

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI *HERACLEUM L.* (UMBELLIFERAE)
TAKSONLARINDA UÇUCU YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

SEMİHA HACIOĞLU

ŞUBAT 2006

ÖZET

BAZI *HERACLEUM* L. (UMBELLIFERAE) TAKSONLARINDA UÇUCU YAĞLARIN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

HACIOĞLU, Semiha

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Ergin HAMZAOĞLU

ŞUBAT 2006

Son kayıtlara göre Türkiye 'de 9222 bitki türü yetişmektedir ve bunlardan bir kısmı tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır. *Heracleum* L. (Umbelliferae) cinsinin dünyada 700'den fazla türü bulunmaktadır. Cins Türkiye'de toplam 22 takson ile (17 tür) temsil edilir ve bunlardan 7 tanesi endemiktir. Bu çalışmada, Türkiye *Heracleum* cinsine ait 5 endemik taksonun yapraklarından uçucu yağlar elde edilmiş ve bunların antimikrobiyal aktiviteleri enfeksiyon oluşturan *Shigella* sp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* ATCC11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida albicans* ATCC 8459581 gibi bakteri ve funguslara karşı denenmiştir. **Anahtar kelimeler:** *Heracleum*, Umbelliferae, antimikrobiyal etki, uçucu yağlar

ABSTRACT

AN EXAMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENCIAL OILS IN SOME *HERACLEUM* L. (UMBELLIFERAE) TAXONS

HACIOĞLU, Semiha

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU

FEBRUARY 2006

According to recent records, there are 9222 species of plants growing in Turkey, and some of them are used as medical plants. There are more than 700 kinds of *Heracleum* L. (Umbelliferae) species in the world. This species is represented by 22 taxons (17 kinds) in Turkey, and 7 of them are endemic taxons. In this study, essential oils were extracted from the leaves of 5 endemic taxons, and their antimicrobial activities were tested against such bacteria and fungus as *Shigella* sp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* ATCC11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida albicans* ATCC 8459581.

Key Words: *Heracleum*, Umbelliferae, antimicrobial effect, essential oils

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda bana yol gösteren ve araőtırmalarımın baőlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen tez yöneticim Doç. Dr. Sayın Ergin HAMZAOĞLU'na, özellikle uçucu yağların temininde gerekli malzeme ve laboratuvarları kullanımıma sunan Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Görevlisi Arif İPEK'e, çalıőmalarım sırasında bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen Doç. Dr. Sayın Aysun ERGENE'ye, tezimdaki çevirilere yardım eden filolog Sayın Erol ERSOY'a, bitkilerin teminini sağlayan Doç. Dr. Sayın Ahmet DURAN'a, arkadaőım Sinem YILDIRIM'a ve tez çalıőmalarım süresince her konuda maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.9.1.1. Artvin, Murgul, Şavval Tepe'den
Heracleum sphondylium subsp. *artvinense*'ye
ait genel bir görünüm..... 22
- Şekil 1.9.1.2. Artvin, Murgul, Şavval Tepe'de
Heracleum sphondylium subsp. *artvinense*'nin
yakından görünümü..... 23
- Şekil 1.9.2.1. Çankırı, Ilgaz Dağı'ndan
Heracleum paphlagonicum'a ait
genel bir görünüm..... 25
- Şekil 1.9.2.2. Çankırı, Ilgaz Dağı'nda
Heracleum paphlagonicum'un
yakından görünümü..... 26
- Şekil 1.9.3.1. Karabük, Keltepe'den
Heracleum pastinicipodium subsp. *incanum*'a
ait genel bir görünüm..... 28
- Şekil 1.9.3.2. Karabük, Keltepe'de
Heracleum pastinicipodium subsp. *incanum*'un
yakından görünümü..... 29
- Şekil 1.9.5.1. Niğde, Bolkar Dağı'ndan
Heracleum pastinaca'ya
ait genel bir görünüm..... 32

Şekil 1.9.5.2. Niğde, Bolkar Dağı'nda

Heracleum pastinaca'nın

yakından görünümü..... 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Uçucu yağların elde edildiği bitkisel materyaller ve kullanılan kısım.....	50
Çizelge 3.1. <i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>artvinense</i> ' nin uçucu yağının antimikrobiyal etkisi	52
Çizelge 3.2. <i>Heracleum paphlagonicum</i> 'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi.....	53
Çizelge 3.3. <i>Heracleum pastinacifolium</i> subsp. <i>incanum</i> 'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi	54
Çizelge 3.4. <i>Heracleum argaeum</i> ' un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi.....	55
Çizelge 3.5. <i>Heracleum pastinaca</i> ' nın uçucu yağının antimikrobiyal etkisi.....	56

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Uçucu Yağlar	2
1.2. Uçucu Yağların Özellikleri	3
1.3. Uçucu Yağların Sınıflandırılması	6
1.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması.....	6
1.3.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırması	7
1.3.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması	7
1.4. Bitkisel Materyalin İşlenmesi.....	9
1.4.1. Bitkisel Materyalin Toplanması	9
1.4.2. Bitkisel Materyalin Kurutulması	10
1.4.2.1. Güneşte Kurutma	10
1.4.2.2. Gölgede Kurutma.....	10
1.4.2.3. Saklama	10
1.5. Uçucu Yağların Bitkilerde Bulunduğu Kısımlar	11
1.6. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri	12

1.6.1. Distilasyon Yöntemi	12
1.6.1.1. Su Distilasyonu (Hidrodistilasyon)	13
1.6.1.2. Buhar Distilasyonu	13
1.6.2. Mekanik Yöntem	
(Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Eldesi)	14
1.6.3. Anfloranj (Ekstraksiyon)Yöntemi	15
1.6.3.1. Soğuk Suyla Ekstraksiyon	16
1.6.3.2. Sıcak Suyla Ekstraksiyon	16
1.6.3.3. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon	17
1.6.4. Tüketme Yöntemi (Organik Çözücülerle)	18
1.7. Umbelliferae Familyasının Taksonomik Özellikleri	18
1.8. Umbelliferae Familyasının Biyolojisi ve Kimyası	19
1.9. Çalışmada Kullanılan <i>Heracleum</i> L. Taksonları	20
1.9.1. <i>Heracleum sphondylium</i> L.	
subsp. <i>artvinense</i> (Manden.) P.H.Davis	20
1.9.2. <i>Heracleum paphlogonicum</i> Czechtz	23
1.9.3. <i>Heracleum pastinacifolium</i> K.Koch	
subsp. <i>incanum</i> (Boiss. & Huet) P.H.Davis	26
1.9.4. <i>Heracleum argaeum</i> Boiss. & Balansa	29
1.9.5. <i>Heracleum pastinaca</i> Fenzl	30
1.10. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerin	
Belirlenmesi ve Kullanılan Yöntemler	33
1.11. Test Mikroorganizmalarının Genel Özellikleri.....	41
1.11.1. <i>Shigella</i> sp.	41

1.11.2. <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	42
1.11.3. <i>Escherichia coli</i>	42
1.11.4. <i>Enterococcus faecalis</i>	44
1.11.5. <i>Streptococcus pyogenes</i>	44
1.11.6. <i>Candida krusei</i>	46
1.11.7. <i>Candida albicans</i>	47
2. MATERYAL VE YÖNTEM	48
2.1. Materyal	48
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	48
2.2. Yöntem	48
2.2.1. Mikroorganizmalar	48
2.2.2. Üreme Ortamlarının Hazırlanması	48
2.2.3. <i>Heracleum</i> Örnekleri	49
2.2.4. Uçucu Yağların Elde Edilmesi	49
2.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	51
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
3.1. <i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>artvinense</i> ' nin Antimikrobiyal Etkisi	52
3.2. <i>Heracleum paphlagonicum</i> ' un Antimikrobiyal Etkisi	53
3.3. <i>Heracleum pastinacifolium</i> subsp. <i>incanum</i> ' un Antimikrobiyal Etkisi	54
3.4. <i>Heracleum argaeum</i> ' un Antimikrobiyal Etkisi	55

3.5. <i>Heracleum pastinaca</i> 'nın Antimikrobiyal Etkisi	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR	61

1. GİRİŞ

Dünyada yaklaşık son 20 yıldır doğal ürünlerin tüketimi sürekli artmaktadır. Doğal florada bulunan ve binlerce yıllık deneyim sonucu belirlenen tıbbi bitkiler insan sağlığına hizmet etmektedir.

Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en seçkin ilaç kaynaklarıdır. Büyük farmasötik firmalar, yeni lider yapılar için bir kaynak olarak yüksek yapılı bitkilere ilgi göstermektedirler. Son zamanlardaki çalışmalar bu bitkilere ait ekstraktların biyolojik aktiviteleri üzerinde yoğunlaşmıştır^(1,2,3.).

Birçok doğal bitkinin, antimikrobiyal maddeleri veya bunların ana maddelerini sentezleme özelliğine sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. İlaç, gıda, parfüm ve kozmetik gibi birçok sanayi dalında, kullanılan hammadde olmaları nedeniyle doğal bitkiler ve onlara ait uçucu yağlar, özellikle 1940 yılından bugüne kadar antimikrobiyal etkileri açısından çok sayıda araştırma alanında ele alınmış ve önemli sonuçlara ulaşılmıştır.

Uçucu yağlar, açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile kolayca buharlaşabildiklerinden bu adı alırlar ve güzel kokulu olduklarından “esans” gibi isimlerle de anılırlar. Esans olarak isimlendirilmelerinin nedeni kozmetik sanayinde parfüm yapımında kullanılmalarıdır.

Aromatik bitkiler ilk uygarlıklardan beri bilinen ve önemini hiç kaybetmemiş olan faydalı bitki gruplarındandır. Bu bitkiler, hoşça giden koku ve lezzete sahip olmalarından dolayı birçok alanda kullanılmaktadır. Araştırmaya konu olan *Heracleum* taksonları Umbelliferae familyasının bir üyesi olup aromatik bitkilerdendir⁽⁴⁾.

Uçucu yağ üretiminin yılda 45000 ton olduğu tahmin edilmektedir. Yıllık üretimi 500 tonun üzerindeki 15 uçucu yağ toplam üretimin % 90'ına tekabül etmektedir. Uçucu yağ üretiminin % 65'i odunsu bitkilerden yani ağaç ve çalılardan elde edilmektedir. Dünya çapında ticareti yapılan yaklaşık 300 uçucu yağ çeşidinin yarısı tarım bitkilerinden, diğer yarısı ise yabancı bitkilerden elde edilmektedir⁽⁵⁾.

Bu çalışmada, Türkiye Umbelliferae familyası *Heracleum* L. cinsine ait *Heracleum sphondylium* L. subsp. *artvinense* (Manden.) P.H.Davis, *Heracleum paphlagonicum* Czecczott, *Heracleum pastinacifolium* K.Koch subsp. *incanum* (Boiss. & Huet) P.H.Davis, *Heracleum argaeum* Boiss. & Balansa ve *Heracleum pastinaca* Fenzl taksonlarında yaprakta bulunan uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

1.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden veya bitkisel ekstraktlardan elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, bazen donabilen, uçucu, kuvvetli kokulu, su buharı ile sürüklenebilen yağimsı karışımlardır. Daha çok koku özelliklerinden

yararlanılan uçucu yağlar, aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye de sahiptirler⁽⁶⁾.

Uçucu yağ, katı ya da sıvı değişik birçok kimyasal bileşiğin birbirinde çözünerek homojen bir çözelti oluşturduğu kompleks bir karışımdır. Kimyasal ve fiziksel özellikleri açısından sabit yağlardan farklı özelliklere sahiptirler. Açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden 'uçucu yağ', 'eterik yağ' veya 'esans' adını alırlar. Güzel kokulu olmaları ve parfüm sanayinde kullanılmaları nedeniyle önemli bir ekonomik değer taşırlar.

Genellikle yurdumuzda yerli olarak elde edilenlere 'yağ' (defne yağı, kekik yağı, gül yağı vs.), yurt dışından ithal edilenlere ise 'esans' (limon esansı, lavanta esansı vs.) denilmektedir. Buna karşılık ithal edildiği halde yağ olarak isimlendirilenler de vardır (tarçın yağı, karanfil yağı vs.). Bunlar su ile karışmadıklarından ve su yüzeyinde tabaka oluşturduklarından 'yağ' diye adlandırılırlar^(6,7).

Bugün doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık üçte biri uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağ taşıyan bitkiler daha çok tropik ve subtropik bölgeler ile ılıman bölgelerin sıcak kısımlarında yetişirler. Soğuk bölgelerde aromatik bitki sayısı oldukça azdır. Ülkemizin büyük bir kısmını da içine alan Akdeniz bitki coğrafyası bölgesi uçucu yağ taşıyan bitkiler açısından en zengin floralardan biridir. Uçucu yağ içeren bitkilere pek çok familya da rastlanmaktadır. Bunlardan Pinaceae, Labiatae, Umbelliferae,

Myrtaceae, Compositae, Rosaceae, Rutaceae, Iridaceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Piperaceae ve Brassicaceae en önemlileridir^(6,7,8).

1.2. Uçucu Yağların Özellikleri

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan su veya su buharı distilasyonu ile elde edilen, kendilerine has koku, tat, renk ve görünüşe sahip karışımlardır. Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar ve açıkta bırakıldıklarında kolaylıkla buharlaşma özelliğine sahiptirler.

Uçucu yağlar taze iken genellikle renksiz veya açık sarı renklidir. Ancak karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar değişik renkte olanları da vardır. Uzun süre saklamada, ışık ve oksijenin etkisi ile oksitlenerek bazıları koyulaşır ve reçineleşebilir. Bu durumda genellikle bir koku değişimi ve yağın kalitesinin azalışı söz konusu olur. Bu nedenle yağlar serin bir yerde ve ışıktan korunmak için koyu renkli şişelerde saklanmalıdırlar^(6,7,8).

Uçucu yağların çoğu sudan hafiftir ve suyla karışmadıklarından suyun üzerinde toplanırlar. Ancak bileşimindeki oksijenli bileşiklerin bir kısmı suda çözünür. Bu özelliklerine dayanarak aromatik sular hazırlanabilmektedir.

Uçucu yağlar koruyucu ajanlardır ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözünmesini sağlarlar, yani çözücüdürler.

Böcekleri kaçırma ya da çekme görevleri olduğunu savunanlar da vardır. Böcekleri kaçırıcı etkide olanlar bitkinin özellikle yaprak ve çiçeklerinin korunmasına yardımcı olurken, böcekleri çekici etkide olanları ise tozlaşmaya yardımcı olur.

Uçucu yağlar petrol eteri, hekzan, eter gibi organik çözücülerin çoğunda çözünürler. Uçucu yağların belli derecedeki etanol de çözünürlük oranı saflık kontrolünde yardımcı olmaktadır. Uçucu yağların kalitesi genellikle yoğunluk, kırılma indisi ve optik çevirme gibi fizikokimyasal özelliklerle belirlenir.

Fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine benzerler. Kırılma indisleri yüksektir. Optikçe aktiftirler ve polarize ışığı spesifik olarak çevirmeleri tanınmalarına yarayan önemli özelliklerinden birisidir. Kırılma indisinde polarize ışığı çevirmede meydana gelen değişmeler, yağın saflığının bozulduğunu gösterir. Uçucu yağlardan elde edilen bazı maddelerin doğal ya da yapay yolla elde edilip-edilmediğini polarize ışığı çevirme şekillerinden saptamak mümkündür.

Uçucu yağlar kuvvetli bir kokuya ve tada sahiptirler. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağa kendine özgü koku ve tat verir. Bu oksijenli türevler alkol, keton, ester, aldehit, oksit, eter ve bunlara benzer yapılarda bulunabilirler^(6,7).

Uçucu yağları tanımak için kesitlerde Sudan III boyası kullanılır. Bu boya sabit ve uçucu yağlara turuncu bir renk verir. Kesitler bir süre

ısıtıldığında ya da sulu etanol ile yıkandığında yağ damlacıkları kaybolursa uçucu yağ, kaybolmazsa sabit yağ olduğu anlaşılır.

Bunların sabit yağlarla önemli farklılıkları bulunmaktadır. Uçucu yağlar su buharı ile sürüklenebilmekte, süzgeç kağıdı üzerinde leke bırakmamaktadırlar. Sabit yağlar ise, su buharında sürüklenmezler ve süzgeç kağıdı üzerinde kalıcı leke bırakırlar. Yine uçucu yağ asidi-gliserol esteri yapısında olmadıklarından zamanla acılaşmazlar. Ancak ışık ve hava karşısında zamanla oksitlenir ve reçineleşirler. Sulu etanolde çözünebilme özelliği, bu yağları sabit yağlardan ayıran diğer bir farklılıktır.

Uçucu yağlar, bitkilerin başta çiçek ve yaprakları olmak üzere herhangi bir organında (kabuk, kök, odun, meyve, tohum vs.) bulunabilir. Bazen bitkinin bütün dokularında, bazen de sadece özel organ ve dokularında meydana gelirler. Uçucu yağlar bitkinin bağlı olduğu familyaya göre belirli bir oranda salgı tüylerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve salgı ceplerinde bulunurlar. Bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmayan bu maddelerin ne amaçla oluştuğu tam olarak bilinmemekle birlikte, bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları ve yaralanmalara karşı oluşan reçineyi çözebilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir.

1.3. Uçucu Yağların Sınıflandırılması

1.3.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağların çok karmaşık bir kimyasal yapıya sahip oldukları ve bileşimlerinde hidrokarbonlar, alkoller, asitler, esterler, aldehitler, ketonlar ve fenoller gibi çeşitli bileşikler bulundurdukları bilinmektedir. Söz konusu kimyasal maddelere göre çeşitli sınıflamalar yapılmaktadır. Uçucu yağ bileşikleri başlıca 4 grupta toplanmıştır;

- a) Terpenik maddeler
- b) Aromatik maddeler
- c) Düz zincirli hidrokarbonlar
- d) Azot ve kükürt taşıyan bileşikler

Bu 4 grup maddeden terpenik ve aromatik olanlar uçucu yağların ana bileşiklerini teşkil ederler. Düz zincirli hidrokarbonlardan kokulu olanlar ve etken maddeyi oluşturanlar çok azdır. Azot ve kükürt taşıyan uçucu yağlar ise, bitkilerde bir heterozitin yapısında yer almaktadır.

Terpenler $(C_5H_8)_n$ formülüne uyan hidrokarbonlardır. Uçucu yağların yapısında bulunan 2000'den fazla kimyasal bileşiğin %90'ı terpenik maddelerden oluşur. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağın kendisine özgü kokusunu, tadını ve terapötik özelliğini verir. Uçucu yağlarda asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevlerdir. Bu

nedenle droglar sınıflandırılırken uçucu yağlarda bulunan oksijenli bileşikler esas alınır^(6,9). Oksijensiz olanları genellikle kolay uçucudurlar ve oldukça düşük derecelerde soğutulsalar bile sıvı halde kalırlar. Oksijenli türevler ise daha az uçucudurlar ve soğutulduğu zaman birçoğu çöker. Bu özellikleri ile oksijensiz bileşiklerden az veya çok ayrılabilirler. Uçucu yağların soğutulunca çöken kısmına 'stearopten', bu koşullarda sıvı kalan kısmına ise 'elaopten' adı verilir. Etken maddeler uçucu yağların genellikle stearopten kısmında bulunmaktadır⁽⁷⁾.

1.3.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre de grublandırılır;

1. Aromatika (çok kokulu ve tadı iyi olanlar)
2. Aromatika-aroma (kokulu ve tadı acı olanlar)
3. Aromatika-akria (kokulu ve tadı keskin olanlar)

1.3.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar, farmakolojik etkilerine göre;

1. Uyarıcı, deriyi kızartan, antiromatizmal
2. Balgam söktürücü, öksürük kesici
3. İdrar söktürücü
4. Gaz giderici, safra söktürücü
5. Solucan düşürücü
6. İltihap azaltıcı

7. Dezenfektan, antiseptik ve antibiyotik olarak kullanılırlar.

Kendilerine has renk, koku, tat ve görünüme sahip uçucu yağlarda terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri yanında organik asitler (sinnamik asit, asetik asit), alkoller (benzil alkol, sinnamik alkol), fenoller (timol, kavikol), ketonlar (karvon, kafur), aldehitler (benzaldehit, sinnamik aldehit), esterler (benzil benzoat, bornil asetat), fenol esteri (anetol, safrol) ve diğer bileşikler (kumarin vs.) bulunmaktadır^(6,8,9). Uçucu yağların birçoğu toksik etki göstererek mukozayı tahriş eder veya sinir sistemini uyuştururlar.

Uçucu yağlar bitkide biyolojik bir olaya katılmaz, bitkinin yararsız metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynar. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözünmesini sağlarlar. Ayrıca böcekleri kaçıрма ya da çekme gibi görevleri de vardır.

Uçucu yağlar birden fazla maddeden oluştuğundan, aynı uçucu yağın değişik amaçlarla kullanılması doğaldır. Günümüzde uçucu yağlar yerine, daha çok içindeki terpenik veya aromatik etken maddeler ilaç olarak kullanılmaktadır⁽⁷⁾.

1.4. Bitkisel Materyalin İşlenmesi

Tıbbi bitkilerin drog olarak kullanılan kısımlarının (yaprak, çiçek, tohum, kök vs.) içerdikleri etkili bileşikler nedeniyle hastalıklara iyi geldiği bilinmektedir. Bitkilerdeki etkili bileşikler; belirli hayat devirlerinde yapılmakta ve miktarları belirli bir zamanda en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Droğun etkili bileşik bakımından, mümkün olduğu kadar zengin olması istendiği için drog etkili maddenin en yüksek olduğu dönemde elde edilmelidir. Bu da drog için özel toplama, kurutma, saklama şekli ve zamanı bulunduğunu gösterir⁽¹⁰⁾.

1.4.1. Bitkisel Materyalin Toplanması

Materyal elle veya makas gibi küçük aletler kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca elle toplama sırasında bitkinin ertesi yıl tekrar ürün vermesi için kökleme yapılmamalıdır. Uçucu yağlar sıcak hava ve güneşte buharlaşarak kaybolurlar .Bu nedenle uçucu yağ alınacak çiçek ve yapraklar genellikle erken saatlerde toplanır. Örneğin; güller sabahleyin ve iyice açmış halde iken, karanfiller 2-3 saat güneşte bekletildikten sonra toplanır. Yapraklar bitki çiçek açmaya başladığı zaman, çiçekler tamamen açılmadan önce veya tomurcuk halinde, toprak altı kısımları bitkinin toprak üstü kısımları kuruduktan sonra, kabuklar bitki yapraklarını döktükten sonra, meyve ve tohumlar ise özel kayıt yoksa olgunlaştıktan sonra toplanırlar^(1,6,10).

1.4.2. Bitkisel Materyalin Kurutulması

Bitkisel materyali bozulmadan saklamanın en kolay yolu kurutmaktır. Kurutma sonunda bitki ağırlığının yaklaşık %75'ini kaybeder. Bu nedenle, kurutma materyalin taşınması ve depolanması yönünden de yararlıdır⁽¹¹⁾.

1.4.2.1. Güneşte Kurutma

Güneşe dayanıklı bitkisel materyalin doğrudan güneşe serilerek kurutulmasıdır. Çiçekler için uygulanmaz, çünkü güneş çiçeklerin rengini kaybetmesine ve soluk renkli bir drog elde edilmesine neden olur⁽¹¹⁾.

1.4.2.2. Gölgede Kurutma

Materyalin üzeri kapalı ve yanları açık çardak, sundurma veya hangarlar içinde kurutulması yöntemidir. Burada materyal doğrudan güneş ile karşılaşmadan açık havada kurutulmuş olur. Materyal demetler halinde asılır veya ince tabaka halinde yere ya da raflara serilerek küflenmeyi önlemek için sık sık alt üst edilir. Yaprak ve çiçek gibi suyunu kolaylıkla kaybeden materyaller bu yöntem ile iyi şekilde kurutulur. Ülkemizde en çok kullanılan yöntemdir.

1.4.2.3. Saklama

Saklama sırasında rutubet, sıcaklık ve ışık droğun bozulmasına sebep olan etmenlerdir. Bu etmenlerin tesirini önlemek için genel olarak drogların

serin, kuru ve karanlık bir yerde saklanması gerekir. Drog kese kağıdı, bez torba, mukavva kutu, teneke kutu veya cam kavanoz içinde saklanmalıdır. Plastik kutular muhafaza için uygun değildir ve kısa sürede küflenmeye neden olurlar⁽¹¹⁾.

1.5. Uçucu Yağların Bitkilerde Bulunduğu Kısımlar

Uçucu yağlar bitkilerde ve bitkinin ait olduğu familyaya göre belirli bir organda; salgı tüyünde, salgı cebinde, salgı kanalında veya salgı hücrelerinde toplanır. Epiderma veya parankima dokusu içeren bitkilerde de uçucu yağ mevcuttur. Başta *Labiatae* olmak üzere, *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Rosaceae*, *Compositae*, *Lauraceae* ve *Pinaceae* familyaları uçucu yağ içeren bitkiler yönünden zengindir⁽¹²⁾. Salgı cepleri salgılama yapan parankimatik hücrelerin çoğalması, sonra birbirinden ayrılması (şizogen) ya da hücrelerin birbirine bakan çeperlerin erimesi (lizigen) yolu ile oluşan boşluklardır. Salgı ceplerinin oluşumunda bazen her iki olay ardı ardına ve birlikte görülür. Salgı kanalları, salgı ceplerinden farklı olarak bir kanal şeklinde uzanmakta ve aralarında anastomozlar (eklenti kanalları) oluşturabilmektedirler⁽¹³⁾. Salgı hücreleri ise parankima dokusu içinde bulunurlar ve meydana getirdikleri uçucu yağları kendi içlerinde saklarlar. Salgı hücrelerinde uçucu yağ, tüyün baş kısmını meydana getiren hücreler tarafından oluşturulur ve bu hücrelerle kutikula arasında toplanır. Uçucu yağların biyolojik olaylara karışmadığı bilinmektedir. Bu yağların belki de bitkinin yararsız metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Koruyucu ajanlarla ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözülmesini

sağlarlar. Bu görüşlerin yanı sıra, uçucu yağların yaydıkları kokular sayesinde böcekleri çekerek tozlaşmaya yardımcı oldukları veya bunun aksine etki göstererek zararlı böcekleri bitkiden uzaklaştırdıkları ve bitkiyi korumada yardımcı oldukları bilinmektedir⁽¹⁴⁾.

1.6. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri

1.6.1. Distilasyon Yöntemi

Ucuz ve kolay bir yöntemdir. Uçucu yağı kolaylıkla veren bitkiler için uygulanır. Çiçek veya yapraklar sıcak su ya da su buharı ile muamele edilirler. Sıcak su veya su buharı ile bitki dokularına etki edilerek bütün uçucu maddeler difüzyon yoluyla buharlaştırılır. Daha sonra bu uçucu yağlar soğutucuda yoğunlaştırılarak bir kapta toplanır.

Genellikle çiçekler doğrudan, yapraklar hafif ufalandıktan sonra, kök ise küçük parçalara ayrıldıktan sonra distile edilirler. Bitkiler çok ince toz haline getirilmemelidir. Portakal çiçeği, gül, lavanta, anason, karanfil, nane, kekik ve adaçayı gibi bitkilerde bu yöntem uygulanır. Distilasyon işlemi sırasında kullanılan cihazlar 4 farklı kısımdan oluşur⁽⁹⁾;

1. İmbik (Distilasyon kazanı)
2. Bağlayıcı boru
3. Soğutucular
4. Toplama (Florentin kabı)

Distilasyon ile uçucu yağ eldesinde farklı uygulamalar mümkündür.

1.6.1.1. Su Distilasyonu (Hidrodistilasyon)

Uçucu yağ eldesinde bilinen en eski yöntemdir. Kuru ve kaynatılmakla bozulmayan materyalden uçucu yağ suyla distilasyon yoluyla elde edilir. Materyal distilasyon aygıtına yerleştirilir ve su ile kaynatılır. Oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaşıp Florentin kabında yoğunluğuna göre suyun üstünde veya altında birikir. Laboratuvar ölçekli uçucu yağ miktar tayini için de bu yöntem kullanılır. Endüstriyel uygulama için gül yağı üretimi örnek verilebilir⁽¹⁵⁾.

1.6.1.2. Buhar Distilasyonu

Bu yöntemle daha iyi kalitede esans elde edilir. Bitki materyali kaynar suyla değil, su buharı ile temas ettirilir. Modern uçucu yağ distilasyon sistemlerinde drog delikli tava veya sepetlere yerleştirilir. Buhar kazanında üretilen ve drog üzerine gönderilen su buharı yağı sürükleyerek soğutucuya gönderir. Sıvılaştıran su-yağ karışımı toplama kapında yoğunluk farkından dolayı iki tabakaya ayrılır ve uçucu yağ elde edilmiş olur. Bu yöntemle 'Buhar Distilasyonu'denir.

Suyun, distilasyon kazanının alt kısmındaki ayrı bir bölmede kaynatılması ve oluşan buharın delikli ızgaranın üstündeki drog tabakasına gönderilmesi halinde yöntemle 'Su-Buhar Distilasyonu'adı verilir⁽¹⁵⁾.

Hangi distilasyon yöntemi olursa olsun distilat 'Florentin kabı' adı verilen bir toplama kabında toplanır. Uçucu yağların çoğu sudan hafiftir ve suyla karışmadığından suyun üstünde toplanır. Suyun fazlası ya toplama kabının dibinden çıkan ve yukarı doğru yükselen bir boru yardımıyla dışarı atılır, ya da ayrı bir kaptan toplanır. Üstte biriken uçucu yağ ise üst yandaki musluktan alınır. Böylece miktarı az olan uçucu yağı küçük hacimli bir kaptan toplama ve olabilecek muhtemel kayıpları önleme olanağı bulunmuş olur⁽¹⁶⁾.

1.6.2. Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Eldesi)

Bazı droglardan distilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmek istendiğinde droglardaki uçucu yağ bozulmaktadır. Bu nedenle bu tip drogların bir kısmından mekanik yöntemle yağ elde edilmektedir. Bu yolla genel olarak meyve suları ile turunçgillerden eterik yağ elde edilir. Bu yağların elde edilmesi için narenciye kabuklarının yağ içeren hücreleri patlatılır ve açığa çıkan yağ suyla yıkanarak kabuktan ayrılır. Ayrılan yağ-su emulsiyonun santrifüj edilmesiyle narenciye esansı elde edilir.

Mekanik yöntemle elde edilen usareler genel olarak berrak değildir.

Berraklaştırmak için;

1. Bulanıklık çeşitli partiküllerden ileri geliyorsa usare uygun bir filtreden süzülür. Partiküller çok küçük ise süzme yeterli olmaz. Bu durumda santrifüj yapılır.

2. Bulanıklığın sebebi fermantasyon ise, zamanla jelleşme görülür. Bu durumda çözeltiye hacminin yarısı kadar alkol ilave edilerek bir süre bekletilir.

3. Çözeltiyeye bitkisel albüminler geçmişse, bunlar da bulanıklığa sebebiyet verirler. Bu durumda ısıtma yapılır. Albüminler ısıyla denatüre olarak çöker. Çökerken varsa diğey partikülleride beraberinde sürüklerler.

4. Çöktürme yumurta akı ile de yapılabilir. Bu amaç için, usare bir miktar yumurta akı ile çalkalanır. Sonra ısıtılarak çökme ve buna bağılı olarak berraklaşma sağlanır.

Narenciye usare ve uçucu yağlarının üretimi için günümüzde 2 tip ekstraktör kullanılmaktadır. "FMC in Line" adı verilen ekstraktörde meyvenin alt ve üst kısımları kesilir. Üzerinde delikleri olan bir boru meyvenin içine usareyi almak üzere yerleşirken üstten dışa doğru inen bıçaklar kabukları dilimleyerek ayırır. Bu esnada salgı ceplerinin parçalanmasıyla açığa çıkan uçucu yağ etraftan püskürtülen su ile emülsiyon yaparak dış kanaldan sürüklenir. İç borudan alınan usare iç kanaldan ilerler. Böylece usarede kabuktan gelebilecek istenmeyen acı lezzet önlenmiş olur.

"Polisitrus" adı verilen ekstraktörde ise meyveler helezon şeklinde ve rendelerle kaplı boru içinde ilerlerken perikarptaki salgı cepleri patlar ve uçucu yağ su ile sürüklenerek toplanır. Her iki şekilde de elde edilen uçucu yağ-su emülsiyonu santrifüjler yardımıyla ayrılır. Sadece misket limonunda sıkma işleminden sonra buhar distilasyonu da uygulanır. Sıkma yoluyla elde edilen narenciye esansları soğutulduklarında kumarin türevi maddelerden ibaret bir çökelti vermektedirler⁽¹⁵⁾.

1.6.3. Anfloranj (Ekstraksiyon) Yöntemi

Bu yöntem uçucu yağı az, ancak kıymetli droglar için kullanılmaktadır. Bazı bitkilerin esansları su buharının yüksek ısıyla bozulabilir ve bazı bitkilerin uçucu yağı çok az olduğundan esanslarını distilasyonla çıkarmak güçtür. Bu gibi hallerde ekstraksiyon metodu uygulanır. Bu metotta esanslar bazı çözücüler yardımıyla bitkiden alınır. Daha sonra çözücüye geçen esans distilasyon yoluyla çözücünden ayrılır. Bu metot 3 şekilde uygulanabilir:

1.6.3.1. Soğuk Suyla Ekstraksiyon

Bu metot yasemin ve çuha çiçeği gibi bitkilerde uygulanır. Eritici olarak iç yağ ve domuz yağı kullanılmaktadır. Taze materyal (özellikle çiçekler) ince bir yağ sürülmüş cam plakalar üzerine konulur. Birkaç saat veya gün sonra konulan çiçeğin uçucu yağını alan cam plaket üzerine sürülmüş yağdan alkol ekstraksiyonu ile uçucu yağ elde edilir. Çok ekonomik olmayan, itina isteyen bu yöntem bugün özellikle Güney Fransa'da yasemin çiçeklerinden yağ elde etmede kullanılır. Bu yöntem ancak parfümeride çok önemli olan, fakat drogtaki oranı düşük olan uçucu yağların elde edilmesinde ekonomik olabilmektedir⁽¹⁶⁾.

1.6.3.2. Sıcak Suyla Ekstraksiyon

Bu metotta kullanılan eritici yağlar sıcaktır. Bazı materyaller toplandıktan kısa bir süre sonra canlılıklarını kaybederler. Az zaman alan bir yöntemdir.

Yasemin ve uha çiçeği dışındaki hemen bütün çiçekler bu metotla esanslarını verebilirler. Günümüz teknolojisinde bu metot yerini uçucu eriticilerle ekstraksiyona bırakmıştır. Fakat özellikle Fransız gülü ve bazen de portakal çiçeği, mimoza ve sümböl için halen bu metot uygulanmaktadır.

Eritici olarak kullanılacak yağlar porselen veya emaye kaplı varillere konur. Variller içi su dolu daha büyük kapların içine yerleştirilerek su ile 40-50°C'ye kadar ısıtılır. Materyal tülbentler içinde yağa daldırılır. 12-48 saat bekletilir. Bazı hallerde doğrudan doğruya iç yağı içine katılarak sopalarla ezilmek suretiyle karıştırılır. Daha sonra iç yağı filtre presle süzölerek içindeki eski materyal ayrılır, yenisi atılır. Bu işlem 10-20 kere tekrar edilerek iyice kokulu bir yağ elde edilir. Bu metotta kullanılacak yağlar, rafine renksiz ve kokusuz olmalıdır. Genel olarak eritilmiş koyun ve sığır böbrek yağları, domuz yağı en iyi netice verir. Fakat zeytinyağı, bademyağı, vazelin, parafin ve gliserinde kullanılır. Yağlardaki esansları ayırmak için alkolle karıştırarak iyice dövölürler, yağdaki esans alkole geçmiş olur.

1.6.3.3. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon

Genel bir ekstraksiyon yöntemidir. CO₂ gibi sıvılaştırılmış gazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Saf CO₂'in sıvı ve gaz fazda aynı anda bulunabileceği en yüksek sıcaklık ve basınç kritik sıcaklık ve basınçtır. Bu nokta dışında gaz sıkıştırılarak sıvılaştırılmaz. CO₂'in kritik noktası 73 kg/cm² basınç ve 31°C' dir. CO₂ inert olduğu ve toksik olmadığı için tercih edilir. İşlem sıvılaştırılmış gazın kritik noktasının civarında yüksek basınçlı

ekstraksiyon kabında sirkülasyonu ile gerçekleştirilir. Çözücü gaz ekstreden basıncın değiştirilmesiyle buharlaştırılarak tamamen uzaklaştırılır. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak tekrar kullanılabilir. Elde edilen ürün diğer metotlarla elde edilenlerin aksine, çözücü artığı taşımadığından tercih edilmektedir. Aynı zamanda seçici bir yöntemdir⁽¹⁵⁾.

1.6.4. Tüketme Yöntemi (Organik Çözücülerle)

Drog uygun bir organik çözücüyle (hekzan, heotan vs. gibi) ekstre edilir. Bu esnada uçucu yağ, sabit yağ, mum, boya maddeleri v.s. gibi organik çözücüde çözünebilen maddeler organik çözücüye geçer. Süzülerek alınan organik çözücü vakumda tamamen uçurulur. Sabit yağları ve mumları da taşıyan bu renkli maddeye, eğer taze materyalden hareket edilmişse 'konkret', kurutulmuş materyalden hareket edilmişse 'rezinoit' adı verilmektedir. Elde edilen konkret ya da rezinoit, uçucu yağ yanında kokulu olmayan maddeleri de taşımaktadır. Uçucu yağ etanol ya da sulu etanol ile tüketilir. -15 °C de bir süre, genellikle bir gece bekletilir, çöken kısımları soğukta süzöldükten sonra çözücü vakumda uçurularak uçucu yağ elde edilir. Bu yöntemle elde edilen uçucu yağa 'absolü' adı verilmektedir.

1.7. Umbelliferae Familyasının Taksonomik Özellikleri

Tek veya çok yıllık nadiren çalimsı bitkilerdir. Yapraklar genellikle almaşlı, nadiren karşılıklı veya halka şeklinde dizilmiş, genellikle stipulsuz,

basit veya çok parçalı; sap sıklıkla genişlemiş ve tabanda kın yapmıştır. Çiçek durumu genellikle birleşik umbel, nadiren basit umbel, baş şeklinde veya indirgenmiş simozdur. Brakte ve brakteoller var veya yoktur. Çiçekler alt durumlu (epigin), hermafrodit, tek eşeyli veya nadiren iki evciklidir. Sepaller yok veya küçüktür, genellikle eşit değildir. Petaller 5 adet, genellikle tepede iki parçalı ve geriye kıvrılmıştır, eşit boyda veya dıştakiler, içtekilerden daha uzundur (radiant); beyaz, sarı, sarımsı yeşil, açık mavi veya pembe renklere olabilir. Stamenler 5 adet. Ovaryum 2, nadiren 1 karpelli, her gözde birer ovullü, stilus 2, genellikle tabanında stilopodyum denilen şişkin bir bölüm bulunur. Meyve şizokarp, 2 nadiren tek karpelli, karpeller silindirik veya yandan ya da sırttan basık, karpellere genellikle birleşik veya karpafor denilen bir sapla ayrılmıştır. Olgunlukta merikarplar ayrılır. Her merikarp genellikle 5 birincil (kosta), bazen aralarda 4 adet ikincil çıkıntı görülür. Çıkıntılar bazen kanatlı veya dalgalı olabilir. Çıkıntılar arasında girintiler (valekulum) bulunur. Salgı kanalları (vittae) genellikle mevcuttur.

Umbelliferae familyasında ayırt edici olarak kullanılan taksonomik karakterler şunlardır; gövdenin alt kısmında kalan fibrilli kalıntılar, yaprak boyutları, yaprak tabanında bulunan kın, yaprakların parçalanma şekilleri, umbellerin sayısı ve uzunluğu, brakte ve brakteollerin şekli ve bulunup bulunmadıkları, çiçek rengi, meyve şekli, üzerindeki çıkıntı (kosta) ve girintiler ve salgı kanalları ⁽¹⁷⁾.

1.8. Umbelliferae Familyasının Biyolojisi ve Kimyası

Umbelliferae (Apiaceae), çok sayıda bitki türüne ve geniş yayılış alanına sahip bir familyadır. Karakteristik çiçek durumu ve meyveleri sayesinde ilk sınıflandırılması yapılan bitki gruplarından. Bu familya üzerinde dünyanın çeşitli bölgelerinde bir çok laboratuvarında araştırmalar artan bir biçimde devam etmekte, elektron mikroskoplarında morfoloji ve anatomi çalışmalarından, sitoloji ve bitki kimyası alanlarına kadar çok geniş bir yelpazede araştırmalar sürmektedir. Bu familya seconder metabolitler bakımından oldukça zengindir. Bir çok cinsinden kumarin, flavanoit, asetilenik bileşikler ve uçucu yağlar elde edilmekte ve bu bileşiklerden tıbbi ve ekonomik açıdan geniş ölçüde yararlanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda Umbelliferae familyasına ait uçucu yağlarda 760 adet farklı bileşen bildirilmiştir⁽¹⁹⁾.

Tıbbi amaçlarla kullanılan bitkilerin sayısı hayli yüksektir ve genellikle gıda olarak kullanılanlardan farklıdırlar. Umbelliferae familyasının bir çok türü bu gruba dahil olmaktadır. Bu familyadaki tıbbi bitkiler genellikle gastrointestinal bölgedeki rahatsızlıkların giderilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin; *Foeniculum vulgare* Mill. (Rezene) mide rahatsızlıklarında ve gaz söktürücü olarak, *Ferula* sp. (Çakşır) türleri kabızlığa ve öksürüğe karşı, *Cuminum cyminum* L. (Kimyon) ishale karşı, ve *Pimpinella anisum* L. (Anason) iltihaplara karşı kullanılmaktadır^(18,19)

Bazı bitkilerin yağları gıda tatlandırıcısı olarak kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; *Anethum graveolens* L. (Dereotu), *Daucus carota* L. (Havuç),

Heracleum persicum Desf. (Baldırgan) ve *Pimpinella anisum* (Anason) verilebilir. Ayrıca, *Pimpinella anisum* ve *Heracleum sphondylium* gibi birkaç tür de alkollü içkilerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.

1.9. Çalışmada Kullanılan *Heracleum* L. Taksonlar

1.9.1. *Heracleum sphondylium* L. subsp. *artvinense* (Manden.) P.H.Davis

Çok yıllık, aromatik, tabanda yaprak sapı kalıntıları bulunur. Gövde dik, 50-90 cm boyunda, 7-13 mm çapında, derin kanallı, alt yoğun tüylü, üst seyrek tüylü. Alt yapraklar 5-7-loblu ve loblar ayanın 1/3-1/2' si kadar derin; aya genişçe yumurtamsı ile neredeyse yuvarlak, 10-28 x 10-27 cm, çift renkli, alt yüzeyi üstten daha yoğun tüylü; sap kın dahil 12-25 cm uzunluğunda, kırmızımsı-yeşil, tüylü (Şekil 1.9.1.1). Alt yaprakların en alt lobları yumurtamsı ile genişçe yumurtamsı, dişli, ucu sivri ile incesivri. Orta gövde yaprakları 3-7-loblu, yumurtamsı-mızraksı kınlı; kın 4-7 cm uzunlukta, hemen hemen genişlemiş, derin kanallı, parçasız, kırmızımsı-yeşil, alt yoğun tüylü, ucu yırtıksız. Çiçek durumu kanallı, yeşil, seyrek ile hemen hemen yoğun tüylü. Brakteler 0-6, şeritsi, 3-8 x 0.7-1 mm, dökülücü, yoğun tüylü. Işınlar 10-25, eşit değil, meyvede 6-14 cm uzunlukta, seyrek ile yoğun tüylü. Brakteoller 5-7, şeritsi, 5-8 x 0.5-1 mm, kalıcı. Çiçek sapları 10-25, eşit değil, meyvede 1.3-2.6 cm uzunlukta, seyrek ile yoğun kısa tüylü. Çiçekler beyaz, dıştaki bazıları radiant, dışı seyrek tüylü. Ovaryum yoğun kısa tüylü, stil tüysüz. Meyve ters yumurtamsı ile genişçe ters yumurtamsı şekilde, 9-11 x 7-9 mm, hafifçe çentikli, hemen hemen tüysüz ile özellikle uçta kısa tüylü; kanat 0.8-1

mm genişlikte; sırt yağ mahfazası ipliksi-çubuksu, 0.3-0.5 mm genişlikte, hemen hemen eşit, meyve boyunun 3/7-4/7' si kadar uzunlukta; karın yağ mahfazası 2, hemen hemen çubuksu, 0.4-0.7 mm genişlikte, meyve boyunun 1/3-3/7' si uzunlukta (Şekil 1.9.1.2).



Şekil 1.9.1.1. Artvin, Murgul, Şavval Tepe'den *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*'ye ait genel bir görünüm



Şekil 1.9.1.2. Artvin, Murgul, Şavval Tepe'de *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*'nin yakından görünümü

1.9.2. *Heracleum paphlagonicum* Czechtz

Çok yıllık, aromatik bir bitkidir. Gövde dik, 110-220 cm uzunluğunda, 15-40 mm çapında, derin kanallı, üstte seyrek, altta yoğun hemen hemen sert tüylü. Alt yapraklar tüysü parçalı, 5-7 yaprakçıklı; aya paralel-yumurtamsı, 40-100 x 25-70 cm, hafifçe çift renkli, üstte seyrek kısa tüylü, özellikle damarlar üstünde, altta daha yoğun tüylü; yaprak sapı kın dâhil 30-80 cm uzunluğunda, kırmızımsı-yeşil, siyahımsı benekli, tüysüz veya seyrek tüylüdür (Şekil 1.9.2.1). Alt yaprakların en alt yaprakçıkları yumurtamsı veya paralel-yumurtamsı; aya 10-18 x 7-12 cm, 5-7 loblu, loblar ayanın 1/3-3/4' ü

derinlikte, dişli, ucu uzunsivri ila sivri; yaprakçıkların sapı 3-6 cm uzunluğunda. Loblar genişçe yumurtamsı ila paralel-yumurtamsı. Orta gövde yaprakları tüysü parçalı; 3-5 yaprakçıklı, yumurtamsı veya paralel-yumurtamsı kınılı; kın 6-12 cm uzunluğunda, parçasız, yeşil veya kırmızımsı-yeşil, alt yoğun tüylü, genişçe yırtık. Çiçek durumu oluklu, grimsi-yeşil. Brakteler çok sayıda, şeritsi-iplik şeklinde, 12-25 x 0.9-1.5 mm, hemen hemen dökölücü. Işınlar 25-50, eşit değil, meyvede 8-18 cm uzunluğunda, seyrek ila yoğun pürtüklü tüylü. Brakteoller çok sayıda, şeritsi ila şeritsi-mızraksı şeklinde, 5-12 x 0.6-1 mm, kalıcı, kenarları silli. Çiçek sapları 25-45, eşit değil, meyvede 1.3-3 cm uzunluğunda. Çiçekler beyaz; dıştakiler radiant, dış yüzeyleri tüysüz. Ovaryum yoğun salgı tüylü, stil tüysüz. Meyveler eliptik ilâ eliptik-ters yumurtamsı, 10-12 x 5-7 mm, küt uçlu, kenarlarda geriye kıvrık, basık, pürtüklü tüylü, ortada seyrek salgı tüylü; kanat 0.8-1 mm genişliğinde; sırt yağ mahfazası ipliksi-çubuksu şeklinde, 0.6-0.8 mm genişliğinde, hemen hemen eşit, meyvenin 2/3-3/4' ü uzunluğunda; karın yağ mahfazası 2, paralel-çomaksı, 0.7-1 mm genişliğinde, meyvenin 1/2-4/7 uzunluğunda (şekil 1.9.2.2).



Şekil 1.9.2.1. Çankırı, Ilgaz Dağı'ndan *Heracleum paphlagicum*'a ait genel bir görünüm



Şekil 1.9.2.2. Çankırı, Ilgaz Dağı'nda *Heracleum paphlagonicum*'un yakından görünümü

1.9.3. *Heracleum pastinacifolium* K.Koch subsp. *İncanum*

(Boiss. & Huet) P.H.Davis

Çok yıllık, hafif aromatik bir bitkidir, tabanda yaprak sapı kalıntıları bulunur. Gövde dik, 40-80 cm uzunluğunda, 4-7 mm çapında, hafif kanallı, seyrek ila yoğun tüylü. Alt yapraklar 1-2-tüysü parçalı, 5-9 yaprakçıklı; aya üçgensel ila paralel-üçgensel, 12-32 x 8-25 cm, tek renkli, üst ve alt yüzey seyrek tüylü; yaprak sapı kın dâhil 15-31 cm uzunluğunda, yeşilimsi, seyrek tüylü (Şekil 1.9.3.1). Alt yaprakların en alt yaprakçıkları, genişçe yumurtamsı ila neredeyse küremsi veya nadiren paralel-yumurtamsı, 1-tüysü parçalı, 3 parçalı veya 2-3-tüysü loblu, loblar ayanın 1/2-9/10' una uzanır; aya 2.5-10 x

2.5-9 cm, kenarı dişli-oyuklu, ucu sivri, yaprakçıkların sapı 1.5-12 cm uzunluğunda; yaprakçıklar genişçe yumurtamsı ile hemen hemen küremsi veya nadiren genişçe ters yumurtamsı biçimindedir. Loblar yumurtamsı ile paralel-yumurtamsı veya yuvarlak. Orta gövde yaprakları 1-2-tüysü, genişçe yumurtamsı ile hemen hemen küremsi kınılıdır; kın 3-5 cm uzunluğunda, yassılaştırmış, parçasız, altı seyrek tüylü, genişçe yırtıklı. Çiçekler durumu kanallı, yeşilimsi, seyrek tüylü. Brakteler 0-6, mızraksı ile yumurtamsı, 2.5-9 x 1-2.5 mm, dökülücü, seyrek tüylü. Işınlar 10-20, eşit değil, meyvede 3-9 cm uzunluğunda, seyrek ile yoğun tüylüdür. Brakteoller dökülücü, 2-8, şeritsi-mızraksı şeklindedir. Çiçek sapları 9-26, eşit değil, meyvede 0.5-1.2 cm uzunluğunda, seyrek ile yoğun tüylüdür. Çiçekler beyaz, dıştakiler hemen hemen radiant, dış yüzey tüysüz. Ovaryum seyrek tüylü; stil tüysüz. Meyveler genişçe paralel-eliptik veya yumurtamsı-yuvarlak biçimde, 5-10 x 4-7 mm, küt uçlu; kanat 0.4-0.8 mm genişliğinde; sırt yağ mahfazası çomak ile paralel-çomak biçiminde, 0.4-0.8 mm genişliğinde, neredeyse eşit, meyvenin 3/7-4/7' si uzunluğunda; karın yağ mahfazası yok (Şekil 1.9.3.2).



Şekil 1.9.3.1. Karabük, Keltepe'den *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum*'a ait genel bir görünüm



Şekil 1.9.3.2. Karabük, Keltepe’de *Heracleum pastinicipodium* subsp. *incanum*'un yakından görünümü

1.9.4. *Heracleum argaeum* Boiss. & Balansa

Çok yıllık, hafif aromatik bir bitkidir. Gövdesi dik, 30-80 cm uzunluğunda, 4-10 mm çapında, damarlı ve tüylüdür; tabanda lifli yaprak sapı kalıntıları bulunur. Alt yaprakları tüysü veya üç parçalı, 3-5 yaprakçıklı; aya genişçe yumurtamsı ilâ üçgensî-paralel şeklindedir. 9-35 x 6-33 cm boyutlarında, hafifçe çift renkli, üst taraf seyrek, alt taraf gri sık tüylüdür. Yaprak sapı, kın dahil 10-26 cm uzunluğunda, yeşilimsi ilâ kahverengimsi, seyrek ve ince tüylüdür. Alt yaprakların yanal lobları yumurtamsı veya geniş yumurtamsı biçiminde olup, kenarı kertikli, ucu sivri ve yaklaşık sivri bir biçimdedir. Alt yaprakların 1/3-1/2' si 3-5 loblu, yuvarlak, 7-16 x 5-14 cm

boyutlarında, kenarı derin dişli, uzun ve sivri uçlu; yaprakların sapı 1-5.5 cm uzunluğunda. Orta gövde yaprakları üç loblu, genişçe yumurtamsı veya yumurtamsıdır. Kınlar 3-5 cm uzunluğunda, kahverengimsi, alttı tüylü, genellikle dar, nadiren genişleyen yapıdadır. Çiçek durumu oluklu, yeşil, seyrek veya yoğun tüylü. Brakteler 2-8, yumurtamsı-mızraksı, 3-12 x 1-3 mm, hemen hemen dökülücü, yoğun tüylüdür. Işınlar 7-37, eşit değil, meyvede 1.5-10 cm uzunluğunda, seyrek veya yoğun tüylüdür. Brakteoller 6-10, yumurtamsı ilâ şeritsi-mızraksı şeklinde, 2-8 x 0.5-1 mm boyutunda, kalıcı, seyrek veya yoğun tüylü. Çiçek sapları 8-30, eşit değil, meyvede 0.3-1.6 cm uzunluğunda, hemen hemen yoğun salgı tüylü. Çiçekler beyaz, en dıştaki hemen hemen radiant, dış yüzü tüysüz veya seyrek tüylü. Ovaryum yoğun olarak uzun salgı tüylü; stil tüysüz. Meyveler genişçe eliptik ilâ ters yumurtamsı, 6-8 x 4.5-5.5 mm, küt uçlu, seyrek salgı tüylü; kanat 0.5-0.6 mm genişliğinde; sırt yağ mahfazası çomaksı, 0.5-1 mm eninde, boyları neredeyse eşit, meyvenin 3/7-4/7' si uzunluğunda; karın yağ mahfazası genellikle yok, çok nadiren eğer varsa 1 veya 2 adet, çomaksı, 0.2-0.3 mm eninde, meyvenin 1/7-2/7' si uzunluğunda.

1.9.5. *Heracleum pastinaca* Fenzl

Çok yıllık, hafif aromatik veya değil, gövde tabanı kağıt gibi yaprak sapı kalıntıları ile kaplı. Gövde yatık veya eğik tırmanışlı, 3-15 (-20) cm uzunluğunda, 0.5-1.2 mm çapında, düz, tüysüz. Alt yaprakları 1-2-tüysü veya üç parçalı, 3-7 yaprakçıklı; aya dar üçgenimsi-paralel ilâ yumurtamsı, 1.5-6.5

x 1.5-5.5 cm, tek renkli, alt ve üst yüzey tüysüz veya seyrek salgı tüylü; yaprak sapı, kın dâhil 1-5 cm uzunluğunda, yeşilimsi-morumsu, tüysüz (Şekil 1.9.5.1). Alt yaprakların en alt yaprakçıkları genişçe yumurtamsı ilâ neredeyse küremsi-böbreksi şeklinde, 3-5 yaprakçıklı, yaprakçıklar basit veya 3-5 loblu, loblar ayanın 1/2-3/4' ü kadar; aya 0.8-2 x 0.7-1.8 cm, kenarı dişli-oyuklu, ucu sivri; yaprak sapı 0-4.5 cm uzunluğunda. Loblar yumurtamsı-yuvarlağımsı ilâ genişçe eliptik. Orta gövde yaprakları kına indirgenmiş; kın yumurtamsı-mızraksı, 0.5-1.5 cm uzunluğunda, parçasız, beyazımsı, tüysüz. Çiçek durumu oyuksuz, yeşil, tüysüz. Brakteler yok. Işınlar 2-3, eşit değil, meyvede 1-8 cm uzunluğunda, tüysüz. Brakteoller yok. Çiçek sapları 4-9, eşit değil, meyvede 0.6-1.7 cm uzunluğunda, tüysüz. Çiçekler beyaz veya soluk morumsu, düzenli, dış tarafı tüysüz. Ovaryum neredeyse tüysüz; stil tüysüz. Meyveler genişçe eliptik ilâ ters yumurtamsı, 5-9 x 4-6 mm, küt uçlu, tüysüz; kanat 0.3-0.4 mm genişliğinde; sırt yağ mahfazası ipliksi, 0.1 mm genişliğinde, eşit değil, meyvenin 3/7-5/7' si uzunluğunda; karın yağ mahfazası 2, ipliksi, 0.1 mm genişliğinde, meyvenin 3/7-5/7' si uzunluğunda (Şekil 1.9.5.2).



Şekil 1.9.5.1. Niğde, Bolkar Dağı'ndan *Heracleum pastinaca*'ya ait genel bir görünüm



Şekil 1.9.5.2. Niğde, Bolkar Dağı'nda *Heracleum pastinaca*'nın yakından görünümü

1.10. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerin Belirlenmesi ve

Kullanılan Yöntemler

Bitkisel ekstraler ve uçucu yağlar çeşitli amaçlar için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır^(14,18). Ancak son yıllarda farklı özelliklerinden yararlanılarak daha geniş amaçlı kullanımları ve bununla ilgili araştırmalar büyük bir hızla sürdürülmektedir. Üzerinde en çok durulan konu ise antimikrobiyal özellikleridir⁽²⁰⁾. Bu özelliklerinden yararlanılarak uçucu yağlar çiğ ve işlenmiş gıdaların korunmasında veya modern ilaçlarda katkı maddesi ve doğal tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır⁽²¹⁾. Bitki ekstraleri ve uçucu yağların

antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yayınlanmış çok sayıda makale bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bir çeşit uçucu yağ bir çok patojen mikroorganizmaya karşı denenirken bazen de birçok bitki ekstresi ve yağ tek bir mikroorganizma hedef alınarak çalışılmıştır^(21,22,23).

Antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesinde yaygın bir şekilde kullanılan birim, katı bir ortamda gelişen bakterinin inhibisyon zon çapıdır. Bitki uçucu yağ örnekleri için inhibisyon zonu, açığa çıkabilecek yağ buharının bakteriye etkisi ve agar ortamında yağın homojen bir şekilde difüzlenebilmesine bağlıdır. Bitki antimikrobiyal bileşenlerinin testlerindeki diğer değişkenler düşük konsantrasyonda birbirleriyle zıt tamamlar ya da bileşik olarak etkileşebilecek iki veya daha fazla aktif bileşenin bulunması, yağların tek başına olan aktiviteleriyle karşılaştırıldığında kompleks test örnekleri (yiyecekler) içindeki yağların antimikrobiyal aktivitelerindeki değişiklikler (lipit ve sulu fazlar arasındaki aktif bileşenlerin paylaşımından kaynaklanan) ve test örneğinin bağımsız olarak test edilen mikroorganizmaların büyümesine teşvik edebilecek veya engelleyebilecek kompleks örnek reaksiyon karışımlarında bulunan maddelerdir. Fakat çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılmasını sağlamak için test metodlarını standardize etmek ve antimikrobiyal ajanların potansiyellerini etkileyen faktörleri değerlendirmek önemlidir⁽²⁴⁾. Bu bilgiler çoğu zaman kullanışlıdır ancak, her çalışmada yöntemsel farklılıklar bulunmaktadır. Kullanılan antimikrobiyal test metotları birbirinden farklılıklar göstermektedir. Ayrıca seçilen yağların ya da bunların elde edildiği bitkilerin gerek toplandığı yer bakımından gerekse ekstraksiyon

yöntemleri bakımından farklılıklar mevcuttur. Bu faktörlerden dolayı çalışma sonuçları arasında bazı farklılıklar olma ihtimali fazladır⁽²⁵⁾.

1960'lı yıllara kadar mikroorganizmaların ilaç, özellikle antibiyotik duyarlılık testleri için bir çok yöntem veya bu yöntemlerin değişik birçok modifikasyonları bildirilmiştir. Her yöntemin üstünlüğü ve kullanım alanları sınırlıdır. Sonuçları en yüksek düzeyde yorumlamak için yöntemin tüm özellikleri iyi kavranmalıdır. Bakterilerin antibiyotik duyarlılığını tayin etmede kullanılan başlıca iki temel yöntem vardır. Bu yöntemler, antibiyotiklerin seri halde dilue edildikten sonra mikroorganizmalar ile etkileştirildiği 'Titrasyon (Dilüsyon veya Sulandırma) Yöntemi' ve besiyerine test edilecek kültürün ekilmesinden sonra besiyeri üzerine test maddesi emdirilmiş kağıt disk yerleştirmek suretiyle yapılan 'Difüzyon Yöntemleri' dir^(25,26,27).

Antibiyotiklerin duyarlılıklarını belirlemede kullanılan testler, uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Genelde uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek zordur. Çünkü uçucu olmaları yanında sudaki çözünürlüklerinin az olması ve karmaşık yapıda olmaları deneyleri güçleştirmektedir. Yapılan deneyi ve sonuçları etkileyen en önemli faktörler ise; deneyin yapılış tekniği, kullanılan besiyeri, kullanılan mikroorganizma ile uçucu yağın yapısal özellikleridir.

Uçucu yağların; uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde aktivite gösteren özel kokulara sahip olması gibi özellikleri de vardır. Uçucu yağlar organik maddelerin kompleks bir karışım halinde bulunduğu heterojen karışımlardır. Bu son özellikleri, özellikle kokulu olanların biyolojik olarak aktif

olabileceklerini ortaya koymaktadır. Gerçekten de, uçucu yağların çeşitli farmakolojik aktiviteleri bulunmaktadır. En son rapor edilen özellikleri antimikrobiyal olanlarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkarıldığı testler belli bir standartizasyona bağlı değildir ve gelişmiş her laboratuvarında yapılabilmektedir. Kullanılan teknikler genel olarak agar difüzyon ve dilüsyon yöntemleridir.

Dilüsyon teknikleri bir mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılığını tayin etmek için geliştirilmiştir. Ancak bitki ekstraktları veya uçucu yağlarında antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır.

Antimikrobiyal maddenin seri olarak dilüe edilmesi ve üzerine bakteri kültürünün inoküle edilmesi esasına dayanmaktadır. İnkübasyondan sonra test edilen antimikrobiyal maddenin, kullanılan mikroorganizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olduğu üremenin varlığına veya yokluğuna göre belirlenmektedir. Üremenin varlığı ya da yokluğu bulanıklık tayiniyle yapılmakta ve üremenin olmadığı en düşük son konsantrasyon değeri "Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK)" değeri olarak tanımlanmaktadır. Bu teknik uzun yıllardan beri standart deney tüplerinde gerçekleştirilen makro-broth dilüsyon tekniğidir. Son yıllarda antibiyotikler dışındaki sentetik ya da doğal antimikrobiyal maddelerin test edilmesinde, bu yöntem prensibiyle hareket eden ancak çok daha az miktarlarda besiyeri ve test maddesine ihtiyaç duyan bir yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Kullanılan diğer difüzyon tekniklerine göre de çoğu zaman daha avantajlı olan ve oldukça doğru bir biçimde MİK değerini ortaya koyan mikro tüp dilüsyon ya da mikro broth dilüsyon metodudur. Bu metotta, ticari olarak geliştirilmiş 80,

86 veya daha fazla kuyucuğa sahip plakalar kullanılmaktadır. Bu kuyucuk serilerinde madde dilüsyonları hazırlanmakta ve az miktarda kültürün ilavesiyle, madde ve mikroorganizma etkileştirilmektedir. İnkübasyondan sonra bulanıklık tayiniyle üremenin varlığı veya yokluğu belirlenmektedir. Bulanıklık tayin işlemi basitçe gözlem yapmak ya da özel bulanıklık okuyucuları kullanmak suretiyle de yapılabilmektedir. Bu yöntem en çok antibiyotikler için kullanılsa da bitki eksteleri ve uçucu yağlar için de kullanılmaktadır. En önemli avantajı 10-25 µl uçucu yağ ile deneyin gerçekleştirilmesidir. Çünkü uçucu yağların bol miktarda elde edilmesi oldukça zordur. Bir diğer avantajı da aynı anda bir çok maddenin test edilmesine imkan sağlamasıdır^(24,25).

Bu yöntem kullanılarak çeşitli maddelerin antimikrobiyal özellikleri ortaya konmuştur^(21,28,29). Hammer ve ark. yaptığı çalışmada 20 bitkiye ait uçucu yağ mikrodilüsyon broth yöntemini kullanarak test etmiş, 16 uçucu yağın %2'lik (v/v) konsantrasyonunda, kullandıkları test mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiğini diğer 4 uçucu yağın ise MİK değerlerinin %8 (v/v) değerinden büyük olduğunu ortaya koymuşlardır⁽²¹⁾.

Antimikrobiyal testlerde kullanılan bir diğer metot da agar difüzyon metodudur. Uçucu yağların test edilmesinde kolaylığından dolayı en çok bu teknik tercih edilmektedir. Agar difüzyon tekniği, 1942 yılından beri çeşitli maddelerin antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kalitatif ve yarı kantitatif bilgiler bu metotla ortaya çıkarılabilmektedir. Agar difüzyon tekniğinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir çukur

sistemiyle, test organizmasının bulunduğu uygun bir besiyeri kullanılmaktadır. Besiyeri üzerine, belirli ölçüde açılan çukurlara homojen olarak çözülmüş uçucu yağ konulur. Çukurlar besi yeri ile temas halindedir. Bu yöntemde bazen besiyeri üzerinde çukur açmak yerine, uçucu yağ emdirilmiş kağıt disklerde kullanılmaktadır. Sonuç olarak gerek çukurlardan, gerekse kağıt disklerden önceden mikroorganizma ile aşılınmış besiyerine, uçucu yağ difüze olmaktadır. Kullanılan maddenin yapısal özelliği difüze olma yüzdesini veya süresini etkileyebilmekte bu durum da deney sonuçlarında etkili olabilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında belirgin üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmaktadır. Bu yöntemde uygulanan yağ miktarı ve kullanılan diskin veya çukurun çapı önemli parametrelerdir. Çünkü inkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları bu parametrelerin kontrolündedir. Çukurun açıldığı besiyerinin kalınlığı da inhibisyon zonunun çapını etkilemektedir. İnhibisyon zonunun oluşması için belirgin bir sürenin geçmesi gerekir. Bu süreye 'kritik zaman' (T_{crit}) denilmektedir. Bu zamandan önce inhibisyon zonları belirginleşmeyebilir ya da bu sürenin üzerinde inkübasyon yapıldığında oluşan zonlar kaybolmaya başlamaktadır. Bunun yanında kullanılan inokulumun yoğunluğunun da belirli ve sabit olması gerekmektedir. Çünkü, normalde etki gösterecek olan bir madde, yüksek mikroorganizma konsantrasyonundan dolayı etkisiz görünecek, inhibisyon zonu oluşturmayacaktır veya gerçek ölçülerde olmayacaktır. Bu nedenle inokulum konsantrasyonu kritik seviyede tutulmalıdır. Eğer mikroorganizma yoğunluğu olması gereken değerde ise inkübasyon süresinin uzunluğu o kadar da

önemli olmamaktadır. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları bir cetvelle ölçülerek kaydedilir. Çukurlara maddenin artan ya da azalan konsantrasyonları koyularak oluşan zonların çaplarının da doğru orantılı olarak artması ya da azalması beklenir. Ancak agar difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapları değerleri ve buna karşılık gelen madde konsantrasyonları ile gerçek MİK değerleri arasında kesinlikle bir paralellik olduğu ancak elde edilen zon çaplarının MİK değerleriyle gereken uyumu göstermediği bildirilmiştir^(25,22,23,30).

Difüzyon yöntemlerinden disk tekniğinin temeli, test edilen organizma ile inoküle edildikten sonra, en kısa zamanda agarın yüzeyine antimikrobiyal aktivitesi denenecek örneğin emdirildiği filtre kağıdı disklerinin yerleştirilmesine dayanmaktadır. Yeterince beklendikten sonra (bakterilerde 24 saat, mantarlarda 72 saat) diskin etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülür. Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan diğer bir yöntem de 'biyootografi'dir. Bu yöntem bitki ekstralarının veya saf maddelerinin hem bitki hem de insan patojenlerine karşı denenmesinde oldukça kolay ve doğru sonuçlar verir. Biyootografi yöntemi uçucu yağların antibakteriyel özellikleri yanında asıl olarak uçucu yağ oluşturulan organik bileşenlerden hangisinin aktiviteden sorumlu olduğu ortaya konulmaktadır. Bu yöntem agar difüzyon tekniğinin prensiplerine dayanmaktadır. Ancak test edilecek maddenin uygulaması ve sonuçların değerlendirilmesi bakımından farklılıklar göstermektedir. En büyük farklılık yöntemde "İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)" tekniği kullanılmakta, uçucu yağ İTK plaklarına uygulandıktan sonra test mikroorganizmalarıyla

etkileştirilmektedir. İTK tekniği yardımıyla uçucu yağlar bileşenlerine kabaca ayrılarak aktiviteden sorumlu bileşen ortaya çıkarılmaktadır. Yöntemde test maddesi iki İTK plağına birden uygulanmakta ve plaklardan biri referans plak olarak kabul edilmektedir. Diğer deneyde mikroorganizmaların uygulandığı plaktır. Referans plak reaktiflerle renkli hale getirilerek ya da 254 veya 366 mm UV ışığı altında incelenerek fraksiyonlar işaretlenmektedir. Deneyde kullanılan plağın inkübasyonundan sonra, hangi maddenin üzerinde inhibisyon zonu olduğu belirlenerek o maddenin Rf değeri hesaplanmaktadır. Rf değeri (Retention Factor, Tutunma Faktörü), maddenin plak üzerinde yürüdüğü mesafenin, çözücünün yürüdüğü mesafeye oranı hesaplanarak bulunmaktadır. Referans olarak saklanan İTK plağındaki maddeler ile inhibisyon zonlarının oluştuğu maddelerin Rf değerleri karşılaştırılarak zonu oluşturan madde işaretlenmekte ve bu aşamadan sonra zonu oluşturan madde çeşitli yöntemlerle referans plaktan izole edilerek tayin yoluna gidilmektedir. Aslında biyootografi yöntemi antibiyotikler gibi antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan bileşikler ortaya çıkarmak için uygundur. Bitki ekstraları veya benzeri organik bileşikler içinden de en aktif olan bileşenleri ortaya çıkarmaktadır. Bugüne kadar üç biyootografik metot bildirilmiştir. Bunlar; mikroorganizmanın doğrudan İTK plağı üzerinde geliştirildiği direkt biyootografi yöntemi (a) İTK plağında yürütülen maddenin plaktan izole edilerek mikroorganizma ile inoküle edilmiş bir besiyerine aktarılmasıyla gerçekleştirilen kontakt biyootografi yöntemi (b), ve son olarak belirli bir mikroorganizma ile inoküle edilmiş besiyerinin İTK plağının üzerine dökülmesiyle gerçekleştirilen immersiyon biyootografi ya da Agar-overlay

biyootografi (c) yöntemleridir. Bu üç yöntemden hangisi kullanılırsa kullanılsın, inkübasyondan sonra oluşması beklenen inhibisyon zonlarının belirlenmesi ya da gözle görülür bir hal almasını sağlamak için genel olarak tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Bu reaktif maddeler mikroorganizmaların mor bir renk almasını sağlayarak, mor bir arka planda renksiz inhibisyon zonlarının oluşmasını sağlamaktadır^(20,22,31,32).

Swartzia madagascariensis Desv. (Leguminosae) bitkisinin ekstreleri biyootografi yöntemiyle *Candida albicans*'a karşı değerlendirmişler ve deneyin sonucunda İTK plağı üzerinde Rf 0,5 ve 0,82 değerinde iki ayrı inhibisyon zonu gözlenmiştir. Reaktif madde uygulanan referans plakta gözlenen maddelerin, zonu oluşturanlarla birebir aynı konumda oldukları gösterilmiş ancak zonu oluşturan maddelerin tayini yapılmamıştır. Ayrıca bu ekstrenin mikrobroth dilüsyon yoluyla *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği de bildirilmiştir⁽³³⁾.

1.10. Test mikroorganizmalarının genel özellikleri

1.11.1. *Shigella* sp.

Yaklaşık 2-4 x 0,6 µm boyutlarındadır. Rezervuarı insan ve maymundur. Fekal-oral yolla bulaşır. *Shigella dysenteriae* "basilli dizanteri" sebebidir. 100 bakteri bile enfektif dozu oluşturabilir. Kanlı, mukuslu, inflamasyonlu diare etkenidir. Gram (-) basildir. Hareketsizdir. Bu özelliği ile *Salmonella*' dan ayrılır. Sporsuzdur. Kapsülsüzdür. Aerob ve fakültatif anaerobdur. Sitratl

besiyerinde ve KCN buyyonunda üremez. H₂S oluşturmaz, jelatini eritmez. Çok nadir 1-2 türü dışında laktozu fermente etmez. Laktoz (-)' tir. Fermente ettiği diğer şekerlerden gaz yapmadan asit yapar. Üreaz yapmaz. Üreaz (-)' tir. Hem oksidatif hem de fermentatif metabolizmaları vardır⁽³⁸⁾.

1.11.2. *Corynebacterium diphtheriae*

Corynebacterium' lar tabiatta, hayvan ve insanların normal florasında da bulunabildikleri gibi, bazı formları ile de hastalık oluşabilmektedir. *Corynebacterium diphtheriae* "difteri" etkenidir. Bilinen rezervuarı, insanların üst solunum yollarıdır. 2-3 µm boyunda sporsuz basillerdir. Bakterinin tipik topuz görünümü, hücre duvarının basilin uç kısmında daha ince olmasına bağlıdır. Gram (+) boyanırlar. Hücre bölünmesi sırasında çin harfleri şeklinde görülürler. Metilen mavisi, neisser boyası veya difteri basilleri K⁺ telüriti indirgeyerek siyah renkli tellür oluşur. Bakterinin aerob ve fakültatif anaerob formları vardır.

37 °C' de kolaylıkla ürerler. Difteri, inkübasyon süresi en kısa olan bakteriyel enfeksiyonlardan birisidir. Bakteri üst solunum yollarına yerleşebildiği gibi, daha sonraları nazofarinks, larinks ve trakeaya kadar ilerleyebilir. Üst solunum yolları dışında göz ve yara enfeksiyonu yapabilir. *Corynebacterium diphtheriae* sadece insanda patojendir. Bakteri insanda ilk defa nazofarinkse yerleşerek daha sonraları ilerleyen bir enfeksiyon

oluşturur. Özellikle sonbahar ve kiş aylarında görülür. Vakaların % 80'i 15 yaş altındadır. Solunum yolu teması ile bulaşır. Burun ve nazofarinkste kolonizasyon yapar⁽³⁸⁾.

1.11.3. *Escherichia coli*

Kısmen hareketli, şekeri asit ve baz yaparak parçalayan, laktozu ve manitolu ayırıtıran bakteriler olup indol oluştururlar. 2-6 µm boyunda, 1.0-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak, çomakçık şeklinde Gram (-) bakterilerdir. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığıyla hareket ederler ama hareketleri yavaştır. Fimbriaları bulunur ve sporsuzdurlar. Buyyon ve jeloz gibi besiyerlerinde ve pH 7.2' de kolayca ürerler. Fakültatif anaerob olup optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir.

Escherichia coli oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C sıcaklıkta 30 dakika, oda sıcaklığında uygun ortam olma koşulu ile uzun süre canlı kalabilirler. Soğuğa direçli, dezenfektanlara karşı dirençsizdirler. Benzil penisilin dışında birçok kemoterapotige duyarlı olmakla beraber koli kökenli çoğu bakteriden bakteriye kolayca geçebilen bulaşıcı direnç detrminanları taşıdıklarından; ampisilin, streptomisin, tetrasiklin, sulfonamid, bir kısmı da kloramfenilkol, kanamisin ve trimetoprim'e direnç kazanmışlardır.

Memeli ve kuşların bağırsaklarında yaşarlar. Aslında normal bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakteri ve organizma ile bir denge halinde kaldığı sürece hastalık yapmazlar. Normal koşullarda kokuşma

(putrifikasyon) / mayalaşma (fermantasyon) dengesinin düzenlenmesine ve beslenme ile ilgili bazı hususlara yardımcı olurlar.

Belirli koşullar altında *Escherichia coli*, insan ve hayvanlar için patojen olup gerek yangı gerekse sürgün şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına neden olur. Normal bağırsak florasında bulunan *Escherichia coli* herhangi bir nedenle buldukları yerin dışına, başka dokulara geçme olanağı buldukları taktirde önemli yangılı enfeksiyonların oluşmasına neden olabilirler. Özellikle idrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve manevralara ulaşan *Escherichia coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açarlar ⁽³⁸⁾.

1.11.4. *Enterococcus faecalis*

Normal yaşam ortamları insan ve hayvanların bağırsakları olan enterokoklar besinlerde de (peynir, salam, sosis vs.) bulunabilirler. Hareketsiz, katalaz negatif olup D-grup antijenine sahiptirler. 45 C° de, % 6.5 NaCl' de ve pH 9' da üreyebilirler. Klasik bir fırsatçı patojen olarak patojeniteleri sınırlıdır. Ancak hastane enfeksiyonlarında karışık flora kapsamında başka etkenlerle birlikte etken olarak sıklıkla izole edilir. İzole edilen suşların yaklaşık %90' ı *E. faecalis*, %10' u *E. faecium*' dur. En çok korkutucu olan enterokok enfeksiyonu endokardittir. Endokardit tedavisinde bir aminopenisilin, streptomisin veya gentamisinle kombine olarak verilmelidir. Tedavide başarının önkoşulu kombinasyonun bakterisid etkili olmasıdır. Bu streptomisine (MİK> 1000 mg/1) veya gentamisin (MİK> 500 mg/1) veya aminopenisiline yüksek düzeyde direnç söz konusu olduğunda

sağlanmaz. Çoğul dirençli suşlarda, enterokokların klasik bir fırsatçı olmaları nedeniyle, özellikle hastanelerde rastlanmaktadır. Son zamanlarda, yoğun bakım servislerinde ortaya çıkan ve glikopeptitlere, vankomisin ve teikoplanin de dahil olmak üzere tüm antiinfektiflere dirençli suşların etken olduğu salgınlar bildirilmektedir⁽³⁸⁾.

1.11.5. *Streptococcus pyogenes*

Genel olarak yuvarlak ve yaklaşık 0,6-10 µm çapında koklardır. Streptokoklar zincir yapma alışkanlığındadır. Yaptıkları zincirlerin uzunlukları bulunduğu koşullara ve bazı tiplerine göre farklılık gösterebilir. Besiyerinde uzun zincir yapan streptokokların hastalık materyalinde 5-8 kottan ibaret kısa zincirler yaptıkları bilinir.

Sporsuz ve hareketsizdirler. Çoğu streptokoklarda hiyaluronik asit içeren bir kapsül bulunmaktadır. Özellikle patojen (A Grubu) streptokoklarda bulunan bu kapsül organizmadan yeni ayrıldıklarında ve zengin besiyerlerinde açılır. Besiyerlerinde üretilmeye devam edildiği takdirde kapsül kaybolur ve hiyalüronik asit besiyerinde dağınık halde bulunur.

Genel olarak bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar. Gram (+) olup eski kültürlerinde arada Gram (-) olanlarına rastlanır. Bu nedenle aynı zincir üzerinde Gram (+) ve Gram (-) bireylere rastlanabilir.

Streptococcus pyogenes, genel olarak fakültatif anaerobtur. Adi besiyerlerinde üreseler de, kan, serum, haben ve glikoz gibi maddelerle üreme daha kolay ve iyi olur.

Ortalama pH 7'de üremeyi severler. Optimal üreme sıcaklığı 37°C'dir. Kuraklığa oldukça dayanıksızdırlar. Antibiyotiklere karşı direnç kazanmaları zordur.

Patojen streptokoklar insan ve hayvanlarda meydana gelen hastalıklardan sorumludurlar. Bu streptokoklar organizma üzerinde etkili olabilecek 20'den çok madde salgırlar. Bu maddelerin bir kısmı hücre dışına salgılanır ve diğeri bir kısmı ise hücre içinde oluşup, bakteri eridikten sonra (spheroblast) bulunduğu ortama salınır. Bu maddelerin en önemlileri şunlardır: Streptolizinler, streptokinaz, streptodornaz, hyalüronidaz, eritrojinik toksin.

Streptokoklar doğada oldukça yaygındırlar. İnsan vücudu normal florasında buldukları gibi, saprofit olarak süt ve süt ürünleri gibi besin maddelerinde de bulunurlar. Ayrıca patojen olanları insan ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyonların etkenidir.

Yılancık, sepsis, loğusa humması, deri altı lokalizasyonları, streptokok anjini, akut bakteriyel endokardit ve üriner enfeksiyonlara neden olmaktadır⁽³⁸⁾.

1.11.6. *Candida krusei*

Candida türleri en sık rastlanan fırsatçı patojen fungus türüdür. Solunum sistemi, sindirim sistemi ve kadınların genital sistemi mukozalarının normal florasında bulunurlar. Buralarda sayıları artarsa veya florasız bölgelere ulaşırlarsa hastalık etkeni olurlar. Toprakta yaşarlar. Zengin besi yeri ve insanda uzayarak pseudohifa görünümüne sebep olurlar. Oda ısısında yumuşak, beyazımsı koloniler şeklinde ürerler, kültürlerinde maya kokusu vardır. *Candida albicans'* la arasındaki tek fark karbonhidrat fermantasyonuna farklı etki göstermeleridir.

Deride görülen enfeksiyonlar daha çok, koltuk altı, glutea kıvrımları, kasık ya da meme altları gibi, vücudun nemli ve sıcak yerlerinde görülür. En çok şişmanlarda ve şeker hastası olan kişilerde rastlanır. Enfeksiyon bölgeleri kızarır, sulanır ve kesecikler oluşur. Ellerde *Candida* enfeksiyonu, sık sık ve uzun süre sularla uğraşanların el ve tırnaklarında görülür. Hastalığın bu şekline, en çok hizmetçilerde, yemek pişirenlerde, sebze ve balıklarla uğraşanlarda rastlanır. İnsandan insana bulaşma yoktur, enfeksiyon genelde endojen kaynaklıdır. Korunmada kolonizasyonun engellenmesi önemlidir⁽³⁸⁾.

1.11.7. *Candida albicans*

Tomurcuklanma ile çoğalan mayadır. İnsan vücudunda hastalığa sebep olmadan bulunabilir veya deri mukoza ve iç organların kandidasisini yapar. Meydana getirdiği enfeksiyonlar primer ve seconder olarak ikiye ayrılır.

Primer kandidiasis deri ve tırnaklarda, mukozalarda ve iç organlarda teşekkül ederek, çeşitli arızalar gösterir. Deri, tırnak ve mukoza enfeksiyonlarına insanlar arasında sık rastlanır ve kolay teşhis edilir. İç organların kandidissisi ise oldukça nadir görülür ve seconder enfeksiyonlardan ayırt edilmesi güçtür⁽³⁸⁾.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Muller Hinton Agar, Nutrient Broth (Merck) temin edildi.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Etüv (Nüve), pH metre (Hanna, pH 211), Elektronik terazi, (And GR-120 model), çoklu karıştırıcı (Velp Scientifica), steril kabin (Holten), santrifüj (Eppendorf), Clevenger tipi su distilasyon cihazı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Mikroorganizmalar

Çalışmalarımızda kullanılan mikroorganizmalardan *Escherichia coli* ATCC11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans* ATCC 8459581 ve *Candida albicans* ATCC 90028 Ankara Hıfısıhha Enstitüsü'nden, *Shigella* sp. ve *Corynebacterium diphtheriae* ise Kırıkkale Üniversitesi Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan saf kültür halinde elde edilmiştir. *Shigella* sp.'nin tür seviyesinde teşhisi yapılamamıştır. Bu nedenle çalışmada cins seviyesinde verilmiştir.

Stok kùltürlerin sürekliliğini sağlamak için her 15 günde bir nutrient Agar yatık besiyerine; mayalar için ise malt agar yatık besiyerine transfer edildi. Üretilen kùltürler çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

2.2.2. Üreme Ortamlarının hazırlanması

Çalışmalarımızda, besi ortamı olarak Ali-Shtayeh ve ark. tarafından önerilen Müller Hinton Agar kullanıldı⁽³⁵⁾. Bu besi yeri, g/L olarak; 38 g Müller Hinton Agar (Fluka), 5 g agar (Merck) içermektedir. 1 L distile su içerisinde karıştırılan besi yeri kaynatılarak içerisindeki agarın erimesi sağlandıktan sonra otoklavda (121 C'de, 1,5 Atm. basınçta, 15 dakika) sterilize edildi ve steril petri kaplarına 25 ml olacak şekilde döküldü.

2.2.3. *Heracleum* Örnekleri

Çalışmalarımızda kullanılan *Heracleum* örnekleri, 2004 yılı Haziran-Ağustos ayları arasında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden Doç. Dr. Ahmet Duran ve Doç. Dr. Ergin Hamzaoğlu tarafından toplanmış, teşhis edilmiş ve isimlendirilmiştir (Çizelge 1.3). Bu bitki örnekleri, Selçuk Üniversitesi Eęitim Fakùltesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda saklanmaktadır.

2.2.4. Uçucu Yağların Elde edilmesi

100 g kuru yaprak materyalinden 3 saatlik süre sonunda hidrodistilasyon ile uçucu yağlar elde edilmiştir. Kullanılan bitkisel materyal, kısım ve temin edildikleri kaynaklar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Uçucu yağların elde edildiği bitkisel materyaller ve kullanılan kısım

Toplayıcı	Bitkinin adı	Adres	Kullanılan Kısım
A.Duran 6849& Hamzaoğlu	<i>Heracleum sphondylium</i> subsp. <i>artvinense</i>	A8 Artvin: Murgul, Çamurlu yayla yolundan Şavval Tepe, 2750 m, 2.8.2004, eğimli taşlı yerler.	Yaprak
A.Duran 6732& Hamzaoğlu	<i>Heracleum paphlagonicum</i>	A4 Çankırı: Ilgaz Dağı, Derbent Dinlenme Tesisleri yanı, 1800 m, 14.7.2004, orman açıklığı.	Yaprak
A.Duran 6769& Hamzaoğlu	<i>Heracleum pastinacifolium</i> subsp. <i>incanum</i>	A4 Karabük: Karaağaç Köyünden Keltepe, 1800- 1900 m, 16.7.2004, taşlı alanlar, alpin step.	Yaprak
A.Duran 6856& Hamzaoğlu	<i>Heracleum argaeum</i>	B5 Kayseri: Erciyes Dağı, Hacılar, Serçer Yaylası, 2080m, 14.8.2004, taşlı yamaçlar.	Yaprak
A.Duran 6889& Hamzaoğlu	<i>Heracleum pastinaca</i>	C5 Niğde: Ulukışla, Gümüş Köyü, Karagöl (Bolkar Dağları) 2600 m, 26.8.2004, taşlı yamaçlar.	Yaprak

2.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi İle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Hazırlanan uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde Disk Difüzyon Yöntemi kullanıldı. 6 mm çapında hazırlanan diskler otoklavda (121 °C'de, 1 Atm. basınçta, 15 dakika) steril edildi. Her bir diske 50 µl uçucu yağ emdirildi.

Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan Müller Hinton Agar besiyerine daha önceden kültüvasyonu yapılan mikroorganizmalardan 100 µl alınarak ekim yapılarak uçucu yağ emdirilmiş diskler numaralandırılarak düzgün bir şekilde mikroorganizmaların üzerine yerleştirildi. Daha sonra petriyerler 37°C'ye ayarlı etüveye yerleştirildi, bakterilerin üremesi için 24 saat; mayaların üremesi için 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları parlak ışık altında milimetrik cetvel yardımıyla ölçüldü. Her mikroorganizma ve bitki ekstraktı için aynı işlemler 3 kez tekrar edildi.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*'nin Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmamızda bölüm 2.2.4' te anlatıldığı gibi elde edilen *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*' nin uçucu yağlarının etkisi ile oluşan zon çapları Çizelge 3.1' de gösterilmiştir. Uçucu yağların etkisi ile *Enterococcus faecalis*'in üreme ortamında 10 mm' lik zon çapı, *Candida albicans* 90028'in ve *Candida krusei*'nin üreme ortamında 9 mm' lik zon çapı olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.1. *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*' nin uçucu yağının antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)
<i>Shigella</i> sp.	7
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	10
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8
<i>Candida krusei</i>	9
<i>Candida albicans</i> 90028	9
<i>Candida albicans</i> 8459581	6

Disk çapı (6 mm)

Bu ölçümler 3 çalışmanın ortalamasıdır.

3.2. *Heracleum paphlagonicum*' un Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmamızda bölüm 2.2.4' te anlatıldığı gibi elde edilen *Heracleum paphlagonicum*'un uçucu yağının etkisi ile oluşan zon çapları Çizelge 3.2' de gösterilmiştir. Uçucu yağların etkisi ile zon oluşmadığı saptanmıştır.

Çizelge 3.2. *Heracleum paphlagonicum*'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)
<i>Shigella</i> sp.	6
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6
<i>Candida krusei</i>	6
<i>Candida albicans</i> 90028	6
<i>Candida albicans</i> 8459581	6

Disk çapı (6 mm)

Bu ölçümler 3 çalışmanın ortalamasıdır.

3.3. *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum*'un Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmamızda bölüm 2.2.4'te anlatıldığı gibi elde edilen *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum*' un yapraklarından elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkisi ile oluşan zon çapları çizelge 3.3'de gösterilmiştir. Uçucu yağların etkisi ile *Candida albicans* 8459581 ve *Candida Albicans* 90028'in üreme ortamında 7 mm'lik zon çapı; *Shigella* sp.' nin üreme ortamında 12 mm'lik zon çapı olduğu saptandı.

Çizelge 3.3. *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum*'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)
<i>Shigella</i> sp.	12
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8
<i>Candida krusei</i>	7
<i>Candida albicans</i> 90028	7
<i>Candida albicans</i> 8459581	7

Disk çapı (6 mm)

Bu ölçümler 3 çalışmanın ortalamasıdır.

3.4. *Heracleum argaeum*'un Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmamızda bölüm 2.2.4'te anlatıldığı gibi elde edilen *Heracleum argaeum* 'un uçucu yağlarının etkisi ile oluşan zon çapları çizelge 3.4' de gösterilmiştir. Uçucu yağların etkisi ile *Candida albicans* 90028'in üreme ortamında 10 mm'lik zon çapı oluştuğu saptanmıştır.

Çizelge 3.4. *Heracleum argaeum*'un uçucu yağının antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)
<i>Shigella</i> sp.	8
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8
<i>Candida krusei</i>	6
<i>Candida albicans</i> 90028	10
<i>Candida albicans</i> 8459581	9

Disk çapı (6 mm)

Bu ölçümler 3 çalışmanın ortalamasıdır.

3.5. *Heracleum pastinaca*' nın Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmamızda bölüm 2.2.4' te anlatıldığı gibi elde edilen *Heracleum pastinaca*'nın uçucu yağının etkisi ile oluşan zon çapları Çizelge 3.5' de gösterilmiştir. Uçucu yağların etkisi ile *Enterecoccus faecalis*' in üreme ortamında 10 mm' lik zon çapı oluştuğu saptanmıştır.

Çizelge.3.5. *Heracleum pastinaca* 'nın uçucu yağının antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar	İnhibisyon zon çapları (mm)
<i>Shigella sp.</i>	7
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Enterecoccus faecalis</i>	10
<i>Streptococcus pyogenes</i>	6
<i>Candida krusei</i>	8
<i>Candida albicans</i> 90028	6
<i>Candida albicans</i> 8459581	6

Disk çapı (6 mm)

Bu ölçümler 3 çalışmanın ortalamasıdır.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uçucu yağlar ve bileşenleri, tedavi edici özellikleri yanında, sahip oldukları sitotoksik aktiviteleri ve bitki patojeni fungus ve zararlı böceklere karşı olan toksik etkilerinden dolayı, uzun yıllardan beri biyolojik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağlar, sahip oldukları antibakteriyel özelliklerinden dolayı da çeşitli gıdaların saklanması ve depolanması aşamalarında koruyucu görevini üstlenmektedirler. Bununla birlikte uçucu yağların, karmaşık ve değişken bir kimyasal yapıya sahip olmaları ve kullanılan antimikrobiyal test metotlarının spesifik olmamasından dolayı, antimikrobiyal özelliklerine göre sınıflandırılması çok güçtür. Bu olumsuzluklara rağmen, uçucu yağlar biyolojik aktiviteleri bakımından araştırılması gereken çok önemli organik bileşikleridir⁽²⁹⁾.

Çalışmamızda *Heracleum* (Umbelliferae) cinsine ait *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense*, *Heracleum paphlagonicum*, *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum*, *Heracleum argaeum* ve *Heracleum pastinaca* taksonlarına ait yaprak uçucu yağlarının antimikrobiyal etkileri disk difüzyon tekniği kullanılarak *Shigella* sp., *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Entorococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida krusei* ve *Candida albicans* bakteri ve funguslarına karşı denendi. Kullanılan uçucu yağların, *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Entorococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida krusei* ve *Candida albicans*' a karşı etkili olurken, *Corynebacterium diphtheriae*'a karşı etkili olmadığı görüldü.

Difüzyon yöntemleri tüm güçlüklerine rağmen, araştırmalarda oldukça çok sık kullanılmaktadır. Ancak difüzyon yöntemlerinin analiz sonuçlarının, besiyerinde difüzyon zorluğu olan örnekler için güvenilirliği azdır.

Sökmen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 35 tıbbi bitkiden 76 ekstre elde ederek, bu ekstreleri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans*'a karşı agar difüzyon yöntemiyle denemiştir. 1-11 mm arasında inhibisyon çapları ölçülmüş ve en güçlü aktivite *Peganum harmala* L. ve *Hypericum scabrum* L. bitkilerinin ekstrelerinde gözlenmiştir⁽³⁴⁾.

Yapılan bir başka çalışmada *Coriandrum sativum* L. ve *Foeniculum vulgare* uçucu yağlarının saf halde uygulandığı disk difüzyon yöntemiyle *Candida albicans*' a olan etkileri araştırılmış ve *Coriandrum sativum* uçucu yağının 11 mm, *Foeniculum vulgare* uçucu yağının ise 7 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, *Heracleum persicum* Desv. uçucu yağının 17 mm çapındaki inhibisyon zonuyla, *Candida albicans*' a karşı kuvvetli bir etki gösterdiği belirlenirken, çalışmamızda ise *Heracleum argaeum* uçucu yağının 10 mm çapındaki inhibisyon zonuyla *Candida albicans*'a karşı kuvvetli bir etki gösterdiği bulunmuştur⁽³⁶⁾. Bu çalışmaların bizim çalışmamızın sonuçlarıyla tam olarak karşılaştırılması kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan dolayı güçleşmektedir. Farklı sonuçlar uçucu yağların farklı kaynaklardan sağlanmış olmaları ya da kullanılan *Candida albicans* kültürlerinin farklı suşlar olmasından kaynaklanabilir.

Yapılan bir diğer çalışmada Umbelliferae familyasına ait *Angelica archangelica* L., *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgare*, *Heracleum persicum* ve *Pimpinella anisum* bitkilerine ait uçucu yağların antimikrobiyal etkileri agar difüzyon tekniği kullanılarak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı denenmiş, bunlardan *Coriandrum sativum* uçucu yağı bu bakterilere karşı sırasıyla 10.0, 9.0, 7.3 ve 11.3 mm' lik inhibisyon zonları oluşturarak etki göstermiştir. *Foeniculum vulgare* bitkisine ait uçucu yağın ise 10.3 mm inhibisyon zonuyla *Staphylococcus aureus*' a karşı etki gösterdiği, *Bacillus subtilis*'a karşı ise etki göstermediği bildirilmiştir⁽³⁶⁾. Bu sonuçlara paralel olarak alışmamızda, *Heracleum pastinaca* uçucu yağı *Shigella*, sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida krusei*, *Candida albicans* 90028 ve *Candida albicans* 8459581 bakterilerine karşı sırasıyla 7.0, 9.0, 10.0, 6.0, 8.0, 6.0 ve 6.0 mm'lik inhibisyon zonları oluşturarak etki gösterdi. *Heracleum sphondylium* subsp. *artvinense* uçucu yağının ise 7 mm' lik inhibisyon zonuyla *Escherichia coli*' ye karşı etki gösterdiği, *Corynebacterium diphtheriae* 'a karşı ise etki göstermediği belirlendi.

Birçok çalışmada antibiyotikler için belirlenen inhibisyon zonları, uçucu yağlarla elde edilen zonlarla karşılaştırılmıştır. Bunun test organizmalarının hassasiyetini belirlemek için kullanışlı olduğu, ancak antibiyotiklerle örneklerin antimikrobiyal etkisini karşılaştırmanın uygun bir sonuç vermeyeceği Janssen ve ark. tarafından açıklanmıştır⁽³⁶⁾.

Çalışmamızda kullandığımız uçucu yağlardan *Heracleum pastinacifolium* subsp. *incanum* ve *Heracleum pastinaca* bitkilerine ait uçucu yağların bakterilere karşı güçlü aktivite gösterdiği bulunmuştur. *Heracleum paphlagonicum* uçucu yağının ise *Corynebacterium diphtheriae* bakterisine etki göstermediği, diğer tüm bakterilere karşı 6 mm inhibisyon zonu oluşturduğu bulunmuştur.

Umbelliferae familyasına ait bitkilerin uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri hakkında çeşitli çalışmalar mevcuttur^(21,34,,36,37). Bu çalışmalar incelendiklerinde belli türler haricinde genel olarak Umbelliferae üyelerinin zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Kuvvetli biyolojik aktiviteye sahip olmamalarının sebebi, bu familyaya ait bitkilerin alkoloitler bakımından fakir olması şeklinde açıklanmaktadır. Bu durum Umbelliferae üyelerinin halk arasında ilaç olarak kullanımının da diğer familyalara göre çok yaygın olmamasını açıklamaktadır⁽¹⁹⁾.

KAYNAKLAR

1. B. Çubukçu, A. H. Meriçli, A. Mat, G. Sarıyar, N. Süyküpnar, F. Meriçli, Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 1, (2002).
2. E. Çakıroğlu, T. Ö. Erdoğan, Ot Sistematik Botanik Dergisi, Eylül, 111, (2002).
3. T. M. Uğuz, Ş. Nacar, A. İlçim, Ot Sistematik Botanik Dergisi, Ağustos, 121, (2002).
4. M. E. Crespo, J. Jimenez, C. Navarro, Essential Oils and Waxes Modern Methods of Plant Analysis New Series, 12, 41 (1991).
5. K. H. C. Başer, Uçucu Yağların Dünya Ticareti, Anadolu Üniversitesi Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi, Tıbbi Aromatik Bitkiler Bülteni, Eskişehir, 9, (1992).
6. G. Tümen, F. Satıl, O. Yıldırım, Trakya ve Orta Anadolu'da Yetişen Satureja Türlerinin Sistematik Revizyonu ve Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerinin Mukayesesi, Balıkesir, 155 (1992).
7. M. Tanker, N. Tanker, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını, Ankara, 65, 269 (1990).
8. T. Baytop, Farmakognozi, İstanbul Üniversitesi Yayını, İstanbul, 1810, 155 (1972).
9. A. Ceylan, Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, İzmir, 1, (1997).
10. N. Özhatay, M. Koyuncu, S. Atay, A. Byfield, Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma, İstanbul, 9, (1997).
11. T. Baytop, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Kitapevi, 3, (1999).
12. T. Dortunç, Bazı Uçucu Yağların Antibakteriyal ve Antifungal Etkileri Üzerinde Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniv. Sağlık Bil. Ens. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, (1990).
13. Y. Akman, Bitki Biyolojisine Giriş, Palme Yayıncılık, 4. Baskı, Ankara, (1991).

14. N. Tanker, M. Tanker, B. Şener, ve B. Svendsen, *Echinophora teunifolia* L. subsp. *sibtorhiana* (Guss.) Tutin Uçucu Yağının Gaz Kromatografisi İle Araştırılması, *J. Fac. Pharm Ankara*, 6, 161-179 (1976).
15. M. B. Lawrance, *The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plants Products, A Manual On The Essential Oil Industry*, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, (1995).
16. A. Ceylan, *Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler)*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 14, (1987).
17. P. H. Davis, *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburg University Press, 4, 265, (1972).
18. T. Baytop, *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişten Bugüne*, 2. Baskı, Nobel Tıp Basımevi, İstanbul, (1999).
19. D. H. French, *Ethnobotany of the Umbelliferae, The Biology and Chemistry of the Umbelliferae*, Academic Press., London, 385-402 (1971).
20. D.A.Vanden Berge and A. J. Vlietinck, *Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents From Higher Plants*, *Methods in Plant Biocemistry*, Academic Press, London, 37-53 (1991).
21. K. A. Hammer, C. F. Carson, T. V. Riley, *Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts*, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 985-990 (1999).
22. A. M. Janssen, A. J. J. Scheffer ve S. A. Baerheim, *Antimicrobial Activity of Essential Oils a Literature Review (1976-1986). Aspects of the Test Methods*, *Planta Med.*, 53, 395-398 (1987).
23. H. J. D. Dorman and S. G. Deans, *Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils*, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316 (2000).
24. E.W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. C. Winn, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Mikrobiology*, Lippincott-Raven Pub., 785, (1997).

25. G. İşçan, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir (2002).
26. A. M. Janssen, J. J. C. Scheffer, S. Baerheim, Antimicrobial Activity of Essential Oils, 1976-1986 Literature Review on Possible Applications, Pharm Weekbl (Sci), 9, 7.
27. M. Dığrak, E. Bağcı, Bazı Gökmar Türleri Uçucu Yağlarının İn Vitro Antimikrobiyal Etkileri, Tr.J. of Biology, 21, 273 (1997).
28. J. N. Eloff, A Sensitive Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria, Planta Med., 64, 711-713 (1998).
29. Q. Delespaul, B. G. Billerbeck, C. G. Roques, G. Michel, C. M. Vinuales and J. M. Bessiere, The Antifungal Activity of Essential Oils as Determined by Screening Methods., J. Essent. Oil Res., 12, 256-266 (2000).
30. M. Beşe, Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, Kardeşler Basımevi, İstanbul, (1989).
31. L. Rahalison, M. Hamburger, M. Monod, K. Hostettmann, E. Frenk, Antifungal Tests in Phytochemical Investigations: Comparison of Bioautographic Methods Using Phytopathogenic and Human Pathogenic Fungi, Planta Med., 60, 41-44 (1994).
32. J. P. R. Cannel, Natural Products Isolation, Humana Press, New Jersey, USA, 240-241 (1998).
33. L. Rahalison, M. Hamburger, M. Monod, K. Hostettmann, and E. Frenk, Bioautographic Agar Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants, Phtochem Anal, 2, 199-203 (1991).
34. A. Sökmen, B. M. Jones and M. Ertürk, The İn Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants, J., Ethnopharm, 67, 79-86 (1999).
35. M. S. Ali – Shtayeh, M. Reem – R. Yaghmour, Antimicrobial Activity of 20 Plants Used in Folkloric Medicine in The Palestinian Area. Journal of Ethnopharmacology, 60, 265-271 (1998).

36. A. M. Janssen, N. L. J. Chin, J. J. C. Scheffer ve S. A. Baerheim, Screening for Antimicrobial Activity of some Essential Oils by the Agar Overlay Technique, Pharm Weekbl., 8, 289-292 (1986).
37. M. M. Cowan, Plant Products As Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582 (1999).
38. H. Bilgehan, Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir, (1987).