksek olduğu saptandı.

10 mg/mL konsantrasyonda hesaplanan toplam fenolik madde miktarları kullanılarak 1 g kuru örnekteki toplam fenolik madde miktarı mM GAE olarak hesaplandı. Çizelge 4.2'ye göre su ekstreleri için kuru örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı 7213,03 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Myosotis ramosissima* bitkisinde görüldü. En düşük toplam fenolik madde miktarı ise 1510,27 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde görüldü. Hekzan ekstreleri için kuru örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı 366,55 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde saptandı. En düşük toplam fenolik madde miktarı ise 114,50 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Euphorbia macroclada*'da görüldü.



Şekil 4. 1 Su özütlerinin toplam fenolik madde miktarları



Şekil 4. 2 Hekzan özütlerinin toplam fenolik madde miktarları



Çizelge 4. 2 Kuru örneklerin 1 gramındaki toplam fenolik madde miktarı\*

Bitki Türü	Fenolik İçerik (mM GAE/1 g kuru örnek)	
	Su Ekstreleri	Hekzan Ekstreleri
<i>Alkanna orientalis</i>	4941,09	165,39
<i>Anchusa officinalis</i>	3581,34	222,29
<i>Cruciata taurica</i>	6884,87	328,52
<i>Delphinium peregrinum</i>	3028,13	325,19
<i>Euphorbia macroclada</i>	4678,82	114,50
<i>Moltkia coerulea</i>	3346,18	129,87
<i>Myosotis ramosissima</i>	7213,03	242,03
<i>Ranunculus argyraeus</i>	2274,17	348,08
<i>Veronica multifida</i>	5353,54	172,18
<i>Vicia canescens ssp. gregaria</i>	1510,27	366,55

\*Veriler; Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'deki verilere göre hesaplanmıştır.

#### 4.2.DPPH Üzerinden Serbest Radikal Yakalama Etkileri

Test edilen bitkilerin su ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH yakalama aktivitelerine bakıldı. *Cruciata taurica* (%72,70), *Euphorbia macroclada* (%72,44) ve *Myosotis ramosissima* (%70,72) en yüksek aktiviteyi 1 mg/mL konsantrasyonda; *Alkanna orientalis* (%69,64), *Anchusa officinalis* (%71,71), *Delphinium peregrinum* (%70,83) ve *Veronica multifida* (%70,68) en yüksek aktiviteyi 2 mg/mL konsantrasyonda; *Moltkia coerulea* (%68,10), *Ranunculus argyraeus* (%70,21) ve *Vicia canescens ssp. gregaria* (%15,29) en yüksek aktiviteyi 4 mg/mL'lik konsantrasyonda gösterdi. Test edilen bitkilerin su ekstrelerinin DPPH yakalama aktivitelerine bakıldığında, en yüksek oran *Cruciata taurica* bitkisinin 1 mg/mL'lik konsantrasyonunda %72,70 olarak görüldü. Test edilen örneklerin içerisinde en düşük DPPH yakalama aktivitesi *Vicia canescens ssp. gregaria* örneğinde saptandı (Çizelge 4.3).

Test edilen bitkilerin hekzan ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH yakalama aktivitelerine bakıldı. *Anchusa officinalis* (%6,20) ve *Delphinium peregrinum* (%6,66) en yüksek aktiviteyi 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonda; *Alkanna orientalis* (%7,05) ve *Vicia canescens ssp. gregaria* (%9,53) en yüksek aktiviteyi 1 mg/mL konsantrasyonda; *Cruciata taurica* (%12,80), *Euphorbia macroclada* (%5,66), *Moltkia coerulea*

(%12,23), *Myosotis ramosissima* (%8,40), *Ranunculus argyraeus* (%11,68) ve *Veronica multifida* (%6,29) en yüksek aktiviteyi 2 mg/mL konsantrasyonda gösterdi. Test edilen bitkilerin hekzan ekstrelerinin DPPH yakalama aktivitelerine bakıldığında, en yüksek oran *Cruciata taurica* bitkisinin 2 mg/mL'lik konsantrasyonunda %12,80 olarak görüldü. Test edilen hekzan ekstreleri içerisinde en düşük DPPH yakalama aktivitesi *Veronica multifida* örneğinde saptandı (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.3** Su ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikallerini yakalama aktiviteleri\*

Bitki Türü	DPPH Yakalama Aktivitesi (%)							
	Konsantrasyon (mg/mL)							
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2	4
<i>Alkanna orientalis</i>	2,96± 0,15	7,87± 0,89	12,81± 0,11	19,75± 1,72	23,62± 1,28	44,48± 0,58	69,64± 0,60	67,85± 0,11
<i>Anchusa officinalis</i>	5,46± 1,23	12,28± 0,53	18,02± 1,66	24,66± 1,20	29,31± 1,58	58,82± 0,56	71,71± 1,00	67,69± 0,49
<i>Cruciata taurica</i>	9,19± 4,11692	28,40± 1,17	35,53± 2,55	54,64± 1,24	63,83± 3,87	72,70± 0,80	70,62± 2,29	69,54± 1,88
<i>Delphinium peregrinum</i>	5,03± 1,32	10,70± 2,26	14,02± 0,81	23,92± 1,44	25,94± 2,84	44,48± 1,73	70,83± 1,47	67,38± 0,45
<i>Euphorbia macroclada</i>	11,49± 1,15	22,51± 1,15	27,03± 2,35	43,52± 2,51	47,66± 1,05	72,44± 0,10	68,62± 0,71	58,32± 0,89
<i>Moltkia coerulea</i>	2,74± 0,71	4,78± 2,28	7,22± 0,60	12,96± 1,65	17,93± 1,36	39,36± 0,97	61,99± 2,12	68,10± 0,86
<i>Myosotis ramosissima</i>	11,03± 0,78	28,01± 2,04	43,64± 0,81	53,03± 2,71	58,56± 0,58	70,72± 0,31	68,58± 0,55	63,82± 0,42
<i>Ranunculus argyraeus</i>	5,62± 1,16	9,33± 0,02	11,24± 1,24	14,98± 0,94	17,73± 0,67	32,37± 0,65	57,00± 1,25	70,21± 0,85
<i>Veronica multifida</i>	8,22± 0,05	25,84± 1,07	38,22± 2,28	48,03± 0,68	59,92± 2,01	70,01± 0,99	70,68± 0,89	62,58± 0,65
<i>Vicia canescens ssp. gregaria</i>	0,78± 1,56	0,18± 4,53	0,43± 1,18	1,94± 2,70	3,42± 2,14	2,57± 3,76	3,12± 0,41	15,29± 0,04

\*: Veriler; farklı konsantrasyonlardaki yüzde ortalaması± standart hatası olarak verilmiştir.

**Çizelge 4.4** Hekzan ekstralarının farklı konsantrasyonlarda DPPH radikallerini yakalama aktiviteleri\*

Bitki Türü	DPPH Yakalama Aktivitesi (%)							
	Konsantrasyon (mg/mL)							
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1	2	4
<i>Alkanna orientalis</i>	4,15± 2,78	5,56± 1,74	5,54± 3,79	6,18± 0,64	6,10± 0,41	7,05± 3,23	6,42± 1,97	0,39± 0,31
<i>Anchusa officinalis</i>	6,20± 1,37	3,46± 0,91	5,49± 1,71	4,53± 0,22	5,39± 0,26	5,45± 0,75	5,31± 1,18	3,62± 0,31
<i>Cruciata taurica</i>	5,56± 2,23	4,65± 1,29	7,90± 1,03	8,26± 0,38	8,32± 3,77	9,48± 2,36	12,80± 1,58	12,75± 0,49
<i>Delphinium peregrinum</i>	6,66± 2,49	4,27± 3,01	5,59± 1,16	3,94± 1,16	6,57± 1,61	5,18± 2,82	5,24± 2,72	4,00± 2,77
<i>Euphorbia macroclada</i>	5,62± 1,27	5,55± 1,14	3,36± 2,55	3,69± 2,66	4,56± 1,79	5,50± 0,07	5,66± 1,12	4,40± 0,54
<i>Moltkia coerulea</i>	0,44± 0,85	0,87± 0,85	4,09± 0,90	3,08± 0,90	1,40± 0,79	11,27± 0,78	12,23± 1,60	0,32± 1,34
<i>Myosotis ramosissima</i>	6,67± 1,38	7,48± 0,07	6,55± 1,25	6,04± 0,87	8,39± 0,82	7,37± 1,56	8,40± 0,92	6,40± 1,99
<i>Ranunculus argyraeus</i>	8,19± 1,05	11,20± 0,49	8,95± 1,71	7,31± 1,17	9,28± 1,11	9,03± 0,24	11,68± 0,58	4,66± 1,95
<i>Veronica multifida</i>	–	0,04± 0,86	2,36± 0,33	1,39± 1,00	1,90± 0,61	3,98± 1,31	6,29± 1,59	1,84± 0,75
<i>Vicia canescens ssp. gregaria</i>	0,03± 1,10	1,63± 1,22	4,44± 1,32	4,98± 1,54	5,82± 0,25	9,53± 1,21	8,15± 2,22	6,18± 0,61

\*: Veriler; farklı konsantrasyonlardaki yüzde ortalaması± standart hatası olarak verilmiştir.

Hesaplanan EC<sub>50</sub> değeri ne kadar düşükse örneklerin antioksidan aktivitesi o kadar yüksektir. Örnek ekstraktlarının elde edilen EC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Örneklerin EC<sub>50</sub> değerleri ekstraller açısından kıyaslandığında büyük farklılık görüldü. *Alkanna orientalis*’in su ekstresinin EC<sub>50</sub> değeri 1,19 mg/mL iken hekzan ekstresinin EC<sub>50</sub> değeri 23,50 mg/mL olarak saptandı. *Vicia canescens ssp. gregaria* dışında incelenen tüm örneklerin su ekstralarının EC<sub>50</sub> değerleri hekzan ekstrallerinden daha düşük olarak belirlendi. *Vicia canescens ssp. gregaria*’nın su ekstresinin EC<sub>50</sub> değeri 13,14 mg/mL iken hekzan ekstresinin EC<sub>50</sub> değeri 4,85 mg/mL olarak belirlendi. Su ekstralleri birbiri ile karşılaştırıldığında en düşük EC<sub>50</sub> değerini 0,38 mg/mL olarak

*Cruciata taurica*, en yüksek EC<sub>50</sub> değerini 13,14 mg/mL olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisi gösterdi. Hekzan ekstreleri birbiri ile karşılaştırıldığında en düşük EC<sub>50</sub> değerini 4,85 mg/mL olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria*, en yüksek EC<sub>50</sub> değerini 168,40 mg/mL olarak *Anchusa officinalis* bitkisi gösterdi. Özellikle *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinin su ve hekzan ekstreleri kıyaslandığında; su ekstresinin diğer örnekler içinde en düşük antioksidan aktiviteyi gösterdiği, hekzan ekstresinin diğer örnekler içinde en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği saptandı.

**Çizelge 4. 5** Örneklerin DPPH yakalama aktivitelerinin EC<sub>50</sub> değerleri\*

Bitki Türü	Su (mg/mL)	Hekzan (mg/mL)
<i>Alkanna orientalis</i>	1,19±0,17	23,50±0,64
<i>Anchusa officinalis</i>	0,85±0,03	168,40±0,51
<i>Cruciata taurica</i>	0,38±0,03	24,02±1,44
<i>Delphinium peregrinum</i>	1,30±0,05	67,01±2,49
<i>Euphorbia macroclada</i>	0,60±0,04	13,75±1,27
<i>Moltkia coerulea</i>	1,46±0,17	107,68±0,79
<i>Myosotis ramosissima</i>	0,39±0,02	43,10±1,38
<i>Ranunculus argyraeus</i>	1,74±0,05	92,60±1,71
<i>Veronica multifida</i>	0,41±0,02	117,63±0,86
<i>Vicia canescens</i> ssp. <i>gregaria</i>	13,14±2,05	4,85±1,32
<b>Gallik asit</b>	0,14±0,03	0,14±0,03

\*: Veriler; EC<sub>50</sub> değerleri ± standart hatası olarak verilmiştir.

### 4.3. Örneklerin Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkisi

On farklı bitkinin su ve hekzanlı ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal etkileri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Oluşan inhibisyon zon çapları Çizelge 4.6'daki gibi elde edildi. Kullanılan disk çapları 6 mm'dir. Mikroorganizmalar disk yerleşimine göre disk altında da üreyebilmektedir. Bu nedenle 6 mm olan inhibisyon zonları da kayda geçirildi.

*Alkana orientalis* bitkisinin su ekstresi kullanılan tüm test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki gösterdi. En yüksek etkisi 14 mm'lik zon çapı ile *A.tumefaciens* üzerinde, en az etki ise 6 mm'lik zon çapı ile *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde gözlemlendi. *Alkana orientalis* bitkisinin hekzan ile elde edilen ekstresi en yüksek

antimikrobiyal etkiyi 11 mm'lik zon çapı ile *A.tumefaciens* üzerinde gösterirken, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermedi (Çizelge 4.6).

*Anchusa officinalis* bitkisinin su ekstresi *B. licheniformis*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde, hekzan ekstresi ise sadece *P. vulgaris* üzerinde çok az bir etki gösterdi. Diğer test mikroorganizmaları üzerine etkisi görülmedi (Çizelge 4.6).

*Cruciata taurica* bitkisinin su ekstresi 7 mm'lik inhibisyon zonu ile en yüksek etkisini *A.tumefaciens* üzerinde gösterdi. *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *E. faecalis* için 6 mm'lik inhibisyon zonu ile çok az etki gösterdi. Ancak diğer test mikroorganizmalarına etkisi gözlenmedi. *Cruciata taurica* bitkisinin hekzan ekstresi ise *E. faecalis* ve *K. pneumoniae* üzerinde çok az etki gösterirken diğer test mikroorganizmaları üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi (Çizelge 4.6). *Delphinium peregrinum* bitkisinin su ekstresi 9 mm'lik inhibisyon zonu ile en yüksek etkiyi *S. aureus* üzerinde gösterdi. *B. subtilis*, *E. coli* ve *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermedi. *Delphinium peregrinum* bitkisinin hekzan ekstresi *E. faecalis* üzerinde çok az etki gösterirken diğer mikroorganizmalar üzerinde etki göstermedi (Çizelge 4.6).

*Euphorbia macroclada* bitkisinin su ekstresi en fazla 8 mm inhibisyon zonu ile *A.tumefaciens* üzerine etki gösterirken, *S. aureus*'da 7 mm, *B. licheniformis*'de 6 mm inhibisyon zonu oluşturdu. Diğer test mikroorganizmaları üzerinde etki görülmedi. *Euphorbia macroclada* bitkisinin hekzan ekstresi hiçbir mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etki göstermedi (Çizelge 4.6).

*Myosotis ramosissima* bitkisinin her iki ekstresi *E. coli* ve *P. vulgaris* üzerinde çok az antimikrobiyal etki gösterirken, diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki göstermedi (Çizelge 4.6). *Ranunculus argyraeus* bitkisinin su ekstresi sadece *B. licheniformis* üzerinde çok az antimikrobiyal etki gösterirken diğer mikroorganizmalar üzerinde etki göstermedi. *Ranunculus argyraeus* bitkisinin hekzan ekstresi *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* dışında hiçbir mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etki göstermedi (Çizelge 4.6). *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinin her iki ekstresi *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde çok az antimikrobiyal etki gösterirken, diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki göstermedi (Çizelge 4.6). *Veronica multifida* ve *Moltkia coerulea*'nın her iki ekstresi de test edilen mikroorganizmaların hiçbirine antimikrobiyal etki göstermedi (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4. 6** Örneklerin disk difüzyon yöntemi ile antibiyogram sonuçları\*

Mikroorganizmalar	<i>Alkanna orientalis</i>		<i>Anchusa officinalis</i>		<i>Cruciata taurica</i>		<i>Delphinium peregrinum</i>		<i>Euphorbia macroclada</i>		<i>Myosotis ramosissima</i>		<i>Ranunculus argyraeus</i>		<i>Vicia canescens ssp. gregaria</i>	
	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan	Su	Hekzan
<i>A. tumefaciens</i>	14	11	-	-	7	-	7	-	8	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	11	10	6	-	6	-	8	-	6	-	-	-	6	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	12	8	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	10	9	-	-	6	6	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	6	-	6	-	-	6	7	-	-	-	-	-	-	6	6	6
<i>P. vulgaris</i>	6	-	6	6	-	-	7	-	-	-	6	6	-	6	6	6
<i>S. aureus</i>	10	9	-	-	-	-	9	-	7	-	-	-	-	-	-	-

\*: -: İnhibisyon zonu yok; Zon çapları: mm

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerine bakıldığında, tüm suşların gentamisin ve tetrasikline duyarlı olduğu, penisilin G’ye karşı ise bazı test mikroorganizmalarında direnç geliştiği tespit edildi.

**Çizelge 4. 7** Standart antibiyotiklerin test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zonları

Mikroorganizmalar/ Antibiyotik	Penisilin G 10u/disk	Gentamisin 10µg/disk	Tetrasiklin 30µg/disk	Ampisilin 10µg/disk	Oksasilin 1µg/disk
<i>A.tumefaciens</i>	-	20	26	10	-
<i>B. licheniformis</i>	26	20	27	*	*
<i>B. subtilis</i>	23	21	17	22	12
<i>E. coli</i>	10	15	20	-	13
<i>E. faecalis</i>	22	11	14	*	*
<i>K. pneumoniae</i>	-	19	14	*	*
<i>P. vulgaris</i>	-	19	14	*	*
<i>S. aureus</i>	27	18	26	14	16

-: İnhibisyon zonu yok; \*: Denenmedi; Zon çapları: mm

#### 4.4. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Yapılan antibiyogram testi sonuçlarına göre kullanılan mikroorganizmalar üzerine 8 mm ve üzerinde inhibisyon zonu oluşturan bitkilerin MİK çalışması yapıldı. Antibiyogram sonuçlarına göre; *Delphinium peregrinum* bitkisinin sulu ekstraktı, *B. licheniformis* için 8mm, *S. aureus* için 9 mm inhibisyon zonu oluşturdu. *Euphorbia macroclada* bitkisinin sulu ekstraktı, *A. tumefaciens* için 8 mm inhibisyon zonu oluşturdu. *Alkana orientalis* bitkisinin sulu ekstraktı; *B. licheniformis* için 11 mm, *A. tumefaciens* için 14 mm, *S. aureus* için 10 mm, *E. faecalis* için 10 mm, *B. subtilis* için 12 mm inhibisyon zonu oluşturdu. *Alkana orientalis* bitkisinin hekzanlı ekstraktı; *B. licheniformis* için 10 mm, *A. tumefaciens* için 11 mm, *S. aureus* için 9 mm, *E. faecalis* için 9 mm, *B. subtilis* için 8 mm inhibisyon zonu oluşturdu. Belirlenen bitki ekstraktları ve mikroorganizmalar inkübasyon süresi sonunda gözlemlenebilirlik yoluyla belirlendi. Ayrıca hem 660 nm’de hem de %0,1’lik kristal viyole eklenerek 595 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre MİK değerleri saptandı.

*Delphinium peregrinum* bitkisinin su ekstresiyle yapılan MİK çalışmalarında, gözle ve absorbans değerlerinin şahitlerle karşılaştırılması sonucunda 10 mg/mL konsantrasyonda *B. licheniformis* ve *S. aureus*’un bakteriyel gelişimlerini inhibe ettiği saptandı (Çizelge 4.8).

*Euphorbia macroclada* bitkisinin su ekstresiyle yapılan MİK çalışmalarında, gözle ve absorbans değerlerinin şahitlerle karşılaştırılması sonucunda 1 mg/mL konsantrasyonda *A. tumefaciens*’in bakteriyel gelişimini inhibe ettiği saptandı (Çizelge 4.8).

*Alkana orientalis* bitkisinin su ekstresiyle yapılan MİK çalışmalarında, gözle ve absorbans değerlerinin şahitlerle karşılaştırılması sonucunda; *B. licheniformis* için 5 mg/mL konsantrasyonda, *A. tumefaciens*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. subtilis* için 1 mg/mL konsantrasyonda bakteriyel gelişimlerini inhibe ettiği saptandı (Çizelge 4.8).

*Alkana orientalis* bitkisinin hekzan ekstresiyle yapılan MİK çalışmalarında, gözle ve absorbans değerlerinin şahitlerle karşılaştırılması sonucunda; 1 mg/mL konsantrasyonda *B. licheniformis*, *A. tumefaciens*, *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. subtilis*’in bakteriyel gelişimlerini inhibe ettiği saptandı (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4. 8** Örneklerin bazı test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri

Kullanılan Mikroorganizmalar	MİK Değerleri (mg/mL)			
	<i>Delphinium peregrinum</i> (Su ekstraktı)	<i>Euphorbia macroclada</i> (Su ekstraktı)	<i>Alkana orientalis</i> (Su ekstraktı)	<i>Alkana orientalis</i> (Hekzan ekstraktı)
<i>B. licheniformis</i>	10	*	5	1
<i>A. tumefaciens</i>	*	1	1	1
<i>S. aureus</i>	10	*	1	1
<i>E. faecalis</i>	*	*	1	1
<i>B. subtilis</i>	*	*	1	1

\*: 8 mm'den az inhibisyon zonu oluşturduğu için MİK değeri bakılmadı.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Patojen ve zararlı mikroorganizmaların mevcut antimikrobiyal maddelere karşı artan direnci nedeniyle günümüzde yeni antimikrobiyal madde kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni kaynak arayışında şifalı bitkilerin içeriğindeki aktif bileşenler en önemli alanı oluşturmaktadır (Petrosyan ve ark. 2015).

Bu çalışmada, Karaman il sınırları ve Karadağ bölgesinden toplanan *Rubiaceae* Familyasına ait *Cruciata taurica*, *Euphorbiaceae* Familyasına ait *Euphorbia macroclada*, *Scrophulariaceae* Familyasına ait *Veronica multifida*, *Fabaceae* Familyasına ait *Vicia canescens* ssp. *gregaria*, *Ranunculaceae* Familyasına ait *Delphinium peregrinum* ve *Ranunculus argyraeus*, *Boraginaceae* Familyasına ait *Alkanna orientalis*, *Anchusa officinalis*, *Moltkia coerulea*, *Myosotis ramosissima* bitkilerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Mevcut bitkilerin su ve hekzan ekstralarının antioksidan aktivitelerini belirlemek için, DPPH serbest radikal yakalama aktiviteleri ve toplam fenolik madde içerikleri saptanmıştır. Örneklerin su ekstresinde toplam fenolik madde miktarı en yüksek *Cruciata taurica* bitkisinde 2,65 mM GAE olarak saptanmıştır. Sırasıyla *Euphorbia macroclada*, *Myosotis ramosissima*, *Veronica multifida*, *Anchusa officinalis*, *Alkanna orientalis*, *Moltkia coerulea*, *Delphinium peregrinum* ve *Ranunculus argyraeus* şeklinde sıralanmıştır. En düşük toplam fenolik madde miktarının ise 0,52 mM GAE olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde olduğu belirlenmiştir. Örneklerin hekzan ekstralarının toplam fenolik madde miktarları ise 0,28-0,36 mM GAE arasında değişen değerler olarak saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında hekzan özütlerinin toplam fenolik madde miktarları genel olarak birbirine yakın değerler olarak görülmüştür. Aynı bitki türünün su ve hekzan ekstralarının fenolik madde içerikleri farklı olarak saptanmıştır. Örneklerin 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki toplam fenolik madde miktarları kullanılarak 1 gram kuru örnekteki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır. Buna göre su ekstraları için 10 mg/mL konsantrasyonda en yüksek toplam fenolik madde içeriği *Cruciata taurica* bitkisinde görülürken 1 gram kuru örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı 7213,03 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Myosotis ramosissima*'da saptanmıştır. En düşük fenolik madde miktarı ise 10 mg/mL konsantrasyonda olduğu gibi *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde belirlenmiştir. Hekzan ekstraları için 10 mg/mL konsantrasyonda en yüksek toplam fenolik madde

içeriği *Anchusa officinalis* ve *Cruciata taurica* bitkilerinde görülürken 1 gram kuru örnekte en yüksek toplam fenolik madde miktarı 366,55 mM GAE/1 g kuru örnek olarak *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde görülmüştür. En düşük fenolik madde miktarı ise 10 mg/mL konsantrasyonda olduğu gibi *Euphorbia macroclada*'da saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında en yüksek fenolik madde içeriği olan bitki kuru örnekte ve özütte farklılık göstermiştir. Bu farklılığın 1 gram kuru örnekten elde edilen özüt miktarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

DPPH yakalama aktivitelerinin % inhibisyonlarına bakıldığı zaman en yüksek oran *Cruciata taurica* bitkisinde görülmüştür. Ancak su ekstresinin 1 mg/mL'lik konsantrasyonunda %72,70, hekzan ekstresinde en yüksek 2 mg/mL'lik konsantrasyonunda %12,80 olarak belirlenmiştir. En düşük % inhibisyon değerleri su ekstresinde *Vicia canescens* ssp. *gregaria*, hekzan ekstresinde ise *Veronica multifida* örneğinde saptanmıştır. Hesaplanan EC<sub>50</sub> değerleri kıyaslandığında en düşük EC<sub>50</sub> değeri 0,38 mg/mL olarak *Cruciata taurica* bitkisinin su ekstresinde görülmüştür. *Vicia canescens* ssp. *gregaria* dışında incelenen tüm örneklerin su ekstrelerinin EC<sub>50</sub> değerleri hekzan ekstrelerinden daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu örnekler için su ile elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. *Vicia canescens* ssp. *gregaria* bitkisinde ise hekzan ekstresinin antioksidan aktivitesi su ekstresine göre yüksek olarak görülmüştür. Aynı bitki türünde çözücüye bağlı olarak % inhibisyon değerleri ve antioksidan aktiviteleri farklılık göstermiştir. Sonuçlara göre, çalışılan bitkilerin çözücülere göre fenolik madde içeriğindeki farklılıkların, gösterdikleri antioksidan özelliklerini etkilediği açıkça görülmüştür. Bunun yanında yüksek fenolik madde miktarına ve yüksek radikal yakalama aktivitesine sahip olmanın, birbirleri ile % 100 paralel olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda hekzan ekstreleri içinde yüksek fenolik madde miktarı *Anchusa officinalis*'de görülmesine rağmen EC<sub>50</sub> değeri yüksek olarak saptanmıştır. Bu nedenle tek bir yöntemle örneklerin antioksidan aktivitesi hakkında karar vermek doğru bir yaklaşım olmamaktadır. Antioksidan aktivite belirlenirken farklı yöntemler kullanılması ve elde edilen sonuçların her bir özelliğe göre belirlenmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Mavi ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada Erzurum'un köylerinden toplanan *Prangos ferulacea* (Çaşır), *Sedum sempervivoides* (Horoz Lelesi), *Malva neglecta* (Ebengümece), *Cruciata taurica* (Sarılık Otu), *Rosa pimpinellifolia* (Koyun Gözü), *Galium verum subsp. verum* (Madavur Otu), *Urtica dioica* (Isırgan) bitkilerinin su ve metanolik ekstralarının toplam fenolik miktarı ve DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Ekstrelerin 50, 100, 250 ve 500 mg/L konsantrasyonları kullanılmıştır. Toplam fenolik madde miktarının ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır. *Crucita taurica* bitkisinin su ekstrelerinin EC<sub>50</sub> değeri 0.00022 mg / L olarak denenen örnekler arasında en düşük değer olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da en düşük EC<sub>50</sub> değeri *Cruciata taurica* bitkisinin su ekstrelerinde belirlenmiş ve bu sonucun bizim çalışmamızla uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak araştırma sonucunda metanol ekstralarının su ekstralarından daha fazla apolar bileşen içerdiği ve *Galium verum subsp. Verum* bitkisinin metanol ekstrelerinin su ekstrelerine göre daha etkili bir antioksidan olabileceği belirtilmektedir.

Farahpour ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Moltkia coerulea*'nın antioksidan aktivitesi ve yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Folin-Ciocalteu reaktifiyle toplam fenolik madde miktarı, DPPH yöntemiyle antioksidan gücü ölçülmüştür. İran'dan toplanan bitkilerin hidroetanolik çözelti ile 48 saat oda ısısında karıştırılıp süzülerek ekstraksiyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda EC<sub>50</sub> değeri 9,45 mg/mL, toplam fenolik madde miktarı ise 122,9 µg gallik asit/mg ekstre olarak saptanmıştır. Araştırma sonucunda antioksidan özellikleri ile yara iyileşmesi üzerine kısmen faydalı olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da su ekstralarının antioksidan aktivitesi hekzan ekstralarından daha yüksek olarak bulunmuştur.

Güneş ve ark. (2014) *Hyoscyamus reticulatus*'dan elde edilen hekzan ve su özütlerinin antioksidan kapasitelerini ve antimikrobiyal etkilerini araştırmışlardır. Antioksidan kapasite DPPH radikal süpürme, toplam antioksidan kapasite, demir ve bakır indirgeme testleri ile araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Hekzan ekstraları 6 saatlik soxhlet ekstraksiyonu ile, su ekstraları 15 dakika kaynar su içinde karıştırılarak elde edilmiştir. Çalışma sonunda özütlerin toplam fenolik madde miktarı karşılaştırıldığında su ekstrelerinde daha yüksek olarak belirlenmiştir. DPPH yakalama aktivitelerine bakıldığında tüm konsantrasyonlarda (0,25-0,5-1-2 mg/mL) su ekstraları hekzan ekstralarından daha yüksek aktivite

göstermiştir. Antimikrobiyal etkilerine bakıldığında hekzan ekstralarının su ekstralarına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivitesi bulunduğu belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda da DPPH radikal yakalama aktivitelerine bakıldığında su ekstralarının % inhibisyon değerleri hekzan ekstrallerinden daha yüksek olarak belirlenmiştir. Ancak antimikrobiyal aktivite kıyaslandığında su ekstralarının hekzan ekstrallerinden daha yüksek etki gösterdiği saptanmıştır.

Elgin Cebe ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Olea europaea* var. *Europaea* (Zeytin) yaprak infüzyonunun antioksidan aktivitesini TEAK (Trolox Antioksidan Kapasite), DPPH radikal toplama (DPPH- RT) ve fosfomolibden kompleks indirgeme (FKİ) yöntemleri kullanarak araştırmışlardır. Toz haline getirilen drog sıcak su ile karıştırılarak 5 dakika oda ısısında bekletilmiş ve santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısmı ekstrakt olarak kullanılmıştır. İncelenen zeytin yaprak infüzyonunun, standart olarak kullanılan butillenmiş hidroksitoluen (BHT) antioksidan kapasitelerinin yüzdeleri şeklinde ifade edilecek olursa, TEAK yöntemine göre %67, DPPH-RT yöntemine göre %50 ve FKİ yöntemine göre de %68 oranında antioksidan kapasiteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu kapasite anlamlı derecede antioksidan kapasiteyi ifade etmektedir.

Arıduru ve Arabacı (2013) yaptıkları çalışmada Ciğertaze otu (Ada çayı, *Salvia officinalis*) bitkisinin etanol, metanol, aseton ve etil asetat çözücüleri ile elde edilen ekstralarının antioksidan aktivitelerini araştırmıştır. Toplam fenolik madde tayini Folin yöntemiyle belirlenmiş ve en yüksek değer etanol ekstratında gözlenmiştir. Çözücü farklılığına göre etanol ekstraktı > metanol ekstraktı > etil asetat ekstraktı >aseton ekstraktı şeklinde sıralanmıştır. Ciğertaze otunun en yüksek DPPH giderim aktivitesini % 90,89 değeri ile metanol ekstraktının gösterdiği saptanmıştır. Metanol ekstraktı > etil asetat ekstraktı >etanol ekstraktı > aseton ekstraktı şeklinde sıralanmıştır. En yüksek fenolik madde içeriği gösteren ekstre yüksek DPPH giderim aktivitesi göstermemiştir. Bu sonucun, bizim çalışmamızda hekzan ekstralarının toplam fenolik madde içerikleri ve EC<sub>50</sub> değerleri arasındaki ilişki içinde geçerli olduğu görülmüştür. Hekzan ekstrallerinde en yüksek fenolik madde içeriği ve en düşük antioksidan aktivite *Anchusa officinalis*'de görülmüştür.

Çalışmamızın ikinci kısmında mevcut bitkilerin su ve hekzan ekstralarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için disk difüzyon yöntemi ile antibiyogram testi yapılmış ve mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada; *Alkanna orientalis* bitkisinin incelenen tüm bitkiler arasında en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. *Alkanna orientalis* bitkisinin su ekstresi test edilen tüm mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En yüksek etkiyi 14 mm'lik zon çapı ile *A.tumefaciens* üzerinde, en az etkiyi ise 6 mm'lik zon çapı ile *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde göstermiştir. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde sırasıyla 12, 11, 10 ve 10 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuştur. *Alkana orientalis* bitkisinin hekzan ile elde edilen ekstresi en yüksek antimikrobiyal etkiyi 11 mm'lik zon çapı ile *A.tumefaciens* üzerinde gösterirken, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. vulgaris* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. *Veronica multifida* ve *Moltkia coerulea*'nın her iki ekstresi de test edilen mikroorganizmaların hiçbirine antimikrobiyal etki göstermemiştir.

Petrosyan ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada Ermenistan'da deniz seviyesinden 1500-1600 m yükseklikten toplanan *Alkanna orientalis* bitkisinin kök ve kök menşeli kallus dokularından elde edilen ekstrenin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. %70 etanol ile 15 dakika homojenize edilmiş, bir gece bekletilerek ekstre elde edilmiştir. Ekstre 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüz edilmiş ve süpernatant kısmı izole edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Standart antibiyotik olarak Ampisilin 50 µg/mL kullanılmıştır. *Bacillus mycoides*, *B. mesentericus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Brevibacterium flavum*, *E. hirae*, *Micrococcus luteus*, *St. aureus*, *St. citreus*, *St. roseus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Debaryomyces hansenii* ve *Pichiaguillier mondii* üzerine antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Yüksek oranda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *S. aureus* ve *B. Subtilis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları sırasıyla 30, 24 mm olarak, *E. coli*'nin ise daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir. Standart antibiyotik ise *S. aureus* ve *B. Subtilis* üzerinde sırasıyla 26, 40 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ekstrenin MİK değeri seyreltme yöntemiyle belirlenmiştir. Hazırlanan ekstre konsantrasyonları (500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 15.625 µg/mL) mikroorganizma kültürlerine denenmiştir. *S. aureus* ve *B. Subtilis* için

MİK değeri 125 µg/mL olarak, *E. coli* için MİK değeri 500 µg/mL olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda *Alkanna orientalis* bitkisinin *S. aureus* ve *B. Subtilis* üzerinde sırasıyla 12, 10 mm inhibisyon zonu oluşturarak denenen bitkiler içinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. *E. coli* üzerinde ise çok az antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Su ve hekzanlı ekstraktların *S. aureus* ve *B. Subtilis* için MİK değeri 1 mg/mL olarak saptanmış. Çalışmalar kıyaslandığında ekstraksiyon için kullanılan bitki kısımlarının, kullanılan çözücünün ve yetiştiği bölgenin farklı olduğu görülmektedir. Sonuçlardaki farklılığın buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Khafagi ve Dewedar (2000) yaptıkları çalışmada, Mısır'da yetişen 60 bitki türünün hekzan, etil asetat ve etanol ekstrelerinin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* karşı antibakteriyal ve antifungal aktivitesini araştırmışlardır. *Alkanna orientalis* bitkisi güçlü aktivite göstermiştir. Hekzan ekstresi *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus vulgaris* üzerinde 21-30 mm inhibisyon zonu oluştururken *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Etil asetat ve etanol ekstresi *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* üzerine antimikrobiyal etki gösterirken *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris* üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise hekzan ekstresi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus vulgaris* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

Mothana ve ark. (2010) tarafından yapılan bir araştırmada Yemen'de geleneksel tedavide kullanılan 16 bitki türünün metanol ve sıcak su ekstresinin DPPH yöntemi ile antioksidan, agar difüzyon yöntemi ile *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6059), *Micrococcus flavus* (SBUG 16), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Candida maltosa* (SBUG) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ve sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Metanol ekstreleri 8 saatlik soxhlet ekstraksiyonu, su ekstreleri ise 70 °C'de 2 saatlik su banyosunda bekletilerek elde edilmiştir. *Alkanna orientalis* bitkisinin metanol ekstresi *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* üzerinde 10 mm inhibisyon zonu oluştururken *Escherichia coli* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Su ekstresi ise hiçbir test mikroorganizması üzerine etkili olmamıştır.

Standart antibiyotik olarak Ampisilin (10µg/disk) kullanılmış ve *Staphylococcus aureus*'ta 25 mm, *Bacillus subtilis*'te 26 mm, *Escherichia coli*'de ise inhibisyon zonu oluşturmamıştır. *Alkanna orientalis* ekstrelerinin 10, 50, 100, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarının DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesine bakıldığı zaman; metanol ekstresi en yüksek aktiviteyi %98,10 olarak 500 µg/mL konsantrasyonda, su ekstresi %6,29 olarak sadece 1000 µg/mL konsantrasyonda antioksidan aktivite göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise *Alkanna orientalis*'in su ekstresi denenilen bitkiler arasında antimikrobiyal etkisi en yüksek olarak saptanmıştır. Yine su ekstresinin DPPH % inhibisyon değeri 1 mg/mL konsantrasyonda %44,48 olarak saptanmıştır. Sonuçlar kıyaslandığında *Alkanna orientalis*'in su ekstresi bizim çalışmamızda daha etkili olarak görülmüştür. Bu sonucun ekstraksiyon yöntemindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Al-Mughrabi (2003) tarafından yapılan bir çalışmada Ürdün'den toplanan *Euphorbia macroclada* bitkisinin patojen bitki mantarlarına karşı gövde, yaprak ve çiçek ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Bitki kısımları steril distile su, petrol eteri, metanol, kloroform ve bütanol ile ekstre edilmiştir. *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Verticillium dahliae*, *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium italicum*, *Cladosporium* sp. ve *Mucor* sp. test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Ekstreler tüm test patojenlerine antimikrobiyal etki göstermiştir. Gövde ekstraktlarının çiçek ekstraktlarından daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği, yaprak ekstraktlarının ise daha az etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca en etkili çözücünün bütanol olduğu, suyun orta derecede, petrol eterinin ise en az etki gösterdiği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda bitkinin sadece yaprak kısımları kullanılmış ve su ekstresinin hekzan ekstresine göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Erdoğrul ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada, *Hypericum scabrum* bitkisinin etil asetat, metanol, sodyum hidroksit, su, etanol, piridin ve zeytinyağı ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi *in vitro* olarak 17 farklı bakteri türüne ve bir maya türüne karşı disk difüzyon metodu ile test edilmiştir. Sodyum hidroksit ekstresinin *Corynebacterium xerosis* UC 9165 dışında tüm test mikroorganizmalarına karşı en yüksek etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Su ve zeytinyağı ekstreleri test mikroorganizmalarının hiçbirine etki göstermemiştir. Onbaşılı ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Mnium marginatum*

ekstrelerinin antimikrobiyal etkisinin araştırmışlardır. Ekstre eldesinde çözücü olarak aseton, kloroform, metanol ve steril distile su kullanılmıştır. Ekstreler bazı gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve maya kültürleri üzerinde denenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi kloroform, en düşük aktiviteyi distile su ekstresinin gösterdiği saptanmıştır. Bektaş (2011) tarafından yapılan bir araştırmada *Cotinus coggygia* (Scop.) bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Antioksidan aktivite tayininde DPPH serbest radikali giderme, indirgeme gücü ve ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemleri kullanılmıştır. Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenolik madde miktarı saptanmıştır. Ekstreler su, etanol ve aseton çözeltileri ile elde edilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı su ekstresinde saptanırken, farklı ekstrelerin fenolik madde miktarları farklı olarak saptanmıştır. DPPH radikal giderme aktiviteleri ise yakın değerler olarak saptanmıştır. En düşük EC<sub>50</sub> değeri ve mikroorganizmalar üzerinde en fazla antimikrobiyal aktivite su ekstresinde belirlenmiştir. Kullanılan çözücüye göre antimikrobiyal aktivitede farklılık olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da bu farklılık görölmüştür. Örneğin, *Euphorbia macroclada* bitkisinin su ekstresi *A.tumefaciens*, *S. aureus* ve *B. licheniformis* üzerinde sırasıyla 8, 7, 6 mm inhibisyon zonu oluştururken hekzan ekstresi hiçbir mikroorganizma üzerinde etki göstermemiştir.

Berber ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada Sinop'da yetişen 15 adet bitki türünün metanolik ekstresinin antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmıştır. Ekstreler %70'lik metanolla ıslatılıp oda sıcaklığında bir gece bekletilmiş ve kurutma kâğıdından süzölerek elde edilmiştir. Çalışmada *M. germanica* ve *L. nobilis* bitkilerinin meyve ve yaprak özütlerinin farklı düzeylerde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonunda Sinop için endemik bir tür olan *C. speciosus* subsp. *xantholaimos*'dan elde edilen ekstraktın tüm mikroorganizmalar üzerine önemli düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; aynı bitkiden farklı çözücülerle (su ve hekzan) elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları, antioksidan aktiviteleri ve aynı test mikroorganizmaları üzerinde belirlenen antimikrobiyal aktivitelerinin farklı olduğu görölmüştür. Bitkilerin fitokimyasal etkilerinin ve kullanılan çözücülerin farklı fitokimyasalları çözmesi nedeniyle ekstraktların farklı antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterdiği düşünölmektedir. Birçok çalışma, farklı bölgelerden toplanan aynı



bitki türünün, hatta aynı türün farklı kısımları (yaprak, meyve veya tohum) kullanılarak hazırlanan ekstraların farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını bildirmektedir. Kullanılan bitki bölümlerinin, çözücülerin, bitkinin yetiştiği çevre şartlarının ve kullanılan test mikroorganizması suşlarının farklı olması sonuçlarda farklılığa neden olabilmektedir. Yapılan araştırmalar antimikrobiyal aktivite gösteren bitkilerin sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceğini belirtmektedir. Günümüzde mikroorganizma türlerinin değişerek mevcut antimikrobiyal maddelere direnç kazanması nedeniyle ülkemizde doğada yetişen bu tür bitkilerin ilaç endüstrisine katkı sağlamak amacıyla tespit edilmesi, üretilmesi ve araştırılması faydalı olacaktır. Aktivite gösteren bitkilerin içeriklerindeki maddelerin belirlenerek daha ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir. Ayrıca araştırmamızda en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren *Alkanna orientalis* türünün içerdiği etken maddeler ve kimyasal yapıları açısından araştırılmasının önemli olacağı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ağbaşı, B., Karakuş, D., Adıgüzel, R., Keser, S. ve Demir, E., 2013. Tunceli Sarımsağının (*Allium tuncelianum*) Toplam Antioksidan Özelliklerinin ve Kuru Madde İçeriğinin Normal Sarımsak (*Allium sativum*) ile Karşılaştırılması. *Bilim ve Gençlik Dergisi*, 1(2), 50-62.
- Ak, T. ve Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 27–37.
- Akçiçek, E., 2010. Eski İlaçlar, Yeni Uygulama Alanları. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, Zeytinburnu.
- Akşit, F., 1993. Bakteri Genetiği ve Antimikrobik Maddeler. *Mikrobiyoloji*, Editör: N. Serter. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:490, Eskişehir, s. 44-56.
- Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., 2010. Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401-409.
- Alkan, M. ve Koçak, Ö. (Ed.), 2012. Karadağ'ın Doğal ve Kültürel Varlıkları, Mevlana Kalkınma Ajansı, Alagöz Ofset Matbaa Ambalaj Konya. ISBN: 978-605-4610-08-2.
- Almeida, M.L.B., Freitas, W.E.D.S., Morais, P.L.D.D., Sarmiento, J.D.A. ve Alves, R.E., 2016. Bioactive Compounds and Antioxidant Potential Fruit of *Ximenia americana* L.. *Food Chemistry*, 192, 1078–1082.
- Al-Mughrabi, K. I., 2003. Antimicrobial Activity of Extracts from Leaves, Stems and Flowers of *Euphorbia macroclada* Against Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathol. Mediterr.*, 42, 245–250.
- Al-Sereitia, M. R., Abu-Amerb, K. M. ve Sena, P., 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its Therapeutic Potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-131.
- Altaş, S., 2009. *Cedrus libani* (Sedir) ve *Abies cilicia* (Kökner) Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Diyarbakır.
- Altın, Z.G., Keyf, S., Çorbacıoğlu, B.D. ve Beyribey, B., 2013. Katı-Sıvı Ekstraksiyon İşlemi İle Jojoba Yağının Eldesi ve İşlem Değişkenlerinin Yağ Verimi Üzerindeki Etkileri. *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 447-455.
- Altundağ, Ş. ve Aslım, B., 2005. Kekiğin Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(7), 12-14.
- Alver, E., Demirci, A. ve Özçimder, M., 2012. Microextraction Methods. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Sigma 30, 75-90.

- Andrews, J.M., 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Anonim, 2011. Tıbbi Laboratuvar Antibiyotik Duyarlılık Testi. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Yayın No: 725TTT107, Ankara. [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Antibiyotik%20Duyarlılık%20Testi.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antibiyotik%20Duyarlılık%20Testi.pdf) (Erişim tarihi: 20.08.2015)
- Anonim, 2013. Laboratuvar Hizmetleri Antimikrobiyal Madde Testleri. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Ankara. [http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/Antimikrobiyal%20Madde%20Testleri.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antimikrobiyal%20Madde%20Testleri.pdf) (Erişim Tarihi: 20.08.2015)
- Arıdur, R. ve Arabacı, G., 2013. Ciğertaze Otu (*Salvia Officinalis*) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (SAÜ Fen Bil Der)*, 17(2), 241-246.
- Arısoy, K. ve Şener, A., 1994. Katı Faz Ekstraksiyonu. *Ekoloji*, 3(12), 16-20.
- Arkan, T., 2011. *Daphne oleoides* Subsp. *oleoides* ve *Daphne sericea*'nın Farklı Çözücülerle Antioksidan Özellikleri. *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.
- Aydemir, B. ve Karadağ Sarı, E., 2009. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2), 56-60.
- Aydın, H., 2011. Bazı Baharatların Farklı Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Aydos, T.R., 2011. Hoşgörülle Gelen Felaket: Bitkisel Ürün-İlaç Etkileşmeleri. *Türk Farmakoloji Derneği Klinik Farmakoloji Çalışma Grubu E-Bülteni*, Sayı: 54 (Aralık, 2011).
- Bahtiyarca Bağdat, R., 2006. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları, Tıbbi Adaçayı (*Salvia Officinalis L.*) ve Ülkemizde Kekik Adıyla Bilinen Türlerin Yetiştirme Teknikleri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(1-2), 19-28.
- Baladura, E. ve Şimşek, B., 2013. Doğal Antioksidanlar ve Süt ve Süt Ürünlerinde Kullanımı. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(2), 155-162.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-industrial by Products: Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Bakış, Y., Babaç, M.T. ve Uslu, E., 2011. "Updates and Improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)" In Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), 2011 6th International Symposium on(pp. 136-140). <http://www.tubives.com> (Erişim Tarihi: 23.12.2015).

- Başer, K.H.C., 2010. Tıbbi ve Aromatik Bitkisel Ürünlerin Üretimi ve Kalite Kontrolü, *Anadolu Üniversitesi Yayınları*, 38-63 s, Eskişehir.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, İ., 2010. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimine Arttırılması Olanakları. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ankara.
- Bektaş, E., 2011. *Cotinus coggygia* (Scop.) Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Benli, M. ve Yiğit, N., 2005. Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8), 1-8.
- Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N. ve Elmas, E., 2013. Sinop’da Yetişen Bazı Bitkilerin Metanolik Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3(1), 10-16.
- Bilal, T., Keser, O. ve Abaş, İ., 2008. Esans Yağların Hayvan Beslemede Kullanılması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 5(1), 41-50.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Burt, S.A. ve Reinders, R.D. 2003. Antibacterial Activity of Selected Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* O157 :H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162-167.
- Büyüktuncel, E., 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 209-242.
- Camel, V., 2000. Microwave-assisted Solvent Extraction of Environmental Samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.
- Cellat, K., 2011. Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Ekstrakte Edilmesi ve İçeriklerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI), 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. M7- A7.
- Coşkun, T., 2005. Fonksiyonel Besinlerin Sağlığımız Üzerine Etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48, 69-84.
- Cujic, N., Savikin, K., Jancovic, T., Pljevljakusic, D., Zdunic, G. ve İbric, S., 2015. Optimization of Polyphenols Extraction from Dried Chokeberry Using Maceration as Traditional Technique. *Food Chemistry*, 194, 135-142.
- Çalışkan, O. ve Polat, A. A., 2012. Bazı İncir Çeşitlerinin Fitokimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49(2), 201-207.

- Çapanoğlu, E. ve Boyacıoğlu, D., 2009. Meyve ve Sebzelerin Flavonoid İçeriği Üzerine İşlemenin Etkisi. *Akademik Gıda*, 7(6), 41-46.
- Çelik, E. ve Yuvalı Çelik, G., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 1-6.
- Çimen, M.B.Y., 1999. Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.
- Çopuroğlu, Ö., 2013. Niğde Yöresindeki Bazı Endemik Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Yüksek lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde*.
- Dağcı, E.K. ve Dığrak, M., 2005. Bazı Meyve Ekstraktlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(2), 1-7.
- Dağcı, E.K., İzmirli, M. ve Dığrak, M., 2002. Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1), 38-46.
- Dasgupta, A. ve Klein, K., 2014. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, Prevention and Treatment of Disease*. San Diego, Elsevier, eBook ISBN: 9780124059177, 1-40 s.
- de Castro, M.D.L. ve Garcia-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet Extraction of Solid Materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.
- de Castro, M.D.L. ve Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- Demirezer, L.Ö., 2010. Bitkilerin Tıpta Kullanılması Konusunda Sorumluluklarımız. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Zeytinburnu*.
- De Rosa, S., Mitova, M., Handjieva, N., Ersöz, T. ve Çalış, İ., 2003. Aromatic Monoterpenoid Glycosides From *Cruciata taurica*. *Natural Product Research*, 17( 2), 109–113.
- Devi, R.S., Narayan, S., Vani, G. ve Devi, C.S.S., 2007. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* Barc on Diclofenac Sodium Induced Gastric Ulser. *Chemical-Biological Interactions*, 167, 71-83.
- Durusoy, Ç. ve Gözel Ulusal, B., 2007. Dermatolojide Bitkisel Tedavi-Fitoterapi. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 1, 47-50.
- Dülger, B., Uğurlu, E. ve Gücin, F., 2002. *Vitex agnus-castus* L. (Hayıt) 'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 11(45), 1-5.
- Dündar, Y., 2001. Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2, 131-138.

- Dündar, Y. ve Aslan, R., 1999. Bir Antioksidan Olarak Vitamin E. *Genel Tıp Dergisi*, 9(3), 109-116.
- Elgin Cebe, G., Konyalıoğlu, S. ve Zeybek, U., 2012. *Olea europaea* var. *Europaea* (Zeytin) Yaprak İnfüzyonunun Antioksidan Etkisi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 49 (3), 209-212.
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B.I. ve Kubilay, A., 2011. Balıklardan İzole Edilen Bakteriyel Patojenlere Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağlarının Antibakteriyal Aktivitesi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17(Suppl A), 47-54.
- Emori, T. G. ve Gaynes, R. P., 1993. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4), 428-442.
- Er, T., 2011. Kırmızı Pancarın Bazı Fiziksel ve Fitokimyasal Özellikleri Üzerine Farklı Kurutma Sıcaklıklarının Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya*
- Erbaş, M., 2006. Yeni Bir Gıda Grubu Olarak Fonksiyonel Gıdalar. *Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.*
- Erdem, S. ve Ata Eren, P., 2009. Tedavi Amacıyla Kullanılan Bitkiler ve Bitkisel Ürünlerin Yan Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66 (3), 133-141.
- Erdoğan, A. E. ve Everest, A., 2013. Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 27-32.
- Erdoğan, S.F., Özkara, A., Korcan, S.E., Bağcı, Y. ve Dural, H., 2012. *Sartoria hedyaroides* Boiss. & Heldr. Ekstrelerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12, 17-22.
- Erdoğan, Ö., Azırak, S. ve Tosyalı, C., 2004. Antimicrobial Activities of *Hypericum scabrum* L. Extracts. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2), 38-42.
- Eskilsson, C.S. ve Björklund, E., 2000. Analytical-scale Microwave-assisted Extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 277-250.
- Ertaş, M., Kaval, İ., Sadullahoğlu, C., Özdemir, K., Ögün, E., Behçet, L. ve Orhan, E., 2012. Doğu Anadolu Bölgesinde (Van-Hakkari) Tıbbi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 17(2), 104-107.
- Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z., 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12(47), 27-31.

- Ertürk, Ö., Şahin, H., Kolaylı, S. ve Çol Ayvaz, M., 2014. Antioxidant and Antimicrobial Activity of East Black Sea Region Honeys. *Türk Biyokimya Dergisi*, 39 (1), 99–106.
- Fafal Erdoğan, T., 2013. *Ranunculus* Türlerinin Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 33(1), 105-116.
- Farahpour, M. R., Dilmaghanian, A., Faridy, M. ve Karashi, E., 2015. Topical *Moltkia coerulea* Hydroethanolic Extract Accelerates the Repair of Excision Wound in a Rat Model. *Chinese Journal of Traumatology*, doi:10.1016/j.cjtee.2015.08.005.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S., 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları. *EÜFBED - Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 233-265.
- Fleming, A. 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, With Special Reference to Their use In the Isolation of B. Influenzae. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226-236.
- Gani, H., Seyfikli, Z., Çelik, V.K., Akkurt, İ. ve Abadoğlu, Ö., 2000. Kırsal Alandaki Kadınlarda Biomass Maruziyetinin Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Enzim Aktivitelerine Etkisi. *Toraks Dergisi*, 1(1), 13-18.
- Gezmen Karadağ, M., Türközü, D. ve Topağaç Kapucu, D., 2013. Bitkiler ve İlaç Etkileşimleri. *Göztepe Tıp Dergisi*, 28(4), 164-170.
- Gök, V., Kayacıer, A. ve Telli, R., 2006. Hayvansal ve Mikrobiyal Kaynaklı Doğal Antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 35-40.
- Gül, V., 2014. Rize Yöresine Ait Tıbbi ve Aromatik Bitkilere Genel Bir Bakış. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 4(4), 97-107.
- Gülay, Z., 2000. Gram Pozitif Bakterilerde Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *ANKEM Dergisi*, 14(4), 512-521.
- Gülay, Z., 2002. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *Toraks Dergisi*, 3(1), 75-88.
- Güneş, E., Zengin, G., Uysal, A., Aktümsek, A. ve Durak, Y., 2014. *Hyoscyamus reticulatus*'un Hekzan ve Su Özütlelerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Bir Çalışma. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 39, 21-29.
- Gür, D., 1999. Bakteriler İçin Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık Testleri. *ANKEM Dergisi*, 13 (3), 322-324.
- Gürhan, G. ve Ezer, N., 2004. Halk Arasında Hemoroit Tedavisinde Kullanılan Bitkiler-I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 24(1), 37-55.

- Hallaç Türk, F., Aşçı, Ö., Babalık, Z. ve Göktürk Baydar, N., 2009. Kırmızı Üzüm Suyu ile Sirkenin Fenolik Bileşik İçerikleri ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Türkiye 7. Bağcılık Sempozyumu*, Manisa.
- Harput, Ş., 2010. Yeni İlaç Geliştirme Çalışmalarında Tıbbi Bitkiler. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, Zeytinburnu.
- Hussain, T., Arshad, M., Khan, S., Sattar, H. ve Qureshi, M.S. 2011. *In Vitro* Screening of Methanol Plant Extracts for their Antibacterial Activity. *Pak. J. Bot.*, 43(1),531-538.
- Ignat, I., Volf, I. ve Popa, V.I., 2011. A Critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Işık, F. E., 2005. Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. Var. *microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi. *Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Kafkas, E., Kafkas, S., Koch-Dean, M., Schwab, W., Larkov, O., Lavid, N., Bar, E., Ravid, U. ve Lewinsohn, E., 2005. Comparison of Methodologies for the Identification of Aroma Compounds in Strawberry. *Turk J Agric For*, 29, 383-390.
- Karankı, E., 2013. Ülkemizde Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Baharatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde.
- Kaya, A., 2010. Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, Zeytinburnu.
- Kaya, D. ve Ergönül, P. G., 2015. Uçucu Yağları Elde Etme Yöntemleri. *Gıda*, 40 (5), 303-310.
- Kaygusuz, S., 2013. Antibakteriyel Duyarlılık Testlerinde Yorumlama. *EKMUD 2013 Bilimsel Platformu*, Antalya.
- Kelebek, H. ve Canbaş, A., 2010. Hicaz Narı Şirasının Organik Asit Şeker ve Fenol Bileşikleri İçeriği ve Antioksidan Kapasitesi. *GIDA Dergisi*, 35(6), 439-444.
- Khafagi, K. I. ve Dewedar, A., 2000. The Efficiency of Random Versus Ethno-directed Research in the Evaluation of Sinai Medicinal Plants for Bioactive Compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 365–376.
- Kılıç, A., 2008. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13), 37-45.
- Kırat, G., 2009. Görgü (Yeşilyurt - Malatya) Pb – Zn Yatakları ve Çevresindeki Metallerin Bitkilere Yansımaları. *Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ.



- Kırbağ, S. ve Zengin, F., 2006. Elazığ Yöresindeki Bazı Tıbbi Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 16(2), 77-80.
- Koç, L. Y., 2012. Bazı Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal, Antioksidan ve Sitotoksik Etkileriyle, Kanserli Dokularda Adenozin Deaminaz Enzimi Üzerine Etkisi. *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Koyuncu, İ., Yıldırım, İ. ve Duranoğlu, S., 2008. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal Özellikleri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.*
- Kurnaz Karagöz, F. ve Serteser, A., 2014. Suşehri Çevresinin Etnobotanik Açından Değerlendirilmesi. *II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Yalova.*
- Kurt, N., 2008. Yaşa Bağlı Olarak Antioksidan Enzimlerinin Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) Aktivitelerinin ve Malondialdehit (MDA) Seviyesinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.L., Duriez, P., Teissier, E. ve Cotelle, N., 2000. Antioxidant Properties of Di-Tert-Butylhydroxylated Flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9), 900-912.
- Luque-Garcia, J.L. ve Luque de Castro, M.D., 2004. Focused Microwave-Assisted Soxhlet Extraction: Devices and Applications. *Talanta*, 64(3), 571-577.
- Machado T.B., Pinto A.V., Pinto M.C., Leal I.C., Silva M.G., Amaral A.C., Kuster R.M. ve Netto-dos Santos K.R., 2003. In vitro Activity of Brazilian Medicinal Plants, Naturally Occurring Naphthoquinones and their Analogues, Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (3), 279-284.
- Mart, S., 2006. Bahçe ve Hasanbeyli (Osmaniye) Halkının Kullandığı Doğal Bitkilerin Etnobotanik Yönden Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.*
- Mavi A., Terzi Z., Özgen U., Yıldırım A. ve Coşkun M., 2004. Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malvaneglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galiumverum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 702-705.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Breese, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. ve Tauxe, R.V. 1999. Food Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607-625.
- Mert, H. H., Doğan, Y. ve Başlar, S., 1992. Doğal Boya Eldesinde Kullanılan Bazı Bitkiler. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 5, 14-17.

- Metin, H., 2012. *Cyclamen graecum* Link. Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Histolojik Etkilerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli.
- Milardovic, S., Ivekovic, D. ve Grabaric, B.S., 2006. A Novel Amperometric Method for Antioxidant Activity Determination Using DPPH Free Radical. *Bioelectrochemistry*, 68, 175-180.
- Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab F. M. N., Alaghbari, S. A. Z. ve Lindequist, U., 2010. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *eCAM*, 7(3), 323-330.
- Navarro V., Villarreal M.L., Rojas G. ve Lozoya X., 1996. Antimicrobial Evaluation of some Plants Used in Mexican Traditional Medicine of the Treatment of Infectious Diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 53 (3), 143-147.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A. ve Cannatelli, M.A., 2000. Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379-384.
- Oğraşıcı, E., 2010. Ayva Nektarında Biyoaktif Bileşenler ve Antioksidan Aktivitenin Depolamada Değişimi. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M. ve Deniz, İ., 2013. Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 13 (1), 48-59.
- Onbaşılı, D., Altuner, E. M. ve Yuvalı Çelik, G., 2011. *Mnium marginatum* Özülerinin Antimikrobiyal Aktivitesi. *Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi*, 11(2), 205-208.
- Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D. ve Azeri, C., 2007. *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karşılaştırmalı Olarak Belirlenmesi. *Ekoloji*, 16(62), 62-65.
- Ötleş, S. ve Atlı, Y., 1997. Karotenoidlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3(1), 249-254.
- Özacar, M. ve Şengil, İ.A., 1998. Tanin Kimyası ve Teknolojisi. *SAU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1, 79-85.
- Özbek, H., 2005. Cinsel ve Jinekolojik Sorunların Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı. *Van Tıp Dergisi*, 12(2), 170-174.
- Özcan, S., Toprak, G., Torun, C. ve Vural, C., 2008. *Thymus sipyleus* Boiss subsp. *rosulans* (Borbos) J. Jalas'ın Organik Ekstrakt ve Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1(2), 17-22.

- Özgümüş O. B., 2010. Mikroorganizmaların Üretilmesi, Metabolizması, Genetiği ve Antimikrobik Maddeler. *Mikrobiyoloji*, Editör: M. Altunış. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 9-27.
- Pan, X., Niu, G. ve Liu, H., 2003. Microwave-assisted Extraction of Tea Polyphenols and Tea Caffeine from Green Tea Leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42, 129-133.
- Park, S. U., Uddin, M. R., Xu, H., Kim, Y. K. ve Lee, S. Y., 2008. Biotechnological Applications for Rosmarinic Acid Production in Plant. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4959-4965.
- Petrosyan, M., Shcherbakova, Y., Sahakyan, N., Vardanyan, Z., Poladyan, A., Popov, Y. ve Trchounian, A., 2015. *Alkanna orientalis* (L.) Boiss. Plant Isolated Cultures and Antimicrobial Activity of their Extracts: Phenomenon, Dependence on Different Factors and Effects on some Membraneassociated Properties of Bacteria. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 122,727–738.
- Rachid, E.J., Yahia, C., Amal, S., Jamal, M., Hamid, O., Naoual, E. ve Fadoua, M., 2011. Unusual Human Poisoning with *Delphinium peregrinum*. *Clinical Toxicology*,49, 949–950.
- Rai, A., Mohanty, B. ve Bharga, R., 2015. Modeling and Response Surface Analysis of Supercritical Extraction of Watermelon Seed Oil Using Carbon Dioxide. *Separation and Purification Technology*, 141, 354-365.
- Rai, A., Mohanty, B. ve Bhargava, R., 2016. Supercritical Extraction of Sunflower Oil: A Central Composite Design for Extraction Variables. *Food Chemistry*, 192, 647-659.
- Rai, A., Punase, K.D., Mohanty, B. ve Bhargava, R., 2014. Evaluation of Models for Supercritical Fluid Extraction. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 72, 274-287.
- Ramezani, M., Fazli-Bazzaz, B.S., Saghafi-Khadem, F. ve Dabaghian, A., 2004. Antimicrobial activity of four *Artemisia* species of Iran. *Fitoterapia*. 75, 201-203.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. ve Zhang, L., 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519-534.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G., 1996. Structure Antioxidant Activity Relationships of Favonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rifai, S., Fassouane, A., El-Abbouyi, A., Wardani, A., Kijjoa, A. ve Van Soest, R., 2005. Screening of Antimicrobial Activity of Marine Sponge Extracts. *Journal de Mycologie Médicale*, 15, 33–38.
- Robards, K. ve Antalovich, M., 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. *A review Analyst*, 122, 11-34.

- Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P. ve Zakaria, Z., 1997. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Soil Using Soxhlet Extraction, Pressurised and Atmospheric Microwave-assisted Extraction, Supercritical Fluid Extraction and Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Chromatography A*, 791, 361-366.
- Sadeghi-Aliabadi, H., Sajjadi, S. İ. ve Khodamoradi, M., 2009. Cytotoxicity of *Euphorbia macroclada* on MDA-MB-468 Breast Cancer Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 103-108.
- Shahidi, F. ve Zhong, Y., 2015. Measurement of Antioxidant Activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Sharma, O.P. ve Bhat, T.K., 2009. DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shokri, H., Sharifzadeh, A. ve Tamai, A., 2012. Anti-*Candida zeylanoides* Activity of some Iranian Plants Used in Traditional Medicine. *Journal de Mycologie Médicale*, 22, 211-216.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. J., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology Viticulture*, 16,144-58.
- Sıcak, Y., Çolak, Ö.F., İlhan, V., Sevindik, E. ve Alkan, N., 2013. Köyceğiz Yöresinde Halk Arasında Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkiler. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(2), 70-77.
- Sutay Kocabaş, D., Tur, E. ve Kocabaş, A., 2015. Bazı Yerli Elma Çeşitlerinin Fitokimyasal Analizi ve Elma Ağacı Yapraklarının Ksilanaz Üretiminde Değerlendirilmesi. *Gıda*, 40(5), 271-278.
- Sümerkan, B., 2009. Gram Pozitif Bakterilerde Yorumlu Antibiyogram. *ANKEM Dergisi*, 23(Ek 2), 182-187. 24. *Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi*, Fethiye.
- Şahin, M. F.,2009. Bazı Süs Bitkisi Ekstraksiyonlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitelerinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Tokbaş, H., 2009. Karadut Meyvesinin (*Morus nigra L.*) Reçel İle Marmelata İşlenmesi ve Ürünlerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Topal, Y., 2013. *Alchemilla L.* (Rosaceae) Cinsine Ait Bazı Türlerin Fenolik Bileşiklerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bingöl.

- Toroğlu, S. ve enet, M., 2006. Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 12-20.
- Tosun, G., Özcan, D., Oban, S., Koç, H., Semerci, B.D. ve Bozan, B., 2006. Üzüm Polifenollerinin Ekstraksiyonu 1- Ekstraksiyon Çözücüsünün Polifenol Verimi ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkileri. *Yedinci Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, Eskişehir.
- Töreci, K., 1995. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinde Standardizasyon. *ANKEM Dergisi*, 9(3), 209-216.
- Tulunoğlu, Ö., 1999. Serbest Radikaller-Antioksidanlar ve Diş hekimliğindeki Rollerini. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 16(1), 43-50.
- Tunanat, F., 1999. Anaerop Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Testleri. *ANKEM Dergisi*, 13 (3), 325-331.
- Turhan, S. ve Üstün, N.ř., 2006. Doğal Antioksidanlar ve Gıdalarda Kullanımları. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu.
- Tuttu, G., 2014. ankırı–Korubaşı Tepe ve Civarının Tıbbi ve Aromatik Bitkileri. *II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*, Yalova.
- Tuzlacı, E. ve Doğan, A., 2010. Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical Journal*, 14, 136-143.
- Uzun, M.B., Aykaç, G. ve Özçelikay, G., 2014. Bitkisel Ürünlerin Yanlış Kullanımı ve Zararları. *Lokman Hekim Dergisi*, 4(3), 1-5.
- Uzunhan, S., 2013. *Heliotropium hirsutissimum*'dan Elde Edilen Farklı Ekstrelerin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Aydın.
- Van Boxtel, C.J., 2007. Antimikrobiyal Maddeler. *İlaç Yararları ve Riskleri Farmakolojiye Giriş*. Türkiye Eczacılar Birliği Yayınları, Ankara, 83-115.
- Wu, J., Lin, L. ve Chau, F., 2001. Ultrasound-assisted Extraction of Ginseng Saponins from Ginseng Roots and Cultured Ginseng Cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(4), 347-352.
- Wu, L., Hu, M., Li, Z., Song, Y., Yu, C., Zhang, H., Yu, A., Ma, Q. ve Wang, Z., 2015. Dynamic Microwave-assisted Extraction Combined with Continuous-flow Microextraction for Determination of Pesticides in Vegetables. *Food Chemistry*, 192, 596-602.

- Yaman, C. ve Coşge Şenkal, B., 2014. Türkiye Florasında Yayılış Gösteren *Alkanna* Taksonları ve Önemi. *II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*, Yalova.
- Yarsan, E., 1998. Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9(1-2), 89-95.
- Yavuz, O. ve Aksoy, A., 2006. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269.
- Yıldırım, Y., 2010. Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 7(2), 117-129.
- Yılmaz, B. ve Usta, C., 2010. Nar'ın (*Punica granatum*) Terapötik Etkileri. *Türk Aile Hek Derg*, 14(3), 146-153.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(7), 35-49.
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E. ve Özgen, U., 2009. Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 39(1-2), 7-11.

## EKLER

### EK A

#### Çalışmada Kullanılan Bitkiler



şekil Ek A. 1 *Alkanna orientalis* (Tosbağa Otu) bitkisi



şekil Ek A. 2 *Anchusa officinalis* (Sığır Dili) bitkisi



Şekil Ek A. 3 *Crucjata taurica* bitkisi



Şekil Ek A. 4 *Delphinium peregrinum* (Hezaren Saray Çiçeği) bitkisi





Şekil Ek A. 5 *Euphorbia macroclada* (Sütleğen) bitkisi



Şekil Ek A. 6 *Moltkia coerulea* (Anadolu Taşkesen Otu) bitkisi



Şekil Ek A. 7 *Myosotis ramosissima* (Unutma Beni Çiçeği) bitkisi



Şekil Ek A. 8 *Ranunculus argyraeus* (Düğün Çiçeği) bitkisi



Şekil Ek A. 9 *Veronica multifida* (Mine Çiçeği) bitkisi

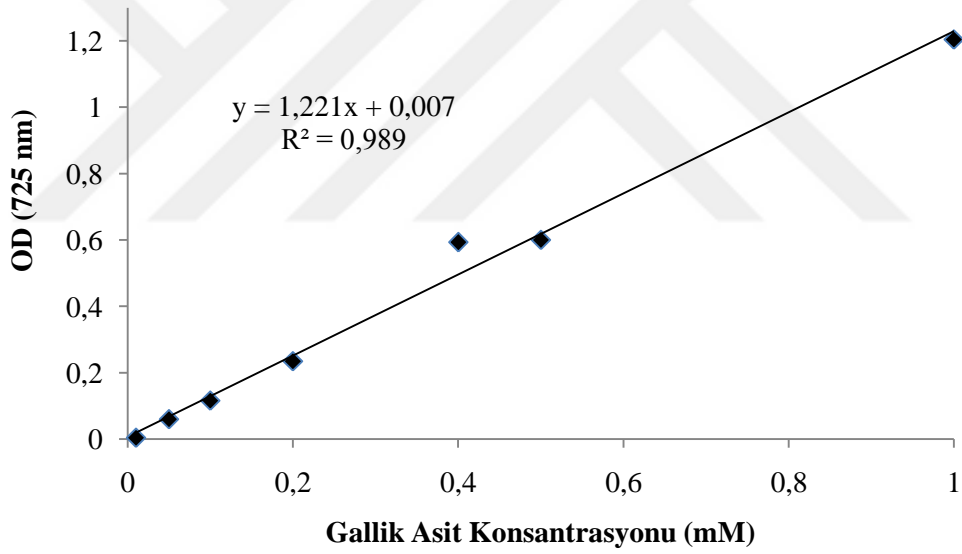


Şekil Ek A. 10 *Vicia canescens* ssp. *gregaria* (Fiğ) bitkisi

## EK B

### TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ İÇİN GALLİK ASİT STANDARTI

Standart olarak kullanılan gallik asit 0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlarda saf su içinde hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µL standartlardan (0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5- 1 mM) koyulup üzerine 20 µL Folin reaktifi (2N) eklenerek pipetajlama ile karıştırıldı ve 3 dk karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından üzerine 20 µL %35 'lik sodyum karbonat ve 140 µL dH<sub>2</sub>O eklenerek 10 dk karanlık ortamda bekletildi. 725 nm'de kör tüpe karşı absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon eğrisi ve denklem elde edildi.



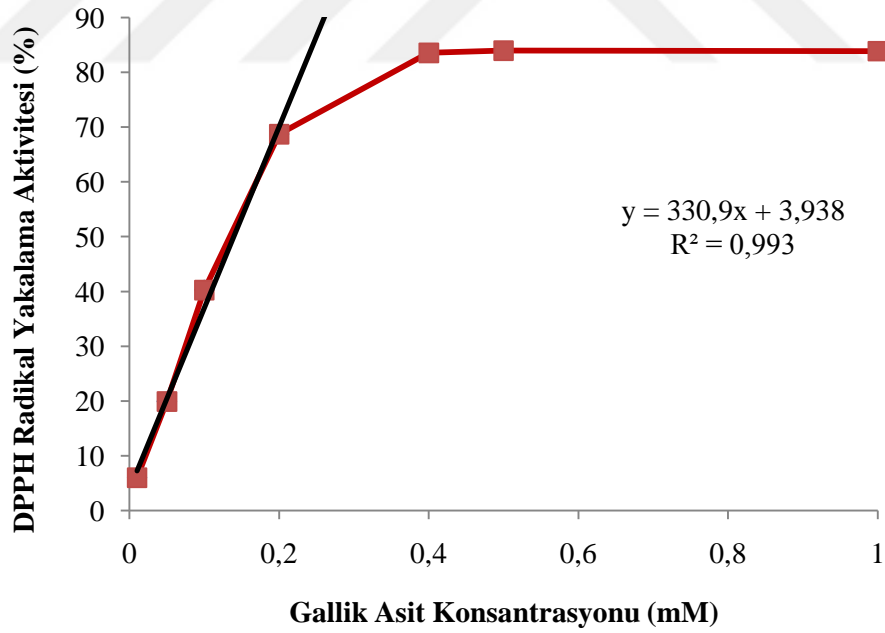
Şekil Ek B. 1 Toplam Fenolik Madde Miktarı İçin Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

## EK C

### DPPH İÇİN GALLİK ASİT STANDARTI

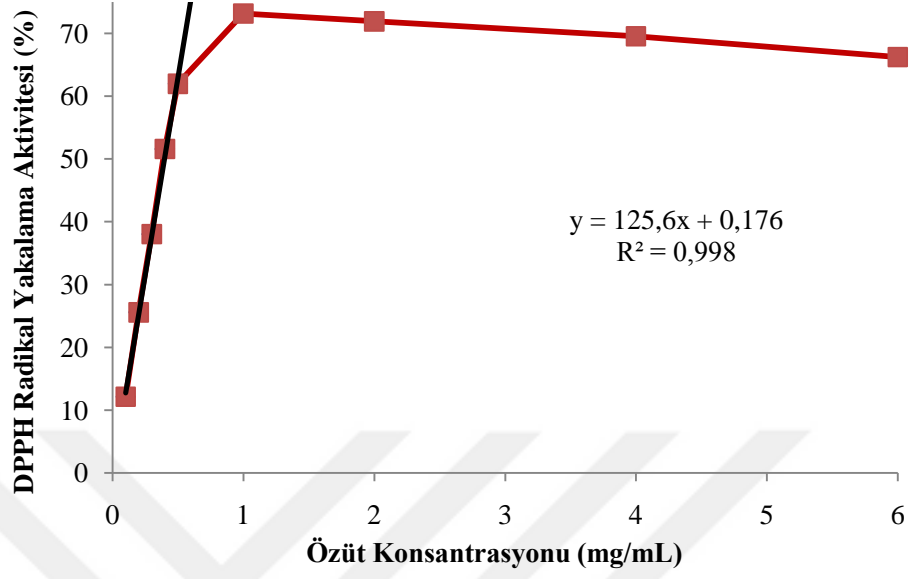
Standart olarak kullanılan gallik asit 0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlarda saf su içinde hazırlandı. Her kuyucuğa 20 µL standartlardan (0,01- 0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,5- 1 mM) koyulup üzerine 180 µL DPPH (metanol içerisinde 0,06 mM) eklenerek 60 dk karanlık ortamda bekletildi. 517 nm’de kör tüpe karşı absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans değerleri kullanılarak DPPH inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı. Elde edilen inhibisyon verileri gallik asit konsantrasyonuna göre grafiğe geçirildi ve elde edilen grafik denklemini kullanılarak EC<sub>50</sub> değeri hesaplandı. Her bir örnek 3 tekrarla test edildi. Standart hatalar Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Radikal yakalama aktivitesi (\%)} = 100 \times \frac{\text{DPPH'in absorbans değeri} - \text{Ekstrenin absorbans değeri}}{\text{DPPH'in absorbans değeri}}$$



Şekil Ek C. 1 DPPH İçin Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

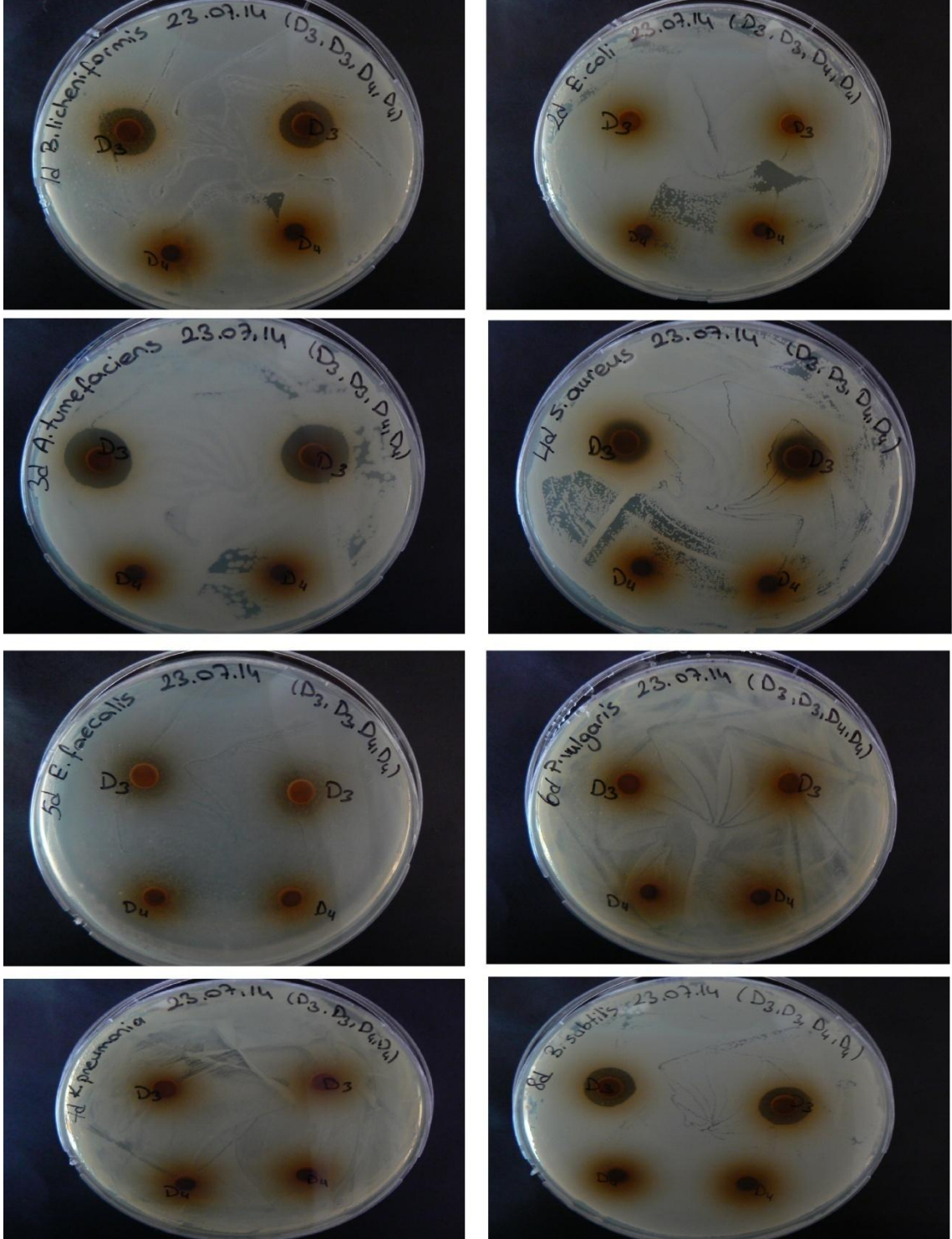
**EK D**  
**EC<sub>50</sub> DEĞERİ HESAPLAMA ÖRNEĞİ**



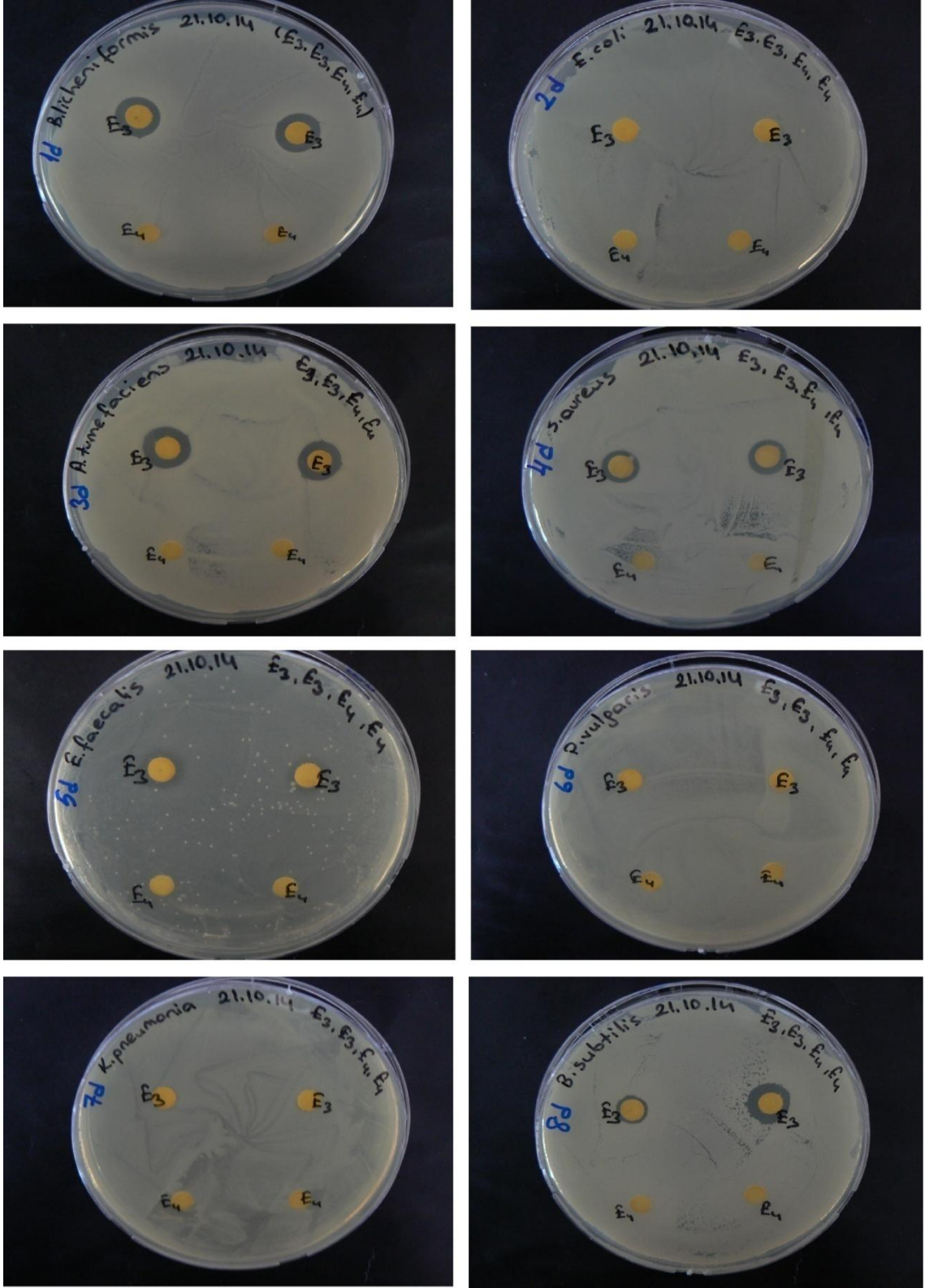
**Şekil Ek D. 1** *Cruciata taurica* bitkisi için % inhibisyon grafiği

## EK E

### *Alkanna orientalis* Bitkisinin Su ve Hekzan Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi



**Şekil Ek E. 1** *Alkanna orientalis* bitkisinin su ekstresinin sekiz test mikroorganizmasına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite (D1:*Ranunculus argyraeus* (su), D2:*Vicia canescens* ssp. *gregaria* (su), D3:*Alkanna orientalis* (su), D4:*Anchusa officinalis* (su))



**Şekil Ek E. 2** *Alkanna orientalis* bitkisinin hekzan ekstresinin sekiz test mikroorganizmasına karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite (E1: *Ranunculus argyraeus* (hekzan), E2: *Vicia canescens* ssp. *gregaria* (hekzan), E3: *Alkanna orientalis* (hekzan), E4: *Anchusa officinalis* (hekzan))



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ümmühan ÜNLÜ  
Doğum Tarihi ve Yer : 1986, Çardak  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 03382262192 (2782)  
e-mail : ummuhanunlu@kmu.edu.tr

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
<b>Yüksek Lisans</b>	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı	
<b>Lisans</b>	Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik	2006
<b>Lise</b>	Çardak Çok Programlı Lise	2002

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
<b>2006</b>	Er-pa Özel Denizli Sağlık Hastanesi	Hemşire
<b>2006-2012</b>	Afyon Kocatepe Üniversitesi Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi	Hemşire
<b>2012- Halen</b>	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Yaşlı Bakım Programı	Öğretim Görevlisi

**Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar:**

1. Yıldız, K., Yılmaz, Ö., **Ünlü, Ü.** ve Sezer, M., 2012. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Yaşlı Bakım Programı Öğrencilerinin Algılanan Aile Desteği ve Sosyal Sorumluluk Faaliyetlerine Katılım Düzeylerinin İncelenmesi. *Ulusal Meslek Yüksekokulları Çalıştayı ve Öğrenci Sempozyumu – UMÇÖS 2012*, 13- 15 Haziran 2012 Ürgüp- Nevşehir.
2. Yıldız, K., Yılmaz, Ö., **Ünlü, Ü.** ve Sezer, M., 2012. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Yaşlı Bakım Programı ve Çocuk Gelişimi Programı Öğrencilerinin Bütünleme Sınavları Öncesi Anksiyete Düzeyleri ve Sınav Başarılarının İncelenmesi. *Eyfor III. Eğitim Yönetimi Forumu*, 12- 13 Ekim 2012 Nevşehir. Bildiri Kitabı s. 456-460.
3. Yıldız K., **Ünlü Ü.** ve Sezer M., 2013. Mülteci-Sığınmacı Cinnetleri ve Toplum " Her İnsanın Huzur İçinde, Kendi Evinde, Sevdiği İnsanların İçinde ve Vatanında Ölme Hakkı Vardır!", *Önleyici Güvenlik Araştırmaları Sempozyumu*, 26-28 Eylül 2013 Karaman. *KMÜ Sosyal ve Ekonomik Araştırmalar Dergisi*, 16 (Özel Sayı I), 42-50, 2014.
4. **Ünlü, Ü.** ve Kocabaş, A., 2015. Antimicrobial activities of plant extracts from Karaman Province. *2nd Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-2)*. 22 – 25 Nisan 2015 Antalya. Abstract Book p. 453.