

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI *CENTAUREA* L. TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ KİMYASAL  
BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Abdulkadir AKKURT

OCAK 2011

**Biyoloji Anabilim Dalında** Abdulkadir AKKURT tarafından hazırlanan BAZI *CENTAUREA* L. TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç.Dr. Sezgin ÇELİK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Kezban ADA BOSTAN \_\_\_\_\_

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Sezgin ÇELİK \_\_\_\_\_

Üye : Yrd.Doç.Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN \_\_\_\_\_

31/01/2011

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. İhsan ULUER

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### BAZI *CENTAUREA L.* TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

AKKURT, Abdulkadir

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç Dr. Sezgin ÇELİK

Ocak 2011, 47 sayfa

Ülkemiz bitki çeşitliliği bakımından zengin bir ülkedir. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye’de de yüzyıllardır birçok bitki türü tedavi amacıyla halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Centaurea L.* cinsine ait bazı türlerden elde edilen uçucu yağlarının, kimyasal içeriklerinin tespit edilmesi ve çeşitli patojen mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerimizden toplanan *Centaurea L.* türleri kurutulduktan sonra hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağları elde edilerek, GC-MS cihazıyla kimyasal analizleri belirlendi. Daha sonra MİK yöntemiyle test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkileri incelendi. Sonuç olarak, bitkilerden elde edilen uçucu yağların test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Tıbbi Bitkiler, *Centaurea L.*, Uçucu Yağ, Antimikrobiyal Etki

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS IN SOME *CENTAUREA* L. SPECIES

AKKURT, Abdulkadir

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

January 2011, 47 pages

Turkey is a very rich country in plant diversity. As with all countries, in Turkey for centuries plant species are widely used among the people for treatment. Aim of this study is to determine the chemical contents essential oils obtained from some species *Centaurea* L., and to examine the antimicrobial effects against a variety of pathogenic microorganisms. Types of *Centaurea* L. were collected in Eastern and Southeastern Anatolia. After drying process, essential oils were obtained by hidrodistillation method and chemical analysis was determined by GC-MS device. Then the antimicrobial effects against test microorganisms were examined with MIC method. As a result, it was observed that the essential oils obtained from plants have antimicrobial effects on test microorganisms.

**Key Word:** Medical Plants, *Centaurea* L., Essential Oil, Antimicrobial Effects

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen ve biz genç araştırmacılara büyük destek olan, bütün imkanlarını sonuna kadar bizlerin hizmetine sunan, Danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Sezgin ÇELİK'e, tez çalışmalarım esnasında, bitkilerin toplanması ve teşhislerinde desteğini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Herbariumu Uzmanı Dr. Faik Ahmet KARAVELİOĞULLARI'na, bilimsel konularda daima yardımını gördüğüm çalışmalarımda büyük desteği olan Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a, Mikrobiyolojik çalışmalarda desteği olan Anadolu Üniversitesi Öğretim Üyesi hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya, büyük fedakarlıklarla bana destek olan arkadaşım, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarı Uzmanı Murat KILIÇ'a, tezimin birçok aşamasında yardım gördüğüm Kırıkkale Üniversitesi Meslek Yüksek Okulu Öğretim Görevlisi Ümit YIRTICI'ya ve son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimi hazırlamam esnasında da yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. <i>Centaurea L.</i> Türlerinin Genel Özellikleri .....	1
1.2. Uçucu Yağlar .....	4
1.2.1. Uçucu Yağların Sınıflandırılması .....	6
1.2.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması .....	6
1.2.1.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması .....	7
1.2.1.3. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması .....	7
1.2.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri .....	8
1.2.2.1. Distilasyon .....	8
1.2.2.2. Su distilasyonu (Hidrodistilasyon) .....	8
1.2.2.3. Buhar distilasyonu .....	9
1.2.2.4. Soğukta Sıkma .....	9
1.2.2.5. Çözücü Ekstraksiyonu .....	10
1.2.2.6. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon .....	10
1.2.3. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Yöntemler .....	12
1.3. Literatür Özeti .....	21
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	25
2.1. Materyal .....	25
2.1.1. Çalışmaya Konu Olan Bitki Türleri .....	25
2.1.1.1. <i>Centaurea kurdica</i> Reichardt .....	25
2.1.1.2. <i>Centaurea albonitens</i> Turrill .....	26
2.1.1.3. <i>Centaurea antiochia</i> var <i>antiochia</i> Boiss .....	27
2.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar .....	27
2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
2.1.2.2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	28
2.1.2.3. <i>Micrococcus luteus</i> .....	29
2.1.2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.1.2.5. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	30
2.1.3. Kimyasal maddeler .....	30
2.1.3.1. Dimetilsülfoksit (DMSO) .....	30
2.1.4. Besiyeri .....	31
2.1.5. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler .....	31
2.2. Yöntem .....	32
2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Öğütülmesi .....	32
2.2.2. Uçucu Yağların Eldesi .....	32
2.2.3. Kimyasal Bileşimler .....	32
2.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi ...	33

<b>3. BULGULAR</b> .....	35
3.1. Elde Edilen Uçucu Yağların Miktarları.....	35
3.2. Uçucu Yağların Kimyasal Analiz Sonuçları .....	35
3.3. Antimikrobiyal Etki.....	37
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	38
<b>KAYNAKLAR</b> .....	41

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGE

### SAYFA

1.1. Türkiye’de yetişen bazı <i>Centaurea</i> türlerinin halk arasında kullanım amaçları.....	2
1.2. Ülkemizde Yetişen Uçucu Yağ Çalışması Yapılmış Türlerin Uçucu yağ Ana Bileşenleri.....	11
3.1 Elde edilen uçucu yağ miktarları.....	35
3.2 Uçucu Yağların Kimyasal Analizi .....	35
3.3 Uçucu Yağların Test Mikroorganizmalarındaki Antimikrobiyal Etkisi.....	37



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Centaurea kurdica</i> .....	25
2.2. <i>Centaurea albonitens</i> .....	26
2.3. <i>Centaurea antiochia</i> var. <i>antiochia</i> .....	27

## SİMGELER DİZİNİ

$\mu\text{g}$   $10^{-6}$  gram.

## KISALTMALAR DİZİNİ

CFU/ml	Colony Forming Unit
DMSO	Dimetilsülfoksit.
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu.
GC/MS	Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi
MBK	Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

## 1.GİRİŞ

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye’de de yüzyıllardır birçok bitki türü tedavi amacıyla halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemiz bitki çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir. Toplam bitki türü sayısı 9000’den fazladır. Bu sayı alttür ve varyetelerle 10.000’i geçmektedir. Türkiye 3000 endemik türe sahip olup, endemizm oranı yaklaşık %32 kadardır. Ülkemiz birçok bitki türünün gen merkezi durumundadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin çoğu ülkemizde doğal olarak yetişmekte ve bazılarının tarımı yapılmaktadır. Yaklaşık 500 bitki türü tıbbi amaçla kullanılmaktadır (1-5). Son yıllardaki çalışmalar, bitkilerden elde edilen ekstraktların biyolojik aktiviteleri üzerinde yoğunlaşmıştır (6,7). Bir araştırmadan elde edilen bulgulara göre, dünyada var olan 250.000 karasal bitki türünün sadece %2’sinin biyoaktiviteleri incelenmiştir (8-10). Bitkilerden elde edilen ve biyoaktif (antimikrobiyal, antioksidan, antitümöral gibi) pek çok bileşik genellikle alkaloid, fenilpropanoid (flavonoidler gibi), terpenoid, lignan, glikozid, lipid gibi yapılardan oluşur (11-18). Birçok doğal bitkinin, antimikrobiyal maddeleri veya bunların ana maddelerini sentezleme özelliğine sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, *Centaurea L.* cinsine ait bazı türlerden elde edilen uçucu yağlarının, kimyasal içeriklerinin tespit edilmesi ve çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesidir.

### 1.1. *Centaurea L.* Türlerinin Genel Özellikleri

Compositae familyasının Türkiye’deki en büyük cinsi *Centaurea L.*’dir. Bu cins Türkiye Florası Ek I ve II (hariç olan bölümler *Aetheopappus*, *Amblyopogon*, *Centaurea*, *Hyalinella*, *Odontolophoideae*, *Psephelloideae*, *Psephellus*, *Sosnovskya* and *Xanthopsis*) adlı eserde 151 tür, 6 eksik ve 6 şüpheli türle temsil edilmektedir. daha sonra Türkiye’den 16 yeni tür ve 2 yeni kayıt keşfedilmiştir. Türkiye florasında (EK 1) yeni tür olarak tanımlanmıştır. Nihayet *Centaurea* toplam sayısı 169 türe ve 199 taksona yükselmiştir (yukarıdaki belirtilen bölümler dışında). Son olarak endemik takson sayısı 129 ve endemizm oranı %65’e yükselmiştir (19). Endemizm

oranının bu kadar yüksek olması bu cinsin gen merkezinin Türkiye olduğu görüşünü sağlamlaştırmaktadır. Bitki, peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, Timur diken gibi Türkçe isimlerle bilinmektedir (20,21). Batı ve Güneybatı Anadolu’da yaygın olan *C. cyanus* türünün kurutulmuş çiçekleri halk arasında % 5’lik infüzyonları halinde ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Doğu Anadolu’da yetişen *C. behen* Ak behmen ve Zerdali diken olarak bilinmekte ve çiçekleri midevi ve adet getirici olarak kullanılmaktadır.

Kuzeybatı Anadolu’da yetişen ve çoban kaldıran, Timur diken olarak bilinen *C. calcitrapa*’nın % 2-6’lik infüzyonları dahilen ateş düşürücü olarak, çayır peygamberi ismiyle bilinen ve Kuzeydoğu Anadolu’da yaygın olarak yetişen *C. Jacea* ateş düşürücü, adet getirici, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (21).

Eğirdir (Isparta) yöresinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin saptanmasına yönelik yapılan bir araştırmada, *C. iberica*’nın mide ağrılarına ve böcek ve yılan sokmalarına karşı kullanıldığı saptanmıştır (22). *Centaurea* türleri halk tababetinde tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır (23-27). *C. chilensis* bitkisinin sulu ekstresi halk arasında antipiretik ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır (28-30). Çizelge 1.1.’de Türkiye’de yetişen bazı *Centaurea* türlerinin halk arasında kullanım amaçları verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Türkiye’de yetişen bazı *Centaurea* türlerinin halk arasında kullanım amaçları

Tür	Yöresel İsim	Kullanılışı	Uygulama Şekli	Referanslar
<i>C. balsamita</i>	Kılıç otu (Kars)	Çıban patlatıcı	-	31, 32
<i>C. virgata</i>	Şaladır (Van)	Mide ağrısına karşı Yara iyi edici	Dahilen dekoksasyonu Haricen, külleri tereyağı ile karıştırılarak merhem halinde	33, 34
<i>C. diffusa</i>	Zerdali diken			35
<i>C. pulchella</i>	Boğa diken (Niğde) Gümüş süpürge	Çıban patlatıcı	Haricen, toz halde	36, 37

**Çizelge 1.1 (devam)**

<i>C. lycopifolia</i>	Kumacı otu (Kahramanmaraş)	Öksürük kesici	Dahilen, taze halde dövülerek çıkan özsuyu alınır ve şekerle karıştırılıp içilir	38
		Kan dindirici	Haricen, toz halde	38
<i>C. drabifolia</i>	Basur otu (Afyon)	Hemoroid tedavisinde	Dahilen infüzyon, çay veya sigara şeklinde	39
<i>C. macrocephala</i>	Sarıbaş			35
<i>C. glastifolia</i>	Kotankıran	İştah açıcı	-	35
<i>C. pterocaula</i>	Çoruşbozan (Erzurum)	Yara iyi edici	Haricen, toz halde	32
<i>C. behen</i>	Ak behmen, zerdali diken	Midevi, adet söktürücü	-	31, 35
<i>C. solstitialis</i> ssp. <i>solstitialis</i>	Güllü diken, zerdali diken, sıtmaotu, çakırdiken (Afyon)	Çocuklarda dudaklardaki uçuklara karşı	Haricen, kavrulup toz edilerek	39, 40
	Çakırdiken, oğlak diken, sarı diken, eşek diken (Bartın)	Sıtma tedavisi	Dahilen hap gibi yutularak veya sigara gibi içilerek	41, 42
	Çakırdiken (Çankırı)	Peptik ülser semptomlarında	Taze iken hap şeklinde	38, 43
	Oğlak diken, sarı diken (Konya)	Soğuk algınlığı ve sıtma tedavisi	Dekoksiyon veya infüzyonu 2-3 kez içilir	
<i>C. iberica</i>	Çakırdiken (Erzincan) Çakırdiken (Isparta) Alabaş (Kastamonu) Deligöz diken Çobankaldırın, Timurdiken (Kastamonu)	Ateş düşürücü	Dahilen, %2-6 lık infüzyon	32, 35, 45, 46 47
		Yara iyi edici Mide ağrısına karşı Yılan ve akrep sokmasına karşı	Haricen toz halde Dahilen, infüzyon Ezilerek sürme	
<i>C. calcitarapa</i>	Çobankaldırın, Timur diken	Ateş düşürücü	Dahilen % 2-6 lık infüzyon	35
<i>C. urvillei</i> ssp. <i>armata</i>	Kötürüm (Sivas)			35

**Çizelge 1.1 (devam)**

<i>C. urvillei</i> ssp. <i>stepposa</i>	Çoban dikeneni (Konya)			35
<i>C. pichleri</i>	Peygamber çiçeği (Eskişehir)			35
<i>C. depressa</i>	Acımık (İsparta)			35
<i>C. cyanus</i>	Peygamber çiçeği, gökbaş (Muğla)	İshal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı Saç kepeklenmesine karşı	Dahilen % 5 lik infüzyon Haricen, infüzyonu ile baş yıkanır	31, 35, 46
<i>C. tchihatcheffi</i>	Yanar döner, gelin düğmesi, kırmızı peygamber çiçeği, türbe çiçeği (Ankara)			47

*Centaurea* türleri üzerinde yapılmış çalışmalara göre kimyasal yapılarında terpenik maddeler (seskiterpen laktonlar, triterpenler), flavonoid, lignan, uçucu yağ, alkaloid, antosiyanin, kumarin, tanen tipi fenolik bileşikler ve sabit yağlar olduğu bildirilmektedir (26). Biyolojik aktiviteleri kimyasal yapılarındaki seskiterpen lakton ve flavonoidlerden ileri gelen *Centaurea* cinsinin antienflamatuvar (ağrı kesici), antipiretik (ateş düşürücü), antimalaryal (sıtma), antimikrobiyal, antiviral, antifitoviral, antiülserojenik, hipoglisemik, nörotoksik, sitotoksik etkilerinin olduğu rapor edilmektedir (48).

Ülkemizdeki *Centaurea* türleri ilgili çalışmalar uçucu yağ, flavonoid ve seskiterpen laktonlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

## **1.2. Uçucu Yağlar**

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan genellikle su veya buhar distilasyonu yöntemleri 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 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, bitkilerin başta çiçek ve yaprakları olmak üzere herhangi bir organında (herba, kabuk, kök, odun, meyve, tohum) bulunabilirler. 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 bilinmemektedir. Ancak bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları, yaralanmalara karşı oluşan reçineyi çözebilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Yaydıkları kokular sayesinde de böcekleri cezbederek tozlaşmaya yardımcı olduğu ya da bunun tam tersi etki göstererek zararlı böcekleri bitkiden uzaklaştırarak bitkiyi korumada yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle sıcak iklimlerde yetişmesi nedeniyle uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlediği düşünülmektedir. Bu bitkileri taşıyan başlıca familyalar ise *Coniferae*, *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Labiatae*, *Umbelliferae*, *Iridaceae*, *Zingiberaceae* ve *Graminae*'dir (49).

Uçucu yağlar petrol eteri, hekzan, eter, etanol gibi organik çözücülerin çoğunda çözünürler. Uçucu yağların belli derecedeki etanoldeki çözünürlük oranı saflık kontrolünde yardımcı olmaktadır. Uçucu yağların kalitesi genellikle yoğunluk, kırılma indisi, optik çevirme gibi fizikokimyasal özelliklerle belirlenir. Optikçe aktiftirler ve kırılma indisleri yüksektir. Çoğu uçucu yağlar çok sayıda bileşiğin karışımından oluşmuşlardır. Bu yüzden kimyasal kompozisyonları oldukça karmaşıktır. Hatta aromatik bitkilerin coğrafik bölgelerindeki mevsimsel, iklimsel ve ontojenik değişiklikler bile bitkinin uçucu yağını oluşturan bileşenlerde dikkate değer derecede farklılıklar ortaya çıkarmaktadır. Kimyasal bileşimleri, Gaz

Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) sistemi ile belirlenebilmektedir (49, 50).

Uçucu yağlar genellikle hidrokarbonlar ve oksijenli türevlerinden meydana gelmişlerdir. Bu hidrokarbonların çoğu terpenoit kökenlidir. Çok az bir kısmında aromatik benzen türevleri terpenlerle karışım halindedir. Terpenler ( $C_5H_8$ )n genel formülüne uyan hidrokarbonlardır ve 2 izopren molekülünün kondensasyonu ile meydana gelirler (50).

İki izopren molekülünden oluşan 10 karbonlu terpenler "Monoterpen" ( $C_{10}H_{16}$ ), 3 izopren molekülünden oluşan 15 karbonlu terpenler "Seskiterpen" ( $C_{15}H_{24}$ ), 4 izopren molekülünden oluşan 20 karbonlu terpenler "Diterpen" ( $C_{20}H_{32}$ ) olarak adlandırılırlar. 25 karbonlular "Sesterterpen" ( $C_{25}H_{40}$ ) adını alır ve uçucu yağların bileşiminde bu ana yapılara rastlanır. Terpenlerin oksitlenmesiyle oluşan oksijenli türevler yağa özgü tat ve koku veren bileşiklerdir. Bu oksijenli türevler alkol, keton, ester, aldehit, oksit, eter ve bunlara benzer yapılarda bulunabilirler (49, 50).

### **1.2.1. Uçucu Yağların Sınıflandırılması**

#### **1.2.1.1. 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 bulduklarını 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 bileşimin %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(51,52). Oksijensiz olanları genellikle kolay uçucudurlar ve oldukça düşük derecelerde soğutulmalar 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(53).

#### **1.2.1.2. 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)

#### **1.2.1.3. 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), aldehytler (benzaldehit, sinnamik aldehit), esterler (benzil benzoat, bornil asetat), fenol esteri (anetol, safrol) ve diğer bileşikler (kumarin vs.) bulunmaktadır(51,52,54).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 kaçırma 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(53).

### **1.2.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri**

Uçucu yağ eldesinde 4 temel yöntem kullanılır, bunlar; distilasyon, soğukta sıkma, çözücü ekstraksiyonu ve sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon yöntemleridir (55).

#### **1.2.2.1. Distilasyon**

Bütün tıbbi uçucu yağlar, Limon esansı ve Ardiç katranı hariç, distilasyon yoluyla elde edilirler. Distilasyon ile uçucu yağ eldesinde farklı uygulamalar mümkündür (56).

#### **1.2.2.2. Su distilasyonu (Hidrodistilasyon)**

Uçucu yağ eldesinde bilinen en eski yöntemdir. Yaş ya da kuru materyalden uçucu yağ suyla distilasyon yoluyla elde edilir. Drog su ile birlikte kaynatılınca oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaşır Florentin Kabı adı verilen toplama kabında yoğunluğuna göre suyun üstünde veya altında birikir. Laboratuvar ölçekli uçucu yağ miktar tayini için de bu yöntem kullanılır. Endüstride ki uygulamalara gül yağı üretimi örnek verilebilir (57).

### **1.2.2.3. Buhar distilasyonu**

Bu yöntemde bitki materyali kaynar suyla değil, su buharı ile temasta bırakılır. Modern uçucu yağ distilasyon sistemlerinde drog delikli tava veya sepetlere yerleştirilir. Bir buhar kazanında üretilen ve drog üzerine gönderilen su buharı yağı sürükleyerek soğutucuya (kondenser) götürür. Sıvılaştıran su-yağ karışımı toplama kabında yoğunluk farkından dolayı iki tabakaya ayrılır ve uçucu yağ bu şekilde elde edilir. Bu yöntem buhar distilasyonu denir. Suyun, distilasyon kazanının alt kısmındaki ayrı bir bölmede kaynatılması ve oluşan buharların delikli ızgaranın üstündeki drog tabakasına gönderilmesi halinde yöntem "Su-Buhar Distilasyonu" adı verilir. Bu yöntem az gelişmiş ülkelerde ve kırsal kesimde yapılan distilasyonlarda kullanılır, buhar distilasyonu kadar verimli değildir. Florentin kabı yağın sudan ayrılmasını sağlayan toplama kabıdır. Sudan hafif olan yağlar kabın üst kısmında toplanır ve üst kısmında bulunan bir musluktan yağ alınır. Sudan ağır olanlar ise dipte toplandıklarından dipte bulunan bir musluktan tahliye edilir. Uçucu yağla doymuş haldeki su sisteme yeniden gönderilebilir veya tekrar distile edilebilir. Bu durumda 2. yağ ilk yağ ile karıştırılır ve yağından arındırılmış su "aromatik su" olarak değerlendirilir (56).

### **1.2.2.4. Soğukta Sıkma**

Narenciye esansları gibi bazı uçucu yağlar distilasyon yöntemi ile bozulurlar. Bu yağların elde edilmesi için narenciye kabuklarının yağ içeren hücreleri patlatılır ve açığa çıkan yağ suyla yıkayarak kabuktan alınır. Ayrılan Yağ-su emülsiyonunun santrifüj edilmesiyle narenciye esansı elde edilir. Eskiden kabuklar sünger içinde sıkılır ve süngere geçen yağ sıkılmak suretiyle elde edilirdi. Narenciye usare ve uçucu yağlarının üretimi için günümüzde 2 tip ekstraktör kullanılmaktadır. FMC In Line adı verilen ekstraktör de 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 ekstraktörde ise meyveler

helezon şeklinde ve rendelerle kaplı ekstraktörün 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 soğutulduklarından kumarin türevi maddelerden ibaret bir çökelti vermektedirler (56).

#### **1.2.2.5. Çözücü Ekstraksiyonu**

Drog uygun bir organik çözücü ile (benzen, hekzan, heptan gibi) ekstre edilir. Organik çözücüye geçen uçucu yağ, sabit yağ, renk maddeleri ve mumlar çözücünün alçak basınçta uçurulması sonucu elde edilirler. Bu bakiyeye konkret adı verilir. Konkret etanol ile tüketilirse kokulu maddeler alkole geçer. Alkollü ekstreden mum, yağ gibi maddelerin dondurarak ayrılması sonucu kalan ve absölü adı verilen sıvı kısım parfümeride kullanılır. Uçucu yağ eldesinde kullanılan en pahalı yöntem enfleurage (anfloraj) usulüdür. Bunun için taze drog (özellikle nadide çiçeklerin petalleri) ince bir kokusuz sabit yağ tabakası üzerine serilir. Bir müddet temasta bırakılır. Mekanik yolla veya elle toplanan petallerin yerine tazeleri konur ve petallerdeki uçucu yağların sabit yağa geçmesiyle bir süre sonra doyan sabit yağ kazınarak alınır ve etanolle ekstre edilir. Etanolün alçak basınçta yoğunlaştırılması ile absölü elde edilir. Bu usul halen, nadir de uygulansa, Fransa'da nadide parfümlerin hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir (56).

#### **1.2.2.6. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon**

Aslında genel bir ekstraksiyon yöntemidir. CO<sub>2</sub> gibi sıvılaştırılmış gazlar kullanılarak gerçekleştirilir. Saf CO<sub>2</sub>'in sıvı ve gaz fazda aynı anda bulunabileceği en yüksek sıcaklık ve basınç kritik sıcaklık ve basınçtır. Bu nokta dışında gaz sıkıştırılarak sıvılaştırılmaz. CO<sub>2</sub> 'in kritik noktası 31 °C ve 73 kg/ cm basınçta ve 31 °C de dir. CO<sub>2</sub> 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 değiştirilmesi ile buharlaştırılarak tamamen uzaklaştırılır. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak tekrar kullanılabilir. Elde

edilen ürün diğer metotlarla elde edilenlere oranla çözücü artığı taşımadığından tercih edilmektedir. Aynı zamanda seçici bir yöntemdir (56). Çizelge 1.2’ de ülkemizde yetişen ve uçucu yağ çalışması yapılmış *Centaurea* türleri ve uçucu yağ ana bileşenleri verilmiştir.

**Çizelge 1. 2.** Ülkemizde Yetişen Uçucu Yağ Çalışması Yapılmış Türlerin Uçucu Yağ Ana Bileşenleri

Bitki	Ana bileşenler	Lit.
<i>Centaurea pseudoscabiosa</i> subsp. <i>pseudoscabiosa</i>	Germacrene D, P-sesquiphelladrene, P-caryophyllene	57
<i>C. hadimensis</i>	Germacrene D, P-caryophyllene, Bicyclogermacren	57
<i>C. mucronifera</i>	Germacrene D, P-eudesmol, P-caryophyllene	58
<i>C. chrysantha</i>	Germacrene D, Caryophyllene oxide, Bicyclogermacren	58
<i>C. dichroa</i>	Hexadecanoic acid, Caryophyllene oxide, Spathulenol	59
<i>C. sessilis</i>	P-eudesmol, Caryophyllene oxide, Spathulenol	60
<i>C. armena</i>	P-eudesmol, Calarene, 6,10,14- trimethyl-2-pentadecanone	60
<i>C. saligna</i>	Hexadecanoic acid, Phytol, Caryophyllene oxide	61

### **1.2.3. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kullanılan Yöntemler**

Bitkisel ekstraler ve uçucu yağlar çeşitli amaçlar için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (1, 49, 50, 55, 56, 62- 69). 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 (70). Bu özelliklerinden yararlanılarak uçucu yağlar, çiğ ve işlenmiş gıdaların korunmasında, modern ilaçlarda katkı maddesi ve doğal tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır (62), Bitki ekstraları ve uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yayınlanmış çok fazla sayıda makale bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bir çeşit uçucu yağ bir çok patojen mikroorganizmaya karşı denenirken bazen de bir çok bitki ekstresi ve yağ tek bir mikroorganizma hedef alınarak çalışılmıştır (62, 71-73).

Bu bilgiler çoğu zaman kullanışlıdır ancak, her çalışmada yöntemsel farklılıklar bulunmaktadır. Kullanılan antimikrobiyal test metotları birbirlerinden 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 yüksektir (62, 70).

1960'lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç, özellikle antibiyotik duyarlılık testleri için birçok 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 dilüe edildikten sonra mikroorganizmalar ile etkileştirildiği "Titration (Dilüsyon veya Sulandırma) Yöntemleri" ve besiyerine test edilecek kültürün ekilmesinden sonra besiyeri yüzeyine test maddesi emdirilmiş kağıt disk yerleştirmek suretiyle yapılan "Difüzyon Yöntemleri"dir (74).

Antibiyotiklerin duyarlılıklarını belirlemede kullanılan testler, uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Geçen yüzyıl boyunca uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesini belirlemede birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. 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 besi yeri, kullanılan mikroorganizma ile uçucu yağın yapısal özellikleridir (71).

Uçucu yağların, uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde aktivite gösteren özel kokulara sahip olması gibi özellikleri 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 çok rapor edilen özellikleri antimikrobiyal olanlarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkarıldığı testler belli bir standardizasyona bağlı değildir ve gelişigüzel her laboratuvarında yapılabilmektedir. Kullanılan teknikler genel olarak agar difüzyon ve dilüsyon yöntemleridir (71).

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 (72, 74-76). 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 t p dilüsyon ya da mikrobroth dilüsyon metodudur. Bu metotta, ticari olarak geliştirilmiş, 80, 96 veya daha fazla kuyucuğa sahip plaklar 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 yapılabilir. Bu yöntem en çok antibiyotikler için kullanılsa da bitki ekstreleri ve uçucu yağlar için de kullanılmaktadır. En önemli avantajı 10-25 pl uçucu yağ ile deneyin gerçekleştirilmesidir.  unk  uçucu yağların bol miktarda elde edilmesi oldukça zordur. Bir diğer avantajı da aynı anda bir çok maddenin test edilmesine imkan sağlamasıdır (70, 74-78).

Bu yöntem kullanılarak çeşitli maddelerin antimikrobiyal özellikleri ortaya konmuştur (62, 77, 79), Hammer ve ark.(62) yaptığı bir çalışmada 20 bitkiye ait uçucu yağı mikrodilüsyon broth yöntemini kullanarak test etmiş, 16 uçucu yağın %2 lik (v/v) konsantrasyonunda, kullandıkları tüm test mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiğini diğer 4 uçucu yağın ise MİK değerlerinin %8 (v/v) değerinden büyük olduğunu ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada 22 uçucu yağ, 6 adet fungusa karşı denenmiş, uçucu yağların zayıf antifungal aktiviteye sahip olduğu ve MİK değerlerinin 5000 pg/ml den büyük olduğu ortaya çıkarılmıştır (79), Mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada da Combertum molle bitkisinin ekstresi, *Staphylococcus aureus*' a karşı denenmiş ve MİK değerini 0.56 mg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma da tetrazolyum tuzları kullanılarak mikrotitrasyon petrilerinde sonucu değerlendirmenin daha kolay olduğu ortaya konmuştur (77).

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, 1940'ların başından beri çeşitli maddelerin antimikrobiyal özelliklerinin 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. Besiyerine üzerine, belirli ölçüde açılan çukurlara homojen olarak çözülmüş uçucu yağ koyulur. Çukurlar besiyeri 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 besi yerine, 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 belirli 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 inokülumun 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 inokülum konsantrasyonu kritik seviyede tutulmalıdır. Eğer mikroorganizma yoğunluğu olması gereken değerinde ise inkübasyon süresinin uzunluğu o kadar da önemli olmamaktadır. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları bir cetvelle ölçülerek kaydedilir. Çukurcuklara maddenin artan ya da azalan konsantrasyonları koyularak oluşan zonlarının 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 (70, 71, 73, 74, 76).

Yapılan bir çalışmada *Peucedanum cervaira* (L.) bitkisinin köklerinden izole edilen Falcarindiol ve Juglon maddeleri, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* ve *Fusarium avenaceum* mikrofunguslarına karşı kağıt disk difüzyon yöntemi

kullanılarak denenmiştir. 9mm'lik kağıt disklere 20pl maddenin çözeltilisinden emdirilerek, üzerinde 104 cfu/ml spor solüsyonu bulunan besiyerine yerleştirilmiştir. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve kağıt diskteki madde miktarı MİK değeri olarak verilmiştir. Aynı zamanda mikrodilüsyon broth metodu da denenmiş ve iki yöntem sonuçlarının hemen hemen birbirine benzediği rapor edilmiştir (76).

Yapılan bir diğer çalışmada çeşitli ticari bitkisel ekstrelerin, bir grup bakteri ve fungusu karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Deneyin sonucunda 7 mm den 31 mm ye kadar değişen inhibisyon zonları kaydedilmiş, simültane olarak denen en standart antibiyotik ve antifungal maddelerden kimi zaman daha yüksek inhibisyon zonlarının meydana geldiği bulunmuştur. Araştırma sonucunda genel olarak maddelerin daha çok antibakteriyel etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur (80).

Seçilen 35 Türk tıbbi bitkisinden 76 ekstrenin elde edildiği bir çalışmada, bu ekstreler *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans*'a karşı agar difüzyon yöntemiyle denenmiştir. 1 ile 11 mm arasında inhibisyon çapları ölçülmüş ve en güçlü aktivite *Perganum harmala* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinin ekstrelerinde gözlenmiştir (81). Mehrabian ve ark. (82) tarafından yapılan bir çalışmada *Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* ve *Juglans regia* bitkilerinin sulu, metanolik ve kloroformik ekstrelerinin, havayla taşınan bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal etkileri agar difüzyon yoluyla belirlenmeye çalışılmıştır. Saboraud Dextrose Agar plakları üzerinde 6.4 mm çapında çukurcuklar açılarak içlerine 200'er pl ekstre koyulmuştur. Çalışma sonucunda özellikle *Carthamus tinctorius* bitkisinin sulu ekstresinin tüm mikroorganizmalara karşı, (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*) etki gösterdiği ve 25-40 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturduğu bildirilmiştir. Diğer bitki ekstrelerinin de orta derecede antimikrobiyal etkiye sahip oldukları kaydedilmiştir.

Uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan diğer bir yöntem de biyootografidir. Biyootografi yöntemi

bitki ekstralarının veya saf maddelerin hem bitki hem de insan patojenlerine karşı denenmesinde oldukça kolay ve doğru sonuçlar veren bir yöntemdir. Bu yöntemde uçucu yağın antibakteriyel özellikleri yanında asıl olarak uçucu yağ oluşturduğu organik bileşenlerden hangisinin aktiviteden sorumlu olduğu ortaya koyulmaktadır. Bu yöntem agar difüzyon tekniğinin prensiplerine dayanmaktadır. Ancak test edilecek maddenin uygulanışı ve sonuçların değerlendirilmesi bakımından farklılıklar göstermektedir. En büyük farklılık yöntemde ince tabaka kromatografisi (İTK) tekniği kullanılmakta, uçucu yağ İTK plaklarına uygulandıktan sonra test mikroorganizmalarıyla etkileştirilmektedir. İTK tekniği yardımıyla uçucu yağdaki bileşenler 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 nm UV ışığı altında incelenerek fraksiyonlar işaretlenmektedir. Deneyde kullanılan plağın inkübasyonundan sonra, hangi maddenin üzerinde inhibisyon zonu olduğu belirlenerek o maddenin R/ değeri hesaplanmaktadır. R/ değeri (Retention Factor, Tutunma Faktörü), maddenin plak üzerinde yürüdüğü mesafenin, çözücünün yürüdüğü mesafeye oranı hesaplanarak bulunmektedir. Referans olarak saklanan İTK plağındaki maddeler ile inhibisyon zonlarının olduğu maddelerin R/ 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. Bu güne kadar üç biyootografik metot bildirilmiştir. Bunlar; mikroorganizmanın doğrudan İTK plağı üzerinde geliştirildiği direk biyootografi yöntemi (a), İTK plağında yürütülen maddenin plaktan izole edilerek mikroorganizma ile inoküle edilmiş bir besiyerine aktarılmasıyla gerçekleştirilen kontak biyootografi yöntemi (b) ve son olarak da belirli bir mikroorganizma ile inoküle edilmiş besiyerinin İTK plağının üzerine dökülmesiyle gerçekleştirilen immersiyon biyootografi ya da "Agar-overlay biyootografi"(c) yöntemleridir. Bu son yöntem direk biyootografi ile kontak biyootografinin birleştirilmesinden oluşmaktadır. Direk biyootografi daha çok bakteriler ve spor üreten funguslar için kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça

duyarlıdır ve deney sonunda oldukça net inhibisyon zonları gözlenebilmektedir. Ancak bu yöntemin dezavantajı da İTK plağı üzerinde mikroorganizmaların gelişme zorluğudur. Kontak biyootografi yönteminde bu sorun yoktur ancak İTK plağından maddenin izolasyonu ve transferi bazı problemler doğurmaktadır. Alınan madde miktarı veya İTK da birbirine çok yakın gelmiş maddeler birlikte alındığı için sonuçların duyarlılığı ve doğruluğu tartışmalı hale gelmektedir. Olması gerekenden daha büyük inhibisyon zonları oluşmakta, bu da aktif bileşenler arasındaki ayrımın tam olarak yapılamamasına neden olmaktadır. Her iki yöntemin karışımı olan immersiyon biyootografi tekniğinin ise daha çok mayalar ve bakteriler için kullanıldığı bildirilmiştir. Belirli miktarda besiyerinin İTK plağının üzerine dökülmesiyle aktif bileşenler yerinde test edilmekte ve yeteri kadar besi yeri kullanıldığı için herhangi bir üreme problemi olmamaktadır. Aktif bileşenlerin farklı difüze olma katsayıları bu tekniğin problemi. Buna çözüm olarak İTK plağı üzerine dökülen besiyerindeki agar miktarı azaltılarak yumuşak bir besi ortamı elde edilmekte bu sayede plak üzerindeki bileşenlerin inoküle edilmiş agar içine difüzyonları kolaylaştırılmaktadır. 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 (70-72, 83-88).

Rahalison ve ark. (84) *Swartzia madagascariensis* (*Leguminosae*) bitkisinin ekstrelerini biyootografi yöntemiyle *Candida albicans*'a karşı değerlendirmişler ve deneyin sonucunda İTK plağı üzerinde R/ 0.5 ve 0.82 değerlerinde iki ayrı inhibisyon zonu gözlemişlerdir. 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 *C. albicans*' a karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği de bildirilmiştir.

Biyootografi yöntemiyle yapılan bir diğer çalışmada, *Combretum erythrophyllum* (*Combretaceae*) bitkisinin farklı çözücülerle elde edilmiş ekstreleri, *Staphylococcus*

*aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı denenmiş ve *S. aureus*'a. karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Biyogram plağında 14 ayrı aktif fraksiyon olduğu, ve bu fraksiyonların üzerinde net gözlenebilen zonların olduğu bildirilmiştir. Ancak bu fraksiyonların hangi maddeler olduğu aydınlatılmamıştır (86).

Nostro ve ark. (87) tarafından *Staphylococcus aureus* kullanarak, *Helichrysum italicum*, *Hieracium pilosella*, *Lonicera caprifolium*, *Nepeta cataria*, *Phytolacca dodecandra* ve *Plantago lanceolata* bitkilerinin çeşitli organlarından hazırlanan ekstraler biyootografi tekniği ile denenmiş ve *N. cataria*, *H. italicum*, *P. dodecandra* ekstralarının çok net gözlenebilen zonlar oluşturdukları bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada da farklı ülkelere ait *Mentha piperita* L. (nane) uçucu yağları *Candida albicans*' a karşı biyootografi yöntemi kullanılarak denenmiş ve inhibisyon zonları gözlenmiştir. Bu zonları oluşturan maddeler izole edilmiş ve GC/MS analizi ile tayin edilmiştir. Sonuç olarak nane uçucu yağının *C. albicans*' a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etkinin mentolden ileri geldiği bildirilmiştir (89).

Uçucu maddelerin özellikle de bitkisel uçucu yağların buhar fazındaki antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. En kullanışlı yöntem mikro-atmosfer metodudur. Bu yöntemin genellikle filamentli funguslar için daha uygun olduğu bildirilmiştir. Yöntemde, besiyeri içeren 120 mm ebatlı petri kaplar kullanılmaktadır. Steril distile suda hazırlanan fungal sporlar, son konsantrasyonu 104 spor/spot olacak şekilde besiyerinin merkezine spotlar halinde inoküle edilir. Petri kabının çapı ebadında filtre kağıdına test edilecek yağ, saf olarak değişik miktarlarda emdirilir. Kontrol olarak kullanmak amacıyla plaklardan birine yalnızca mikroorganizma inoküle edilir, test maddesi uygulanmaz. Uçucu yağın farklı miktarlarını denemek için ayrı ayrı petri kapları kullanılmaktadır. Hazırlanan filtre kağıdı petrinin kapağına yerleştirilerek, petri kabı kapatılır ve ters şekilde de 2 ve 12 gün süreyle inkübe edilir. Bu 12 günlük süre boyunca plaklar kontrol edilerek inoküle edilen mikroorganizmanın gelişme durumu kontrol edilmektedir. Bu yöntem ile havadaki fungal ya da bakteriyel yükün yok edilmesi veya zararsız hale getirilmesinde uçucu yağların kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Bu sayede insanlara zarar vermeden kütüphane, müze, hastane, sinema vb. mekanların atmosferini

mikrobiyal flora'ya karşı uçucu yağlarla koruma şansının olabileceği bildirilmiştir. (79), Bu yöntemin bazı modifikasyonları mevcuttur. Bazı araştırcılar saf uçucu yağ filtre kağına emdirmek yerine, petri kabının kapak kısmına direk olarak koymak yoluyla inhibisyonu gözlemişlerdir. Uçucu yağın kaybını engellemek için petri kabının çevresi parafilm ile kaplanmakta ve yine ters biçimde inkübasyona bırakılmaktadır. 3 günlük inkübasyon süresi sonunda petri kabı açılarak uçucu yağın buharı salınmakta ve bir 3 gün daha inkübasyona bırakılmaktadır. Bu ikinci kez yapılan inkübasyon uçucu yağın antimikrobiyal etkisinin bakterisidal özellikte olup olmadığının belirlenmesini sağlamaktadır. Eğer uçucu yağ buharı yalnızca mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmişe bu süre sonunda plaktaki mikroorganizmaların gelişeceği bildirilmiştir (90). Bazı araştırcılar, uçucu yağları değişik çaplarda filtre kağlarına emdirip, farklı miktarlarda uygulayarak, uçucu yağın değil de buhar basıncının bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla uçucu saf maddeler denenmiş ve sonuç olarak buhar basıncının uçucu yağın buhar faz aktivitesini desteklemediği ortaya konmuştur (71).

Mikro-atmosfer yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 37 bitkiye ait uçucu yağ, müze ve kütüphane havasından izole edilen funguslara karşı denenmiş, *Cymbopogon martinii* ve *C. nardus* bitkilerine ait uçucu yağların buhar fazlarının *Aspergillus amstelodami*, *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, *Stachybotrys atra* ve *Myrotechium verrucaria*'ya karşı güçlü fungistatik aktivite gösterdiği bildirilmiş ve bu iki bitkiye ait uçucu yağların kapalı mekanların korunmasında kullanılabileceği rapor edilmiştir (79).

Basım ve ark. (90) *Thymbra spicata* L. var. *spicata* bitkisinin uçucu yağını, ekonomik bakımdan önemli bitki patojenleri olan *Erwinia amylovora*, *E. caratovora* pv. *caratovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* bakterilerine karşı denemiş ve sırasıyla 59, 569, 91, 684, 98 ve 41mg/ml lik konsantrasyonları minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) olarak bildirmişlerdir.

### 1.3. Literatür Özeti

Barrero ve arkadaşları, 6 *Centaurea* türünden elde ettikleri snisin ve salonitenolit ile farklı kaynaklardan elde ettikleri kostunolit, dehidrokostuslakton, liknofolit ve eremantolit gibi farklı yapılara sahip seskiterpen laktonların antifungal etkilerini *Cunninghamella echinulata*'ya karşı incelemiştirlerdir. Farklı yapıya rağmen benzer polariteye sahip kostunolit ve dehidrokostuslakton *C.echinulata*' ya karşı dikkate değer bir antifungal etki göstermektedir. Sonuçlar, seskiterpen laktonların antifungal etkileri ile polariteleri arasında ters orantı hipotezini doğrulamaktadır (91).

Negrette ve arkadaşları *C.chilensis* üzerinde yaptıkları bir çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından izole ettikleri iki seskiterpen lakton bileşiğinin (dehidrokostus ve 8 $\alpha$ -hidroksi-dehidrokostus lakton), antimikrobiyal etkilerini agar difüzyon yöntemi ile incelemiştir. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* suşlarının kullanıldığı deneyde alınan sonuçlar bu bileşiklerin Gram (+) bakterilere karşı etkili olduklarını göstermektedir(92).

Aynı araştırmacılar, *C.floccosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarının kloroformlu ekstresi, etil asetatlı ekstresinin I-B, II-B ve III-B fraksiyonları ve bu ekstrelerden izole ettikleri hispidulin, eriyodiktiyol, taksifolin, kemferol, kersetin ve krizoeriol gibi flavonoidlerin antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştirlerdir. Test maddelerinin antimikrobiyal etkileri agar difüzyon yöntemi kullanılarak *S.aureus*, *S.epidermidis*, *M.flavus*, *B.subtilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* ve *A.niger* suşlarına karşı incelenmiştir. Alınan sonuçlar taksifolin ve etil asetatlı ekstrenin III-B fraksiyonu dışındaki diğer maddelerin Gram (+) bakterilere karşı etkili olduğunu göstermektedir (93).

Gürkan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, *C.hermanii* bitkisinin petrol eteri, kloroform ve etanollü ekstrelerinin antibakteriyel etkisi referans madde olarak ceftazidim, antifungal etkileri ise mikonazol kullanılarak incelenmiştir. Ekstrelerin antifungal etkileri *Candida albicans*, *C.tropicalis*, *C.pseudotropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.guillermoidii* ve antibakteriyel etkileri *Staphylococcus epidermis*,

*S.aureus* 29213, *S.aureus* 25923, *S.pyogenes*, *L.monocytogenes*, *C.diphtheriae*'ye karşı incelenmiştir. Bu çalışmada bakteriler açısından *C.hermannii*'nin petrol eteri ekstresinin *S.aureus* 25923'e karşı, kloroformlu ekstresinin *S.aureus* 29213 ve 25923'e karşı aktivite gösterdiği, kloroformlu ekstresinin *C.albicans* ve *C.glabrata*'da oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olduğu ve petrol eteri ekstresinin *C.glabrata*'ya karşı hafif bir inhibisyon gösterdiği görülmüştür(94).

Sür-Altınır ve arkadaşları *C.hermannii* bitkisinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve etanol ekstralarının antibakteriyel ve antifungal etkilerini disk difüzyon yöntemiyle incelemiştir. Bitkinin kloroform ekstresinin incelenen 6 mayadan *Candida albicans* ve *C.glabrata* üzerinde dikkat çekici etkileri saptanmıştır(95).

Barrero ve arkadaşları *Centaurea* türlerinin halk arasındaki kullanımlarından yola çıkarak Güney İspanya'da yetişen *C.malacitana*, *C.melitensis*, *C.aspera* subsp. *aspera*, *C.aspera* subsp. *scorpiurifolia*, *C.aspera* subsp. *stenophylla* türlerinden izole ettikleri snisin, onopordopikrin, tulipalin B, monoasetil snisin, salonitenolit, stenofillolit ve elemanolit yapısındaki 3 seskiterpen laktonu antimikrobiyal etkileri yönünden incelemiştir. Ketokonazol ve gentamisin'in referans olarak kullanıldığı ve 9 ayrı mikroorganizmaya karşı yapılan deneylerde alınan sonuçlar, snisin dışındaki bileşiklerin belirgin bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir (96).

Vajs ve arkadaşları 1999 yılında, *C.nicolai* üzerinde yaptıkları bir araştırmada, bitkinin toprak üstü kısımlarından izole ettikleri salograviolid A, 9-O-asetil salograviolid A ve 3-O-deasetil-9-O-asetil salograviolid A'nın antifungal etkilerini incelemiştir. Laktonların antifungal aktivitesi modifiye edilmiş agar difüzyon testi kullanılarak *Aspergillus niger*, *A.ochraceus*, *Penicillium ochrochloron*, *Cladosporium cladasporides*, *Fusarium tricinctum*, *Trichoderma viride* ve *Phomopsis helianthi*' ye karşı incelenmiştir. Her üç bileşik de *T.viride* dışındaki bütün funguslara karşı etki göstermektedir. En yüksek etkiyi 9-O-asetil salograviolid A'nın gösterdiği bulunmuştur (97).



*C. sonchifolia* toprak üstü kısımlarından izole edilen onopordopikrin'in antibakteriyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Bu araştırma sonuçları, onopordopikrin'in *Staphylococcus aureus*' a karşı etkili olduğunu göstermektedir(98). Öksüz ve arkadaşları, *C. virgata*, *C. kilea*, *C. inermis* türlerinden izole ettikleri flavonoidlerin antibakteriyel etkilerini incelemiştir. 6-Metoksiapigenin, apigenin, 6-metoksiluteolin-4, 7-dimetileter, 6-metoksiluteolin-3'- metileter, 6-metoksiluteolin-3', 4', 7-trimetileter'in antibakteriyel etkileri, disk difüzyon yöntemi kullanılarak, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*' ye karşı incelenmiştir. Sonuçlar bu bileşiklerin hiçbirinin *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis*' e karşı etkili olmadığını, bunun yanı sıra apigenin'in diğer mikroorganizmalara karşı düşük dozlarda yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (99).

*C. solstitialis* ve *C. depressa* türlerine ait ekstre ve fraksiyonların antibakteriyel etkileri Gram(+) (*Bacillus subtilis*) ve Gram(-) (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriler üzerinde ve antifungal etkileri *Candida tropicalis* suşları kullanılarak mikrodilüsyon metodu ile tespit edilmiştir. Her iki türe ait ana ekstre ve fraksiyonlar *E. coli*'ye karşı kontrole yakın bir etki göstermektedir. Türlerin kloroformlu fraksiyonları ve toprak altı kısımlarının etanollü ekstraları *Pseudomonas*'a karşı dikkate değer etkiye sahiptir. Her iki tür antifungal etkiye sahip değildir (100).

*C. aladagensis* bitkisinden elde edilen uçucu yağların *Escherichia coli* NRRL B-3008, *Enterobacter aerogenes* NRRL B-3567, *Salmonella typhimurium* NRRL B-13311, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, *Candida albicans*, *S. aureus* ATCC 6538 türleri üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir (101).

Başka bir çalışmada ise *C. sessilis* and *C. Armenia* dan elde edilen uçucu yağlar *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC13803 suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri denenmiş bunlardan *Y. pseudotuberculosis*, *E.*

*Faecalis*, *S. Aureus* ve *B. subtilis* üzerinde bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir (60).

Bu çalışmada, Türkiye florasında önemli bir yeri olan *Centaurea* L. cinsine ait *C. kurdica*, *C. antiochia* var. *antiochia*, *C. albonitens* olmak üzere üç bitki örneğinin uçucu yağlarının *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* patojen mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Birçok dünya ülkesinin florasında olduğu gibi ülkemizde de mevcut olan şifalı bitkilerin bilimsel çalışmalarla antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi doğrultusunda *C. kurdica*, *C. antiochia* var. *antiochia*, *C. albonitens* türlerinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yöntemi ile hazırlanan uçucu yağlarının belirtilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Ülkemizde belirli sayıda bulunan bu tür çalışmalara bir katkıda bulunmak, daha sonra çalışılacak farmakolojik çalışmalara ışık tutmak ve bitkilerin halk arasında bilinçli bir şekilde kullanılmasını sağlamak bu çalışmadaki diğer amaçları oluşturmaktadır.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Çalışmaya Konu Olan Bitki Türleri

##### 2.1.1.1. *Centaurea kurdica* Reichardt

İki yıllık. Gövde dik, basit yada birkaç basit dallanmış 50-130 cm. Yapraklar sert, tomentos, parçalanmamış, 15-17 x 9-12 cm, taban yapraklar oblong-ovat tabanda cordat, alt yapraklar oblong. Kapitula 4-15 in a raceme; globoz, 35-40 x 30-40 mm; fillariler imbrikat, tüysüz, dik; dış fillariler ovat, 4-6 x 2.5-3 mm, apendeyç 2-2.5 x 2 mm; orta fillariler ovat, 9-11 x 3-4.5 mm., apendeyç 2-2.5 x 1-2 mm; iç fillariler orbicular, 15-18 x 14-16 mm., apendeyç 1-1.5 x 0.5-1.5 mm saman rengi; fillarilerin tabanını tamamen örter, dekurrent değil, margine entire, 8-15 mm dikenle sonlanır. Çiçekcik pembe, radiant değil; korolla tüpü tüysüz, 10-15 mm, loblar 5-6 mm, linear; filamentler 4-5 mm, puberulent; anterler 6-8 x 0.5-1 mm; sitilus 12-15 mm, sitilus sapı 10-12 mm, sitilus dallanması 1.5-2 mm, tabanda tüylü. Akenler ovat, 7-9 x 4-5 mm, beyazımsı, tüysüz; pappus iki serili, iç seridekiler 1-1.5 mm, dış seridekiler 8-12 mm, skabroz, beyaz. *C.kurdica* örnekleri Muş-Hasköy karayolu 30. km'den toplandı (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *Centaurea kurdica* Reichardt

### 2.1.1.2. *Centaurea albonitens* Turrill.

Çok yıllık. Gövde dik, 20-35 cm., basit tüysüz ve bariz fildişi beyazı. Yapraklar çok sert belirgin damarlı; taban ve alt yapraklar petiollü, orbikulardan ovala yada lanceolat, orta ve üst yapraklar lanceolat, dekurrent, 8-20 x 7-18 cm. Kapitula tek; ovoid, 25-40 x 22-38 mm; fillariler imbrikat, tüysüz; dış fillariler ovat, 4-6 x 2-3 mm, apendeyç 2-2.5 x 2 cm; orta fillariler ovat, 9-10 x 4-4.5 mm, apendeyç 2-2.5 x 1.5-2.5 cm; iç fillariler triangular, 7-8 x 4-5 mm, apendeyç 1-1.5 x 0.5-1.5 cm; apendeyç triangular çoğunlukla alt bölgede rectangular, fillarilerin tabanını tamamen örtmez, kahverengi, 4-6 silialı, silialar 4-7 mm . Çiçekcik sarı, radiant değil; korolla tüpü tüysüz, 13-18 mm, loblar 4-5 mm; filamentler 4-5 mm, puberulent; anterler 7-9 x 0.5-1 mm; sitilus 12.5-14 mm, sitilus sapı 11-12 mm, sitilus dallanması 1.5-2 mm, tabanda tüylü. Akenler oblong, 5-8 x 4-6 mm, beyazımsı, tüysüz; pappus iki serili, iç seridekiler 5-7 mm, dış seridekiler 10-14 mm, skabroz, kahverengimsi. *Centaurea albonitens* örnekleri Van-Özalp karayolu Özalp'e 40 km kala bozkır alanından toplanmıştır (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. *Centaurea albonitens* Turrill.

### 2.1.1.3. *Centaurea antiochia* var *antiochia* Boiss.

Çok yıllık. Gövde dik, 30-100cm, biraz uzun dallı hirsute (bilhassa aşağıda) veya seyrek olarak tomentose'den subglabrous'a kadar. Yapraklar yaygın kısa tüylü, glabrescent, altı aralıklı pinnatifid veya pinnatisect çok sayıda lanceolate lateral segmentli, düz kenarlıdan dentate'ye kadar veya pinnatilobate, uç segmentler bazen biraz büyük, orta yapraklar pinnatifid'den lyrate'ye kadar. İnvolutrum 20-27(16-) 18-25 mm, subglose'den ovoid'e kadar. Uzantılar kısa, kahverengi, 5-13 silin (2-5 (-7)mm) her biri yan tarafta, tedricen uç dikenle daralır, 5-25mm papus 5-9(-12)mm. Çiçeklenme zamanı 5-6. aydır. Maki, Pinus brutia ormanları, kayalık yamaçlarda, 150-500(-1000)m'de yayılış gösterir. Uzantılar (diken dahil) (10-) 15-25mm(65). *Centaurea antiochia* var *antiochia* Boiss. örnekleri Hatay Amanos Dağlarından toplanmıştır.



Şekil 2.3. *Centaurea antiochia* var *antiochia* Boiss.

### 2.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için yapılan deneylerde insan, hayvan ve gıdalarda patojen olan mikroorganizmalar seçilmiştir. Çalışmada, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuarlarından temin edilen *Staphylococcus aureus* NRRL-B 767, *Bacillus subtilis* NRS-744,

*Micrococcus luteus* NRRL-B-4375, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 olmak üzere 5 adet standart bakteri suşları kullanılmıştır.

#### **2.1.2.1. *Staphylococcus aureus***

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

Stafilokoklar basit besiyerlerinde üreseler de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve kolonilerinin etrafında tam hemoliz meydana getirir. 37 °C de ve pH 7,4 de iyi ürer. Jeloz besiyerinde ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yapar. *Staphylococcus aureus* altın sarısı renginde pigment oluşturur. Isıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre daha dayanıklı oldukları gibi Stafilokoklar hızla kemoterapötiklere direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen kökenler haline dönüşürler. Betalaktamlara karşı direnç bunları parçalayan betalaktamaz fermenti yapmaları ile oluşur. fermenti yapmaları ile oluşur (102).

#### **2.1.2.2. *Bacillus subtilis***

Sporları doğada çok yaygın olup, toz, toprak, gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan bu bakteri, yaklaşık olarak 0.5-0.8 µm eninde, 1.5-3 µm boyunda, aerob, sporlu, Gram pozitif basillerdir. Bakteri aslında saprofit olmakla beraber doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içine girmesi sonucunda panoftalmi, iridosiklit gibi göz yangıları meydana getirebilir. Ekmeğin yumuşayarak bozulmasına neden olur (103). İnsan ve hayvanlarda besin zehirlenmelerine yol açan fırsatçı patojenlerdir. *B. subtilis*, insanda bakteriyemi, septisemi, endokardit, solunum yolu enfeksiyonları ve besin zehirlenmelerine neden olur (104).

### 2.1.2.3. *Micrococcus luteus*

Gram pozitifler, stafilokoklardan bazı genetik ve biyokimyasal özellikleriyle ayrılırlar. Tetrad veya düzensiz kümeli koklar halinde görülürler. Sarı, yeşilimsi veya turuncu renkli koloniler oluşturabilirler. Doğada her yerde bulunabildiği için fırsatçı patojen olarak izole edilir. Mikrokoklar gıdalarda da sıklıkla rastlanan istenmeyen mikroorganizmalardır. Gıdalarda Staphylococcus türleri ile birlikte aranır ya da sayılır. (105)

### 2.1.2.4. *Escherichia coli*

Yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 1- 1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak basil şeklinde bakterilerdir. Peritriş kirpikleri ile hareketlidir, fakat hareketleri yavaştır. Hareketsiz suşlar da vardır. Bazı suşları kapsüllüdür. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanır ve gram negatiftir (104). *E. coli*, doğumdan birkaç saat veya birkaç gün içinde, sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal yoluna yerleşir. Bağırsakların normal flora üyesi olan *E. coli*, bağırsakların patojen mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonunu önlemeye çalışır. *E. coli* aynı zamanda insan için önemli bir fırsatçı patojendir ve çoğu bakteriyel infeksiyonun sorumlusudur. Bağırsaklarda diyare oluşturan suşları dışında, kommensal olarak yaşarlar. Ancak vücutta başka bir organa, dokuya geçtiklerinde infeksiyona neden olurlar (104). *E. coli*'nin birçok suşu ince barsaklara yerleşerek ağır sıvı kayıplarıyla seyreden diyareye neden olurlar. Diğer bazı suşları kalın bağırsağa yerleşerek dizanteriye neden olurlar. Bazı suşlarının ürettiği Shiga toksini kana geçerek hemolitik üremik sendroma neden olur ve kırmızı kan hücreleri ve böbreklerde hasara yol açar (106). Bağırsak dışındaki *E. coli* infeksiyonları, üriner yol infeksiyonları, solunum yolu infeksiyonları, menenjit (özellikle yenidoğanda) ve bakteriyemi'dir. Aynı zamanda septik artrit, endoftalmit, karaciğer absesi, endokardit, osteomyelit, prostatit, sinusit, tromboflebit ve diğer infeksiyonlar da görülebilir (104).

### **2.1.2.5. *Enterococcus faecalis***

Gram pozitif, tekli yada çiftli zincirli koklardır. Aerob olup, hücreye ekstrasellüler yerleşirler. Kanlı agarda gri-beyaz, değişken koloniler şeklinde ürerler genelde hareketsizdirler. Ekzotoksinleri yoktur. Antibiyotiklere karşı rezistan özellikleri bilinen Entrekoklarını kalp kapaklarına ve üriner sistemdeki epitel hücrelerine yapışma kabiliyetleri vardır. Virülans mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır. Üst (piyelonefrit) ve alt (sistit) idrar yolu infeksiyonlarına neden olur. İdrar yolu infeksiyonları, intraabdominal infeksiyonlar ve hemodializ sırasında veya iv yoldan kateter uygulamaları sonucu hastane infeksiyonlarından sonra görülür. Kronik hastalıklar veya diyabet gibi hastalıklar bakteriyemi için predispozisyon oluşturur. Genellikle fataldir. Bakteriyemi sonrasında görülür. Enterokoklar sadece anormal veya prostetik kalp kapaklarını infekte eder. Tedavi edilmezse fatal sonuçlanır. Gastrointestinal sistemdeki normal florada bulunur. Kan dolaşımına karışarak infeksiyonlara neden olur. Genellikle hastanelerde ekzojen olarak kazanılır (nozokomiyal)(107).

### **2.1.3. Kimyasal maddeler:**

#### **2.1.3.1. Dimetil sülfoksit (DMSO)**

Kimyasal formülü  $(CH_3)_2SO$  olan bileşik  $189^\circ C$ 'de kaynar ve erime noktası  $20^\circ C$ 'dir (108). Saf DMSO kokusuz ve renksiz bir sıvıdır ve hem polar hem de nonpolar bileşikleri çözebilen polar aprotik bir çözücüdür. Üstün çözme gücü nedeniyle kimyasal reaksiyonlarda çözücü olarak kullanılır. DMSO karbonhidratlar, polimerler, peptidler gibi organik maddelerin çoğunu çözebildiği gibi inorganik tuzları ve gazları da çözebilir. PCR reaksiyonlarında DNA primerleri ya da DNA kalıplarında sekonder yapıların oluşmasını engellemek için kullanılır. Ancak DMSO'nun PCR'da kullanımı mutasyonu artırır. DMSO ayrıca hücrelerin ölmesini engellemek için yapılan dondurma işleminde bir kriyoprotektan olarak ortama ilave edilir. Kriyobiyojide organ, doku ve hücre süspansiyonlarının korunması için kullanılan kriyoprotektan vitrifikasyon karışımının önemli bir bileşenidir. Embriyonik kök hücreleri ve hematopoetik kök hücrelerinin uzun süreli dondurularak saklanması



kullanılan oldukça önemli bir bileşiktir (109). Çalışmalar esnasında Sigma Chemical Company tarafından üretilen DMSO kullanılmıştır.

#### **2.1.4. Besiyeri**

Stok kültürlerden Nutrient Agar içeren petrilere ekim yapılarak çalışma kültürleri oluşturulmuştur. Hazırlanan mikroorganizma suşlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için uygulanan çalışmalarda Mueller Hinton Broth (*BioChemika 70192*) kullanılmıştır.

#### **2.1.5. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler**

- GPS
- Bitki Öğütme Değirmeni
- Clevenger Seti
- Mantolu ısıtıcı
- GC-MS
- Mikropipet Seti
- Deney Tüpleri
- Mikrotitrasyon Petrileri
- Etüv
- Otoklav
- Hassas Terazî
- Buz dolabı
- -80 Derin Dondurucu
- Biyogüvenlik Kabini
- Benmari
- Vorteks
- Densitometre

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Öğütülmesi

Araştırmaya ait bitki örneklerinden *C. kurdica* Muş- Hasköy yolu 30. km'den 1322 m'den; *C. albonitens* Van-Özalp karayolu Özalp ilçesine 40 km kala 2000 m'den toplanmış ve Dr. Faik Ahmet KARAVELİOĞULLARI tarafından teşhis edilmiştir. Diğer bitki örneği olan *C. antiochia var antiochia* Boiss. Hatay Amanos dağlarından toplanmış olup Doç.Dr.Sezgin ÇELİK ve Dr. Faik Ahmet KARAVELİOĞULLARI tarafından teşhis edilmiştir.

Toplanan bitki örneklerinin toprak üstü kısımları doğrudan güneş ışığının olmadığı oda sıcaklığında 2 hafta süre ile uygun koşullarda kurutulmuştur. Daha sonra bitki öğütme değirmeni (Uslutech marka D 3000) kullanılarak mekanik olarak parçalanarak toz haline getirilmiştir.

### 2.2.2. Uçucu Yağların Eldesi

200 gr tartılan toz halindeki bitki örneklerine 2,5 L çeşme suyu eklenerek sulu ekstraktlar elde edilmiştir. Sulu ekstraktlar clevenger cihazında 3 saat süre ile hidrodistilasyon işlemine tabi tutulmuş, bu işlem daha fazla uçucu yağ elde etmek için 3 kez tekrarlanmıştır.

### 2.2.3. Kimyasal Bileşimler

GC-MS analizleri Shimadzu 2010 GC-MS sistemi ile yapılmıştır. Elektron iyonizasyon etkisi 70 eV altında tam tarama modunda iyon trap dedektörlü kütle spektrometrisi kullanılmıştır. Analiz için kullanılan kromatografik kolon HP-5'dir. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk akışkanlıkta helyum gazı kullanılmıştır. Enjeksiyon 230 °C'de splitless modunda yapılmış; 1 µl uçucu yağ HPLC gradientli hekzan ile birlikte başlangıç kolon sıcaklığı 60 °C olan fırının sıcaklığı 5 °C/dk artışla 13 dk'da 260 °C yükseltılarak incelenmiştir. Ayrılmış bileşiklerin bağıl yüzde miktarlarının iyon kromatogramları, bilgisayar entagretörü aracılığıyla hesaplanmıştır. WILEY/NIST

KÜTÜPHANESİ kullanılarak kimyasal olarak uçucu yağların içerikleri belirlenmiştir (60).

#### 2.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Dilüsyon teknikleri bir mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılığını tayin etmek için geliştirilmiştir. Ancak bitki ekstraktları veya uçucu yağların da antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu metotta, ticari olarak geliştirilmiş 80, 96 veya daha fazla kuyucuğa sahip plaklar kullanılmaktadır. Bu kuyucuk serilerinde madde dilüsyonları hazırlanmakta ve az miktarda kültürün ilavesiyle, madde ve mikroorganizma etkinleştirilmektedir. 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 konsantrasyon değeri, Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak tanımlanmaktadır (77, 110).

Antimikrobiyal testler için, 96 adet “U” tipi kuyucuklara sahip, steril mikrotitrasyon petripleri (Brand) kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarından elde edilen uçucu yağlardan

a- *C.antiochia var antiochia* 75 µL uçucu yağ + 425 µL DMSO

b- *C.kurdica* 175 uçucu yağ µL + 325 µL DMSO

c- *C.albonites* 75 µL uçucu yağ + 425 µL DMSO şeklinde stok solüsyonlar hazırlanarak içerisinde 500 µL DMSO bulunan ependorf tüplerinde tekrar seri dilüsyon yapılarak madde miktarı ½ den 1/1024 oranında seyreltilmiştir.

Böylelikle *C.antiochia var antiochia* için başlangıç miktarı 75 µL /mL olan konsantrasyon, 0,073 µL / mL’ye kadar; *C.kurdica* için başlangıç miktarı 175 µL / mL olan konsantrasyon, 0,170 µL / mL’ye kadar; *C.albonites* için başlangıç miktarı 75 µl/ mL olan konsantrasyon, 0,073 µL / mL’ye kadar seyreltilmiştir.

Bu şekilde seyreltilmiş olan uçucu yağlardan 96 kuyucuklu petrinin sütunlarına 100'er µL eklenmiştir. Bu işlem yapıldıktan sonra; 96 kuyucuklu petrinin A satırına *S.aureus*, B satırına *B.subtilis*, C satırına *M.luteus*, D satırına *E.fecalis*, E satırına *E.coli* test mikroorganizmalarından Mc.Farland 0.5 e göre  $10^8$  CFU/mL yoğunlukta ayarlanmış olan bakteri süspansiyonları 100'er µL ekim yapılarak 37 C° de bir gün inkübasyona bırakılmıştır. 11. sütuna sadece DMSO ve bakteri süspansiyonu ve 12. sütuna sadece bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Elde Edilen Uçucu Yağların Miktarları

Sulu ekstrelerden elde edilen uçucu yağ miktarları Çizelge 3.1’de verilmiştir

**Çizelge 3.1. Elde edilen uçucu yağ miktarları**

Bitki Türü	Uçucu yağ miktarı (mL)			
	1. tekrar (mL)	2. tekrar (mL)	3. tekrar (mL)	Toplam (mL)
<i>C.kurdica</i>	0,1	0,1	0,1	0,3
<i>C.antiochia var. antiochia</i>	0,05	0,05	0,05	0,15
<i>C.albonites</i>	0,1	0,1	0,1	0,3

Buna göre, toplamda 600’er g öğütülmüş *C.kurdica*’dan 0,3 mL; *C.antiochia var. antiochia* ‘dan 0,15 mL; ve *C.albonites*’den 0,3 mL uçucu yağ elde edilmiştir.

#### 3.2. Uçucu Yağların Kimyasal Analiz Sonuçları

Yapılan GC-MS analizine göre elde edilen uçucu yağların kimyasal içerikleri Çizelge 3.2.’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2. Uçucu Yağların Kimyasal Analizi**

LRIa (a: HP-5 MS column)	İÇERİK	% Miktar <i>C. kurdica</i>	% Miktar <i>C. antiochia var. antiochia</i>	% Miktar <i>C. albonites</i>
1004	3-Carene		1,4	
1098	Linalool	0,15		
1104	n-Nonylaldehit	0,18		
1142	Allocimene		1,01	
1217	carveol		0,75	
1221	$\beta$ -cyclocitral	0,28		
1229	Carveol		3,25	
1378	$\alpha$ -Copaene	2,65		2,84
1411	$\alpha$ -cedrene	0,15		
1420	trans $\beta$ -caryophyllene	3,75		1,25
1421	Caryophyllene	14,24	18,23	7,75
1436	$\gamma$ -Elemene	2,86		4,45
1440	Aromadendrene	0,28		0,15
1455	$\alpha$ -Humulene	4,62		3,78

**Çizelge 3.2. (devam)**

1477	Germacrene	11,95	27,37	9,23
1484	$\beta$ -Ionene	1,89		
1489	$\beta$ -Selinene			1,12
1500	$\beta$ -Farnesene	9,78		3,15
1532	epiglobulol	0,55		
1550	$\alpha$ -Cedrol	0,13		0,34
1564	d-Nerolidol	1,15		1,17
1579	Spathulenol	7,73	29,86	7,97
1583	Caryophyllene oxide			16,45
1604	Glubulol	5,58		
1611	Cubenol	2,25		1,85
1612	$\alpha$ -Cadinol	2,19		1,23
1638	Thujyl alkol		0,5	
1648	$\beta$ -Eudesmol	4,04		
1685	valerenol	0,42		0,98
1713	$\alpha$ -santalol	1,21	1,48	
1919	farnesylacetone			0,65
1947	Cembrene	2,39		4,75
1950	Phytol	3,93		6,25
1958	Hekzadecanoic asit	1,45	7,21	1,35
2100	heneicosane			0,42
2358	diethylphthalate	0,44		1,25
2570	Farnesol	0,34		0,28
3000	triacontane			0,23
MS	D-Fencyl alkol	0,24		0,12
MS	6-methyl-1-heptanol	0,19		
MS	Decyl aldehit	0,19		
MS	(E,E)-2,4-Heptadienal	0,18		
MS	Palmitik aldehit	2,48		
MS	1,2-Lungidione	0,32		
MS	Amylcarbinol		0,36	
MS	$\beta$ -Selinenol			4,57
MS	Neryl-linalool			0,35
	<b>TOPLAM %</b>	<b>90,18</b>	<b>91,42</b>	<b>83,93</b>

Buna göre *C. kurdica*'da baskın olarak Caryophyllene %14,24;  $\alpha$ -Humulene %4,62; Germacrene %11,95;  $\beta$ -Farnesene %9,78; Spathulenol %7,73; Glubulol %5,58;  $\beta$ -Eudesmol %4,04 maddeleri; *C. antiochia var. antiochia*'da baskın olarak Caryophyllene %18,23; Germacrene %27,37; Spathulenol %29,86; Hekzadecanoic

asit %7,21 maddeleri; *C. albonitens*'de baskın olarak  $\gamma$ -Elemene %4,45; Caryophyllene %7,75; Germacrene %9,23; Spathulenol %7,97; Caryophyllene oxide %16,45; Cembrene %6,25; Phytol %4,75;  $\beta$ -Selinolenol %4,57 maddelerinin varlığı tespit edildi.

### 3.3. Antimikrobiyal Etki

İnkübasyon sonucunda, uçucu yağ ve bakteri inoküle edilen kuyucuklarda inhibisyon zonu görülmezken 11. ve 12. Sütunlardaki kuyucuklarda inhibisyon zonları görülmüştür.

**Çizelge 3.3.** Uçucu Yağların Test Mikroorganizmalardaki Antimikrobiyal Etkisi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F												
G												
H												

- : Şeffaf, inhibisyon yok • : Az bulanık + : Bulanık

A: *S.aureus*, B: *B.subtilis*, C: *M.luteus*, D: *E.fecalis*, E: *E.coli*

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde önemli bir yeri olan *Centaurea* cinsinin değişik kısımlarının gerek halk arasındaki kullanılışı ve gerekse literatürlerde belirtilen ulusal ve uluslar arası birçok biyolojik aktivite çalışmalarının yapılmış olması göz önüne alınacak olursa bu bitkilerden eczacılık ve tıp alanlarında değişik amaçlarla yararlanılabileceği ve bu açıdan üzerinde daha fazla çalışmaya değer olduğu anlaşılmaktadır (109).

Araştırmamızda incelenen bitkilere ait uçucu yağların patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Barış ve ark. (2006) da *Achillea biebersteinii* Afan. (*Asteraceae*) türünden elde ettikleri uçucu yağlarla yaptıkları çalışmada test mikroorganizmalarından *B. subtilis* ve *E. faecalis*'de bu yağların antimikrobiyal etkilerini gözleyememiş, *E. Coli*'de 250 µg/ml'de, *S. Aureus*'da 500 µg/ml'de MİK değerinin olduğunu göstermişlerdir. Hammer ve ark. (1999) çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarıyla yaptıkları çalışmada *S. aureus*, *E. faecalis* ve *E. coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gözlemlemişlerdir (62, 111). Yaptığımız çalışmada kullandığımız bitkilerin uçucu yağlarının en düşük seyreltme oranlarında bu bakteri türlerine karşı antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan bu bitkiler infeksiyon hastalıkların tedavisi için üretilen yeni ilaçların antimikrobiyal ajanları olarak kullanılabilirler.

Farmasötik etkilerin güçlülüğü bitkinin genetik yapısına, yetiştiği yere, toplandığı zamana ve depolanma süresi gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Bitkisel ürünlerin aktivitesi iklim değişikliklerine bağlı olarak yıldan yıla değişir. Bunlara ek olarak bitkinin gerek kimyasal, gerekse mikrobiyal kontaminantlarla kirletilmemiş olması gerekir. Ayrıca ekstraksiyon süreci de bitkisel ürünlerin etkilerinin belirlenmesinde önemlidir, çünkü aşırı fraksiyon ve izolasyon aktivitenin azalmasına neden olabilir (112-114).

Tam kontrollü bir sistemin kurulması için, bitkiler standart üretim ve uygun zirai uygulama metodları kullanılarak yetiştirilmelidir (114). Bu sistemler bitkisel ilaçların gelecekteki üretimi için çok daha uygundur (112). Bu araştırmanın sonuçları



incelendiğinde, çalışmada kullanılan bitki örneklerine ait uçucu yağların, bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bakterilerde antibiyotik direncinin artmasına karşılık antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazandığı görülmemektedir. Bunun yanı sıra, günümüzde hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların bazı yan etkilerinin ortaya çıkması, bitkilerle tedaviye olan ilginin artmasına neden olmuştur. Bu bitkilerin geleneksel kullanımının bilimsel olarak açıklanması, bitkilerin ne için ve nasıl kullanılmaları gerektiği ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır (109).

Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında, daha sonra yapılacak olan çalışmalarda, antimikrobiyal aktivitesi belirlenen uçucu yağlardaki etken maddeler belirlenebilir. Zira yaptığımız GC-MS analizinde, bitki uçucu yağlarının son dilüsyon oranlarında dahi antimikrobiyal etkilerinin gözlemlenmiş olmasından dolayı bu üç bitkide de ortak bulunan Caryophyllene, Germacrene, Spathulenol, Hekzadecanoic asit bileşiklerinin antimikrobiyal etki gösteren etken maddeler olduğu fikrini vermiştir.

Etkili olan bileşikler bitkiden izole edilerek canlı dokular üzerinde de etkisi denendikten sonra, söz konusu patojen mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklara karşı ilaç yapımında kullanılabilir.

Özer ve ark. (2001), sentetik olarak üretilen ilaçlar, bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesi suretiyle yapıldığını ve bu nedenle hastalık etmenleri sade bir yapısı bulunan sentetik ilaçlara karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebildiğini belirtmektedirler (115). Buna karşılık; bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte kompleks bir yapı oluşturduklarından hastalık etmenlerinin bu yapıyı çözerek dayanıklı ırklar oluşturması daha zor olmaktadır. Böylece; bitkisel kökenli ilaçlara karşı hastalık etmenleri ırk oluşturma olanağı çok zor olmaktadır. Çok zaman bitkisel kökenli ilaçların patojenlere karşı etkinliği az, fakat kullanılma süresi daha uzun olmaktadır (109).

Bu yüzden antibiyotiklere alternatif olarak bitkilerin ve bitkisel ürünlerin geleneksel antimikrobiyaller olarak kullanılmaları önerilmektedir. Aynı zamanda sentetik

kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması nedeniyle bitki ve bitkisel ürünlerin kullanılması bu yönden avantajlıdır (116). Türkiye mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Ülkemizin mevcut bitki potansiyelinin, çeşitli endüstri sahalarında kullanımı, dünyada yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde çok önemli olabileceği görülebilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de son yıllarda doğal zenginliklerin yavaş yavaş tükenmesi ve ekonomik olarak girilen çıkmazlar, doğal ürünlerin çok amaçlı kullanımını zorunlu kılmıştır (117).

Yapılan bu çalışmada bitkiler her ne kadar mevsiminde toplansa da elde edilen uçucu yağların miktarının düşük olduğu gözlemlendi. İstenmeyen bu sonuç çalışmamızda belirli konsantrasyonlara kadar MİK testinin yapılmasına izin verirken daha düşük konsantrasyonlarda MİK testinin ve agar jel difüzyon testlerinin yapılmasına izin vermemiştir. Bu nedenle hacimsel olarak en düşük konsantrasyonlarda bile üç bitki türünün uçucu yağlarının belirtilen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiş olması en azından ilerleyen dönemlerde bu bitkilerden tekrar yapılacak olan çalışma için yol göstermiştir. Bundan sonraki aşamalarda ilk önce kütlece daha fazla bitki örnekleri toplanacak ve elde edilen uçucu yağlardan daha küçük konsantrasyonlarda MİK testleri yapıp agar jel difüzyon testleri ile birlikte kesin sonuçlar verilecekve daha çok mikroorganizma türü üzerinde çalışmalar yapılacaktır.

Sonuç olarak, özetle; çalışmada kullanılan üç bitki örneği test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- (1) Baytop T., Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999.
- (2) Fabricant D.S. , Farnsworth N.R. . The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environ Health Perspect. 109: 69 – 75, 2001.
- (3) Balandrin M.F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., and Bollinger, W.H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. Science 228:1154–1160, 1985.
- (4) Baytop T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün) İ.Ü. Yayın no: 3255, Eczacılık Fak. Yayın no: 40, İstanbul, 520 s., 1984.
- (5) Başaran S., Elmalı yöresinde doğal olarak yetişen bazı bitkilerin etnobotanik özellikleri, Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi, 5, Antalya, 2003.
- (6) Çakıroğlu E., Erdoğan T.Ö., Tıbbi ve Ticari Amaçlı Kullanılan Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri, OT Sistemik Botanik Dergisi, 9, 1:111, 2002.
- (7) Uğuz T.M., Nacar Ş., İlçim A., *Salvia tomentosa*, *Micromeria fruticosa* subsp. *Brachycalyx* ve *Rhus coriaria* Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri, OT Sistemik Botanik Dergisi, 8, 2: 121, 2002.
- (8) Farnsworth N. R., Soejarto D. D. Potential consequences of plant extinction in the U.S. on the availability of prescription drugs. Econ. Bot. 39, 231-240, 1985.
- (9) Pezzuto J. M. Plant-derived anticancer agents. Biochem. Pharmacol. 53:121–133, 1997.
- (10) Kintzios E.Z., Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research, Critical Reviews in Plant Sciences, 25:79–113, 2006.
- (11) Celik S., Rosselli S., Maggio A.M., Raccuglia R.A., Uysal I., Kisiel W., Bruno M., Sesquiterpene lactones from *Anthemis wiedemanniana*, Biochemical Systematic and Biology, 33: 952-956 2005.
- (12) Celik S., Rosselli S., Maggio A.M., Raccuglia R.A., Uysal I., Kisiel W., Michalska K., Bruno M., Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*, Biochemical Systematics and Ecology, 34: 349-352, 2006.
- (13) Shoeb M., MacManus S.M., Jaspars M., Nahar L., Kong-Thoo-Lin P., Celik S., Sarker S.D., Lignans and flavonoids from the seeds of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. Ex. Bornm. and *Centaurea huber-morathii* Wagenitz, Polish Journal of Chemistry, 81: 39–44, 2007.
- (14) Ozkan G., Göktürk R.S., Unal O., Celik S., Determination of the volatile constituents and total phenolic contents of some endemic *Stachys* Taxa from Turkey, Chemistry of Natural Compounds, 42(2): 172-174, 2006.
- (15) Erdemgil Z., Rosselli S., Maggio A.M., Raccuglia R.A., Celik S., Michalska K., Kisier W., Bruno M., An unusual pregnane derivative and dibenzylbutyrolactone lignans from *Centaurea scrolelepis*, Polish Journal of Chemistry, 80, 647-650, 2006.
- (16) Shoeb M., MacManus S.M., Kong-Thoo-Lin P., Celik S., Jaspars M., Nahar L., Sarker S.D., Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae), DARU, 15(3): 118-122, 2007.

- (17) Shoeb M., MacManus S.M., Jaspars M., Kong-Thoo-Lin P., Nahar L., Celik S., Sarker S.D., Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(2): 155-159, 2007.
- (18) Delazar A., Celik S., Yucel E., Nahar L., Sarker S.D., Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, 3<sup>rd</sup> international Congress of Health, Environment & Natural Products, Mashhad, Iran, 25-28 September 2004.
- (19) Aslan S., Vural M., Sahin B., Celik S., Karaveliogulları F.A., Presence of *Centaurea regia* Boiss. subsp. *regia* (Subgen. *Cynaroides* (Boiss. ex Walp.) Dostál, Compositae) in Turkey, *Biological Diversity and Conservation* 3/2 185-191, 2010
- (20) Wagenitz, G., *Centaurea* L. in "Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Ed. Davis, P.H V, Edinburgh University Press, Edinburgh, 465-586 (1975).
- (21) Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 316,1999.
- (22) Erol, M.K., Tuzlacı, E., Eğirdir (Isparta) Yöresinin Geleneksel Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkileri, "XI.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, Ed. Coşkun, M, Ankara Üniversitesi EczacılıkFakültesi Yayınları No:75, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 466-475 ,1997.
- (23) Barrero, A.F., Herrador, M.M, Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., Gravalos, D.G., "Cytotoxic Activity of Flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*" , *Fitoterapia*, 68(3): 281-283 ,1997.
- (24) Farrag, N.M., Abd El Aziz, E.M., El-Domiaty, M.M, El Shafea, A.M., "Phytochemical Investigation of *Centaurea araneosa* Growing in Egypt" , *Zag. J. Pharm. Sci.*, 2(1): 29-45 ,1993.
- (25) Gürkan, E., Sarioğlu, İ., Öksüz, S., "Cytotoxicity Assay of Some Plants From Asteraceae" , *Fitoterapia*, 69(1): 81-82 ,1998.
- (26) Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M., Girre, L., "Chemical and Biological Activity of the Genus *Centaurea*", *Pharm. Acta. Helv.*, 67(7): 178-188 ,1992.
- (27) Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriatre, E., Calleja, M., "Preliminary Study of the Potential Vasodilator Effects on Rat Aorta of *Centaurein* and *Centaureidin*, Two Flavonoids from *Centaurea corcubionensis*" , *Planta Med.*, 64(2): 116-119 ,1998.
- (28) Negrete, R., Backhouse, N., Avendano, S., San Martin, A., "Dehydrocostus Lactone and 8 $\beta$ -hydroxydehydrocostus Lactone in *Centaurea chilensis* Hook and Arn.", *Plant. Med. Phytother.*, 18(4): 226-232 ,1984.
- (29) Negrete, R., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B.K., Breitmaier, E., Eckhardt, G., "Two New Antiinflammatory Elemanolides from *Centaurea chilensis* ", *J. Ethnopharmacol.*, 40(3): 149-153 ,1993.
- (30) Sepulveda, S., Delhvi, S., Koch, B., Zilliken, F., "Constituents of *Centaurea chilensis*" *Fitoterapia*, 65(1): 88-89 ,1994.
- (31) Baytop, T., Türkiye' de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İlaveli İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul ,1999.
- (32) Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., *Traditional Medicine in Turkey VIII. Folk Medicine in East Anatolia: Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır Provinces*, *Economic Botany*, 51 (3), 195-211 ,1997.

- (33) Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshuri, Y., Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces, International Journal of Pharmacognosy, **32(1)**, 3-12, 1994.
- (34) Honda, G., Sezik, E., A report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey (1986), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 1988.
- (35) Baytop, T, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, No: 578, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara, 1994.
- (36) Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Traditional Medicine in Turkey X. Folk Medicine in Central Anatolia, Journal of Ethnopharmacology, **75**, 95-115, 2001.
- (37) Ertuğ, F., Plant used in domestic handicrafts in Central Turkey, Ot Sistematik Botanik Dergisi, **6 (2)**, 57-68, 1999.
- (38) Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Traditional Medicine in Turkey V. Folk Medicine in the Inner Taurus Mountain, Journal of Ethnopharmacology, **46**, 133-152, 1995.
- (39) Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T., Traditional Medicine in Turkey VI. Folk Medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın Provinces, Journal of Ethnopharmacology, **53**, 75-87, 1996.
- (40) Fujita, T, Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, T., Traditional Medicine in Turkey VII. Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions, Economic Botany, **49 (4)**, 406-422, 1995.
- (41) Sadıkoğlu, N., Alpınar, K., Etnobotanik Açısından Bartın, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 2001.
- (42) Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshuri, Y., Traditional Medicine in Turkey IV. Folk Medicine in the Mediterranean Subdivision, Journal of Ethnopharmacology, **39**, 31-38, 1993.
- (43) Gürbüz, İ., *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* Bitkisinin Antiülserojenik Aktivitesi Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2002.
- (44) Sezik, E., Zor, M., Yeşilada, E., Traditional Medicine in Turkey II. Folk Medicine in Kastamonu, International Journal of Pharmacognosy, **30 (3)**, 233-239, 1992.
- (45) Tuzlacı, E., Erol, M. K., Turkish Folk Medicinal Plants. Part II. Eğirdir (Isparta), Fitoterapia, **70**, 593-610, 1999.
- (46) Sayar, A., Güvensen, A., Ozdemir, F., Öztürk, M., Muğla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri, Ot Sistematik Botanik Dergisi, **2**, 1, 151-160, 1990.
- (47) Ekim, T., *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. & Mey., The Karaca Arboretum Magazine Vol. II, Part 3, p. 137, 1994.
- (48) Arif, R., Küpeli, E., Ergun, F., The Biological Activity of *Centaurea* Species (Review), Gazi University Journal of Science, **17 (4)**, 149-164, 2004.

- (49) Evans, W.C., Trease and Evans Pharmacognosy, 14<sup>th</sup> edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK. ,1996.
- (50) Guenther, E., The Essential Oils, Vol.1, Robert E. Kriger Publishing Company, Florida, USA, 1972.
- (51) G. Tümen, F. Satıl, O. Yıldırım, Trakya ve Orta Anadolu'da Yetişen Satureja Türlerinin Sistemik Revizyonu ve Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerinin Mukayesesi, Balıkesir, 155, 1992.
- (52) A. Ceylan, Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, İzmir, 1, 1997.
- (53) M. Tanker, N. Tanker, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını, Ankara, 65, 269, 1990.
- (54) T. Baytop, Farmakognozi, İstanbul Üniversitesi Yayını, İstanbul, 1810, 155, 1972.
- (55) Deans, S.G., Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (Volatile) Oils, Essential Oils and Waxes, 12, 310- 331, 1991.
- (56) Lawrance, M.B., The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plants Products, A Manual On The Essential Oil Industry, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, Türkiye, 1995.
- (57) Flamini, G., Ertugrul, K., Cioni, P. L., Morelli, I., Dural, H., Bağcı, Y., Volatile constituents of two endemic *Centaurea* species from Turkey: *C. pseudoscabiosa* subsp. *pseudoscabiosa* and *C. hadimensis*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 953-959, 2002.
- (58) Dural, H., Bağcı, Y., Ertugrul, K., Demirelma, H., Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I., Essential oil composition of two endemic *Centaurea* species from Turkey, *Centaurea mucronifera* and *Centaurea chrysantha*, collected in same habitat, *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**, 1417-1425, 2003.
- (59) Altıntaş, A., Köse, Y. B., Yücel, E., Demirci, B. And K. H. C. Başer, Composition of the essential oil of *Centaurea dichroa*, *Chemistry of Natural Compounds*, **40** (6), 604-605, 2004.
- (60) Yaylı. N., Yaşar. A., Güleç. C., Usta. A., Kolaylı. S., Coşkunçelebi. K., Karaoğlu. Ş., Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*, *Phytochemistry* **66** 1741–1745. 2005.
- (61) Altıntaş, A., Köse, Y. B., Kandemir, A., Demirci, B., Başer, K. H. C., Composition of the essential oil of *Centaurea saligna* (C. Koch) Wagenitz, *Symposium of the Chemistry of Natural Compounds*, Ankara, 2005.
- (62) Hammer, K.A., Carson, C.F., ve Riley, T.V., Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts, *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 985-990, 1999.
- (63) Duke, A.J., Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, Florida, USA, 1985.
- (64) Baytop, A., Farmasotik Botanik Ders Kitabı, İ.Ü. Basımevi, İstanbul, Türkiye , 1991.
- (65) Davis, P.H., Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press, 4, 265, Edinburg, UK, 1972.
- (66) Kubeczka, K.H., Chemical Investigations of Essential Oils of Umbellifers, Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects, Martinus Nijhoff Publishers, Netherland, 165- 167, 1982.

- (67) French, D.H., Ethnobotany of the Umbelliferae, The Biology and Chemistry of the Umbelliferae, Academic Press., London, England, 385-402, 1971.
- (68) Akalin, E., Türkiye'nin Batısında Yetişen Ferulago Türleri Üzerinde Farmasotik Botanik Araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1999.
- (69) Tanker, N., Tanker M., Şener, B. ve Svendsen, B., Echinophora teunifolia L. subsp. sibtorphiana (Guss.) Tutin Uçucu Yağının Gaz Kromatografisi ile Araştırılması, J. Fac. Pharm Ankara, 6, 161-179, 1976.
- (70) Vanden Berge, D.A ve Vlietinck, A.J., Screening Methods for Antimicrobial and Antiviral Agents from Higher Plants, Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London, England, 37-53, 1991.
- (71) Janssen, A.M., Scheffer, J.J. ve Baerheim, S.A., Antimicrobial Activity of Essential Oils a Literature Review (1976-1986). Aspects of the Test Methods, Planta Med., 53, 395-398, 1987.
- (72) Cowan, M.M., Plant Products As Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582, 1999.
- (73) Dorman, H.J.D. ve Deans, S.G., Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils, J. Appl. Microbiol., 88, 308-316, 2000.
- (74) Beşe, M., Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, Kardeşler Basımevi, İstanbul, 1989.
- (75) Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger VE P.C. ve Winn W.C., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, 785-856, 1997.
- (76) Hadacek, F. ve Greger, H., Testing Of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice, Phytochem. Anal., 11, 137-147, 2000.
- (77) Elof, J.N., A Sensitive Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria, Planta Med., 64, 711- 713, 1998.
- (78) Lambert, R.J.W., Susceptibility Testing: Inoculum Size Dependency of Inhibition Using the Colworth MIC Technique, J. Appl. Microbiol., 89, 275- 279, 2000.
- (79) Delespaul, Q., Billerbeck, B.G.; Roques, C.G., Michel, G., Vinuales, C.M. ve Bessiere, J.M., The Antifungal Activity of Essential Oils as Determined by Screening Methods., J. Essent. Oil Res., 12, 256-266, 2000.
- (80) Diğrak, M., Alma, H.A., İlçim, A. ve Şen, S., Antibacterial and Antifungal Effects of Various Plant Extracts, Pharm. Biol., 37, 216-220, 1999.
- (81) Sökmen, A., Jones, B.M. ve Ertürk, M., The in Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants, J. Ethnopharm., 67, 79-86, 1999.
- (82) Mehrabian, S., Majd, A. ve Majd, I., Antimicrobial Effects of Three plants on Some Airborne Microorganisms, Aerobiologia, 16, 455-458, 2000.
- (83) Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Hostettmann, K. ve Frenk, E., Antifungal Tests in Phytochemical Investigations: Comparison of Bioautographic Methods Using Phytopatogenic and Human Pathogenic Fungi, Planta Med., 60, 41-44, 1994.
- (84) Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K, Monod, M. ve Frenk, E.A., Bioautographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants, Phytochem Anal., 2, 199-203, 1991.

- (85) Hostettmann, K, Strategy for the Biological Evaluation of Plant Extracts, Pure App. Chem., 70, 1109-1113, 1998.
- (86) Martini, N. ve Eloff, J.N., The Preliminary Isolation of Several Antibacterial Compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae, J. Ethnopharm., 62, 255-263, 1998.
- (87) Nostro, A., Germano, M.P, D'angelo, V., Marino, A. ve Cannatelli, M.A., Extraction Methods and Bioautography for evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity, Lett. Appl. Microbiol., 30, 379-384, 2000.
- (88) Canel, J.P.R., Natural Products Isolation, Humana Press, New Jersey, USA, 240-241, 1998.
- (89) İşcan, G., Demirci, F., Kirimer, N., Kürkçüoğlu, M. ve Başer, K.H.C., Antimicrobial Screening: *Mentha piperita* Essential Oil, Interactions in the Microbial World, 9<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, The Netherlands, 323 , 2001.
- (90) Basım, H., Yeğen, O. ve Zeller, W., Antibacterial Effect of Essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on Soma Plant Pathogenic Bacteria, J.Plant Dis. Prot., 3, 279-284, 2000.
- (91) Barrero, A.F., Oltra, J.E., Alvarez, M., Raslan, D.S., Saude, D.A., Akssira, M., “New Sources and Antifungal Activity of Sesquiterpene Lactones”, *Fitoterapia*, 71: 60-64, 2000.
- (92) Negrete, R., Backhouse, N., Avendano, S., San Martin, A., “Dehydrocostus Lactone and 8 $\beta$ -hydroxydehydrocostus Lactone in *Centaurea chilensis* Hook and Arn.”, *Plant. Med. Phytother.*, 18(4): 226-232, 1984.
- (93) Negrete, R.E., Backhouse, N., Bravo, B., Erazo, S., Garcia, R., Avendano, S., “Some Flavonoids of *Centaurea floccosa* Hook and Arn., *Plant.*”, *Med. Phytother.*, 21(2): 168-172, 1987.
- (94) Sür-Altınır, D., Gürkan, E., Sarıoğlu, İ., Tuzlacı, E., “*Centaurea hermannii* Bitkisinin Antibakteriyel ve Antifungal Etkileri”, “XIII. XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, M, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Matbaa Birimi, İstanbul, 2000.
- (95) Sür-Altınır, D., Gürkan, E., Sarıoğlu, İ., Ang, Ö., Tuzlacı, E., “*Centaurea hermannii* F.Hermann'nın Antibakteriyel ve Antifungal Etkileri”, XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, M., Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:75, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 553, 1997.
- (96) Barrero, A.F., Oltra, J.E., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D.G., Ruiz, P., “Lactones from Species of *Centaurea*. Cytotoxic and Antimicrobial Activities”, *Fitoterapia*, 66(3):227-230, 1995.
- (97) Vajs, V., Todorović, N., Ristić, M., Tešević, V., Todorović, B., Janacković, P., Marin, P., Milosavljević, S., “Guaianolides from *Centaurea nicolai*: Antifungal Activity”, *Phytochemistry*, 52(3): 383-386, 1999.
- (98) Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Larsen, L.K., Caolan, F.R., “Isolation, NMR Studies and Biological Activities of Onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*”, *J. Nat. Prod.*, 55(2), 1992.
- (99) Öksüz, S., Ayyıldız, H., Johansson, C., “6-Metoxylated and C-Glycosyl Flavonoids from *Centaurea* Species”, *J. Nat. Prod.*, 47(5): 902-903, 1984.
- (100) Arif, R., *Centaurea* Türlerinin Biyolojik Aktivite Yönünden Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, 2002.



- (101) Köse, Y. B., İscan. G., Demirci. B., Celik. S, Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*, *Fitoterapia* 78 253–254, 2007.
- (102) <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF6DAAA061080DB72A> (erişim tarihi 15.01.2011)
- (103) Bilgehan, H. Klinik Mikrobiyoloji (Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları), 10. Baskı. Barış Yay. Fakülteler Kitabevi, İstanbul, 2000.
- (104) Ustaçelebi, Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, İstanbul, 1999.
- (105) <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EFC9F96F26F37523FA> (erişim tarihi 15.01.2011)
- (106) Nester, E. W., Anderson, D.G., Roberts, C.E., Pearsall, N.N., Nester, M.T.. *Microbiology A Human Perspective*. Mc Graw Hill Higher Education, Boston, 2004.
- (107) [http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/Enterococcus\\_faecalis/index.htm](http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/Enterococcus_faecalis/index.htm) (erişim tarihi 26.01.2011)
- (108) Zywottek, W.W., Chemical et Reagents. Member of the Executive Board and General Partner of Merc KGaA, Darmstand, 2008.
- (109) Yıldırım N., *Centaurea balsamita* Lam. ve *Centaurea coronopifolia* Lam.türlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2008.
- (110) Anssen, A.M., Scheffer, J.J., Baerheim, S.A. *Planta Medica*, 53: 395-398, 1987.
- (111) Barış, Ö., Güllüce. M., Şahin. F., Özer. H., Kılıç. H., Özkan. H., Sökmen. M., Özbek. T., Biological Activities of the Essential Oil and Methanol Extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae), *Turk J Biol* 30 65-73, 2006.
- (112) Liu, Y., Wang, M.W. 2007. Botanical drugs: challenges and opportunities Contribution to Linnaeus Memorial Symposium. *Life Sciences*, 82:445-449, 2007.
- (113) Cardellina, J. H.. Challenges and apportunities confronting the botanical dietary supplement industry. *Journal of Natural Products*, 65: 1073-1084, 2002.
- (114) Lee, K. H.. Research and discovery trends of chinese medicine in the new century. *Journal of Chinese Medicine*, 15: 151-160, 2004.
- (115) Özer, Z., Tursun, N., Önen, H. *Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam (Gıda ve Tedavi)*. Sf.133, 4Renk Yayınları, Ankara, 2001.
- (116) Nakipoğlu, M., Otan, H. *Tıbbi Bitkilerin Flavanoitleri*. *Anadolu J. of AARI*, 4 (1): 70-93, MARA,İzmir. 1992.
- (117) Toroğlu, S., Çenet, M.. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*. 9 (2): 12-18, 2006.