

**T.C.
NEVŞEHİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAPADOKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN BAZI BİTKİLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Merve DURMUŞ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARIBOĞA**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Aralık 2012
NEVŞEHİR**

**T.C.
NEVŞEHİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KAPADOKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN BAZI BİTKİLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Merve DURMUŞ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARİBOĞA**

**Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Nevşehir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2012/ 21 numaralı proje ile desteklenmiştir**

**Aralık 2012
NEVŞEHİR**

Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARIBOĞA danışmanlığında **Merve DURMUŞ** tarafından hazırlanan '**Kapadokya Bölgesinde Yetişen Bazı Bitkilerin Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi**' adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

25.01.2013

JÜRİ

Başkan : Doç. Dr. Fatma KARİPCİN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARIBOĞA

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gencay AKGÜL

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ..28.01.2013.....tarih ve ..2013/03-02... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..28.01.2013

Doç. Dr. Şahlan ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

KAPADOKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN BAZI BİTKİLERİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Merve DURMUŞ
Nevşehir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Aralık 2012
Tez Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARIBOĞA

ÖZET

Geçmişten günümüze kadar birçok bitkiden hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla faydalanılmıştır ve halende faydalanılmaktadır. Bu bitkiler tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tıbbi açıdan oldukça önemlidir. Bunların öneminin açıklanması için tıbbi açıdan birçok yöntem kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Kapadokya bölgesinde yetişen *Thymus sipyleus*, *Globularia trichosantha* ve *Globularia orientalis* türleri seçilmiştir. Bu seçilen bitkilerin gövde, tohum ve yaprak kısımları ayrı ayrı incelenmiştir. Bu bitkilerin MIC (minimal inhibitör konsantrasyonu) yoluyla *Candida albicans*, *Escheria coli*, *Staphlococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Metisiline dirençli Staphlococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus feacalis*, *Streptococcus pnemoniae*, *Listeria monocytogenes* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bu bitkiler kullanılarak CUPRAC (Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi, DPPH kullanarak ‘toplam antioksidan potansiyel’ ölçümü, ABTS radikali süpürücü kapasitesi ölçümü, metal-şelat aktivitesi (FERROZİN) ölçümü, ferrik iyonu indirgeme antioksidan (FRAP) ölçümü, folin-ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde ölçümü, süperoksit radikali giderme aktivitesi ölçümü ve hidrojen peroksit süpürme aktivitesinin ölçümü yollarıyla da antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır.

Antimikrobiyal çalışmalarda bakteriler üzerinde en iyi sonucu *Thymus sipyleus* bitkisi verirken, *Candida albicans* bakterisi bu bitkilerin hiçbirine duyarlı değildir.

Anahtar Kelimeler: *Globularia trichosantha*, *Globularia orientalis*, *Thymus sipyleus*, Antimikrobiyal aktivite, Antioksidan aktivite

ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKİDAN ÖZELLİKLERİ BAZI CAPPADOCIA BÖLGESİNDE BÜYÜYEN BİTKİLERİN

Merve DURMUŞ

Nevşehir University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
M.Sc. Thesis, December 2012
Thesis Supervisor: Assist. Prof. Bahtiyar SARIBOĞA

ABSTRACT

Since the past until the present, it has been benefitted from a lot of plants with the aim of cure of diseases, and it is still benefitted. These plants are considerably important medically in Turkey as is in the whole world, either. In order to explain the importance of them, many medical methods are used.

In this study, it has been selected the *Thymus sipyleus*, *Globularia trichosantha* and *Globularia orientalis* plants that grow up in Cappadocia. It has been examined the stems, seed and leaf parts of these selected plants in different ways. Via MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*), it have been done the antimicrobial activity studies of these plants on the bacteria *Candida albicans*, *Escheria coli*, *Staphlococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Methicillin Resistant Staphlococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Entereococcus feacalis*, *Streptococcus pnemoniae*. Besides, by using these plants, it have been done the studies on the method of CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) and the measurement of “Total Antioxidant Potential” by using the DPPH; the measurement of ABTS radical scavenger capacity, the measurement of metal-chelate activity (FERROZIN), the measurement of Ferric Ion Reducing Antioxidant (FRAP) and the measurement of Folin-Ciocalteu Reactive (FCR), and on the antioxidant activity studies by total phenolic substance measurement, superoxide radical scavenger activity measurement and hydrogen peroxide scavenger activity measurement.

As the best result of antimicrobial activity studies on the bacteria has emerged from *Thymus sipyleus*, the bacteria of *Candida albicans* has not sensitive in this species. When the methods in the antioxidant activity studies were compared in terms of the parts of these species, the best antioxidant activities have been indicated by *Globularia trichosantha* stems, *Globularia orientalis* whole (body) and *Thymus sipyleus* stems. As for the method of Ferrozin, our plants have not given any reaction.

Keywords: *Globularia trichosantha*, *Globularia orientalis*, *Thymus sipyleus*, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity

TEŞEKKÜR

En içten ve derin teşekkürlerimi, Lisansüstü öğrenimimde destek ve yardımlarını benden esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında bilgi birikiminden faydalandığım, Akademik Danışmanım, Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahtiyar SARIBOĞA' ya sunmayı bir borç bilirim. Kendileri, deney çalışmam ve tezimin olgunlaşması safhasında yardımlarını benden esirmeyip tezimin değerli kılınmasında çok önemli rol oynamıştır. Çalıştığımız bitkilerimin belirlenmesinde yardımcı olan ve çektiği resimleri bizimle paylaşmaktan kaçınmayan Yrd. Doç. Dr. Gencay AKGÜL' e, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen anneme ve babama, Çağatay Türk'e, ev arkadaşlarıma şükranlarımı sunuyorum. Yaptığımız antioksidan deney çalışmalarını bize öğretmekten asla sakınmayan Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK ve grubuna yardımlarından dolayı teşekkürlerimi kendilerine borç bilirim. Bilgilerini benden asla sakınmayan bölümdeki diğer hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımıza 2012/ 21' nolu proje kapsamında maddi destek veren Nevşehir Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim. İsimlerini andığım veya anmayı unuttuğum, bilgi birikimime ve tezimin olgunlaşma sürecinde bana katkıda bulunan dostlarıma yürekten teşekkür eder, kendilerinin dostluğunu ve yardımlarını lütfeden ve tezimin bitmesini nasip eden Yüce Bilge Yaratıcı' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
1.1. Bitkiler	1
1.2. Çalışmada Kullanılan Bitkiler.....	5
1.2.1. Thymus sipyleus Boiss.....	5
1.2.2. Globularia.....	6
2.BÖLÜM	10
MİKROORGANİZMALAR.....	10
2.1. Önemli Patojen Mikroorganizmalar.....	11
2.1.1. Bakteriler.....	11
2.1.1.a. Streptococcaceae	12
2.1.1.b. Staphylococci	13
2.1.1.c. Enterococcus	14
2.1.1.d. Listeria.....	15
2.1.1.e. Bacillus.....	16
2.1.1.f. Salmonella	17
2.1.1.g. Escherichia coli (E. coli).....	18
2.1.2. Mantarlar	20
2.1.2.a. Candida.....	20

3.BÖLÜM	22
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE	22
3.1. Mikrodilüsyon Metodu	22
3.2. Disk Difüzyon Metodu:	23
3.3. Diğer Teknikler:	24
4.BÖLÜM	25
ANTIOKSIDAN	25
4.1. Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	27
4.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^{\bullet}).....	31
4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	32
4.1.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$).....	33
4.1.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	34
4.1.5. Hipoklorik Asit (HOCl)	34
4.1.6. Nitrik Oksit (NO^{\bullet})	35
4.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	35
4.3. Serbest Radikallerin Etkileri	37
4.3.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	37
4.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	40
4.3.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA' ya Etkileri	40
4.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi.....	41
4.4. Antioksidanlar	42
4.5. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanların Sınıflandırılması	44
4.6. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	44
4.6.1. DPPH Kullanarak 'Toplam Antioksidan Potansiyel' Ölçüm Yöntemi	46
4.6.2. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	47
4.6.3. ABTS Radikali Süpürücü Kapasitesi Ölçüm Yöntemi	48
4.6.4. Metal-Şelat Aktivitesi Tayini.....	48

4.6.5. Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü	48
4.6.6. Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Analizi.....	49
4.6.7. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi	49
5.BÖLÜM	50
MATERYAL VE METHOD	50
5.1. Materyal	50
5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
5.2. Kullanılan Cihazlar	51
5.3. Kullanılan Çözeltiler Ve Hazırlanması	53
5.3.1. Antimikrobiyal Çalışmalar İçin Hazırlanacak Kimyasallar	53
5.3.1.a. Bakteriler İçin Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	53
5.3.1.b. Mayalar İçin Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	54
5.3.2. Antioksidan Çalışmalar İçin Hazırlanacak Kimyasallar	54
5.3.2.a. DPPH Kullanarak 'Toplam Antioksidan Potansiyel' Ölçüm İçin Kullanılan Kimyasallar	54
5.3.2.b. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi İçin Kullanılan Kimyasallar	54
5.3.2.c. ABTS Radikali Süpürücü Kapasitesi Ölçüm Yöntemi İçin Kullanılan Kimyasallar	55
5.3.2.d. Metal-Şelat Aktivitesi (FERROZİN) Tayini İçin Kullanılan Kimyasallar	55
5.3.2.e. Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü	55
5.3.2.f. Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Ölçümü	55
5.3.2.g. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Ölçümü	56
5.3.2.h. Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi Ölçümü	56
5.4. Bitkilerin Toplanması	56
5.5. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması.....	57
5.6. Bitki Çözeltilerinin ve Standardın Hazırlanışı	57

5.7.	Mikroorganizmalar.....	57
5.8.	Deneysel Çalışmalar.....	58
5.8.1.	Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	58
5.8.1.a.	Bakteriler için	58
5.8.1.b.	Mayalar İçin	58
5.8.2.	Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	59
5.8.2.a.	CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi	59
5.8.2.b.	DPPH Kullanarak 'Toplam Antioksidan Potansiyel' Ölçümü	60
5.8.2.c.	ABTS Radikali Süpürücü Kapasitesi Ölçümü	60
5.8.2.d.	Metal-Şelat Aktivitesi (FERROZİN) Ölçümü	61
5.8.2.e.	Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü	61
5.8.2.f.	Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Ölçümü	62
5.8.2.g.	Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Ölçümü	63
5.8.2.h.	Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesinin Ölçümü	63
6.	BÖLÜM	65
	BULGULAR VE TARTIŞMA	65
6.1.	Antimikrobiyal Aktivite.....	65
6.2.	Antioksidan Aktivite.....	76
7.	BÖLÜM	83
	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
	KAYNAKLAR	85
	ÖZGEÇMİŞ	88

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Bazı serbest radikal türleri	30
Tablo 4.2. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	44
Tablo 6.1. Antimikrobiyal aktivite çalışma sonuçları	65
Tablo 6.2. Antioksidan aktivite çalışma sonuçları	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1. Bitki hücresi	2
Şekil 1. 2. <i>Thymus sipyleus</i>	6
Şekil 1. 3. <i>Globularia trichosantha</i>	8
Şekil 1. 4. <i>Globularia orientalis</i>	9
Şekil 2. 1. Bakteri hücresi	11
Şekil 2. 2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
Şekil 2. 3. <i>S. aureus</i>	14
Şekil 2. 4. <i>E. feacalis</i>	15
Şekil 2. 5. <i>L. monocitogenes</i>	16
Şekil 2. 6. <i>Bacillus anthracis</i>	17
Şekil 2. 7. <i>Salmonella typhi</i>	18
Şekil 2. 8. <i>E. coli</i>	19
Şekil 2. 9. <i>Candida albicans</i>	21
Şekil 4. 1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu	29
Şekil 4. 2. Enerji transferi yoluyla ROS' un üretimi	32
Şekil 4. 3. Singlet oksijen (1O_2)	34
Şekil 4. 4. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri	36
Şekil 4. 5. Serbest radikallerin hedefleri	37
Şekil 4. 6. Poli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu	39
Şekil 4. 7. Hidroksil radikallerinin DNA' ya etkileri	41
Şekil 4. 8. DPPH' ın yapısı.....	47
Şekil 5. 1. Otoklav.....	51
Şekil 5. 2. Etüv.....	51
Şekil 5. 3. pH metre.....	52
Şekil 5. 4. UV/VIS Spektroskopisi	52
Şekil 5. 5. McFarland Cihazı	53
Şekil 6. 1. <i>Thymus sipyleus</i> bitkisinin yaprak kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	67
Şekil 6. 2. <i>Thymus sipyleus</i> bitkisinin gövde kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	68

Şekil 6.3. <i>Globularia orientalis</i> bitkisinin yaprak kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	69
Şekil 6.4. <i>Globularia orientalis</i> bitkisinin tohum kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	70
Şekil 6.5. <i>Globularia orientalis</i> bitkisinin gövde kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	71
Şekil 6.6. <i>Globularia orientalis</i> bitkisinin karışık kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	71
Şekil 6.7. <i>Globularia trichosantha</i> bitkisinin tohum kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	72
Şekil 6.8. <i>Globularia trichosantha</i> bitkisinin gövde kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	73
Şekil 6.9. <i>Globularia trichosantha</i> bitkisinin yaprak kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği	74
Şekil 6. 10. CUPRAC yöntemine göre bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği ...	78
Şekil 6. 11. DPPH yönteminde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği	79
Şekil 6. 12. ABTS yönteminde bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği	79
Şekil 6. 13. FRAP yönteminde bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği	80
Şekil 6. 14. FOLİN yönteminde bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği	81
Şekil 6.15. Süperoksit radikali süpürme aktivitesinde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği	81
Şekil 6. 16. Hidrojen peroksit süpürme aktivitesinde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği	82

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	:	2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiyazolin-6-sülfonik asit)
CUPRAC	:	Bakır (II) indirgeyici Antioksidan Kapasite
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DLA	:	Deoxycholate lactose agar
DPPH	:	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ET	:	Elektron transferi
FCR	:	Folin-Ciocolteu reaktifi
FRAP	:	Ferric iyonu indirgeme antioksidan
GOt	:	<i>Globularia orientalis</i> tohum
GOg	:	<i>Globularia orientalis</i> gövde
GOy	:	<i>Globularia orientalis</i> yaprak
GOk	:	<i>Globularia orientalis</i> karışım
GTg	:	<i>Globularia trichosantha</i> gövde
GTt	:	<i>Globularia trichosantha</i> tohum
GTy	:	<i>Globularia trichosantha</i> yaprak
HAT	:	Hidrojen atomu transferi
HPS	:	Hidrojen peroksit süpürmesi
IgG	:	İmmunoglobulin
KOAH	:	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MDA	:	Malondialdehit
MHB	:	Mueller hinton besiyeri
MIC	:	Minimal inhibitör konsantrasyonu
MLK	:	Minimal letal konsantrasyonu
MRSA	:	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
ORAC	:	Oksijen radikal absorban kapasitesi
PUFA	:	Poly doymamış yağ asitleri
RNA	:	Ribonükleik asit
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
SR	:	Serbest radikal

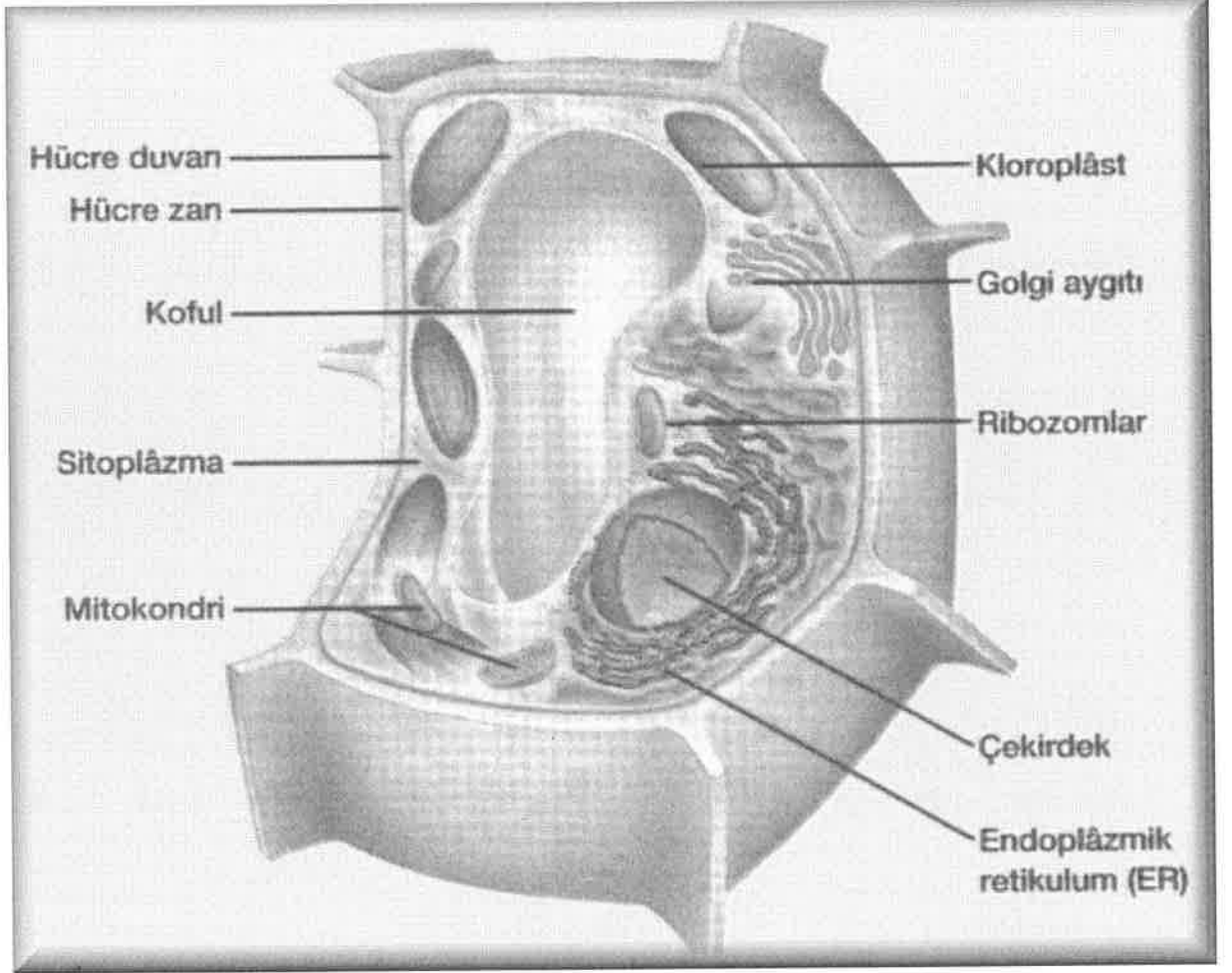
TEAC	:	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TPTZ	:	Tripiridiltriazin
TRAD	:	Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
TSg	:	<i>Thymus sipyleus</i> gövde
TSy	:	<i>Thymus sipyleus</i> yaprak
XLD	:	Xylose lysine desoxycholate
XLT	:	Xylose lysine tergitol-4

1. BÖLÜM

GİRİŞ

1.1.Bitkiler

Latince 'plantae' olarak adlandırılan bitkiler, fotosentez yapan, ökaryotik, ağaçlar, çiçekler, otlar, eğreltiotları, yosunlar ve benzeri organizmaları içinde bulunduran çok büyük bir canlılar alemidir. Bitkiler genelde ototrof organizmalardır; yani kloroplastları sayesinde kendi besinlerini güneş ışınları yardımıyla kendileri üretirler ve bununla birlikte enerji de üretirler. Bitki hücreleri genellikle kareye benzer. Sentrozomları yoktur. Depo karbonhidratları nişastadır. Plastidleri vardır. Hücre zarının dışında hücre çeperleri vardır.



Şekil 1. 1. Bitki hücresi(<http://www.maxihayat.net/maxiforum/biyoloji/107976-bitki-hucresibitki-hucreleri-bitki-hucresi-hakkinda-ansiklopedik-bilgi.html>)

Bitkiler, topluluk halinde yaşarlar. Bitkilerin bir bölgede oluşturdukları örtüye bitki örtüsü denir. Flora ise bir bölgede yetişen bütün bitki türlerinin hepsine denir. Bitkilerin yetişmesini etkileyen birçok faktör mevcuttur. Bitkilerin gelişim süreleri boyunca bünyelerinde oluşturdukları ve depoladıkları çeşitli etken maddeler vardır. Tıbbi bitkilerde bulunan bu etken maddeler, bitkinin;

- Botanik türüne,
- Yıl içindeki durumuna,
- Coğrafi bölgesine,
- İklim Şartlarına,
- Toplama ve kurutma usullerine,
- Kuruduktan sonra muhafaza durumuna göre değişiklik göstermektedir.

Ayrıca; ekvatora uzaklık, denizden yükseklik (rakım), arazi eğimi, ışık, sıcaklık, nem, yıllık yağış miktarı, toprak içeriği, canlı faktörlerde (insan, hayvan, diğer bitkiler, mikroorganizmalar) etkilemektedir. Bitkiler, fotosentezle ekolojik dengeyi sağlamada temel rol oynadıklarından, canlılar dünyasında çok önemli yere sahiptirler. Bitkiler yeryüzünde yaşamın anahtarıdır. Bitkiler olmasaydı pek çok canlı organizma yaşamını sürdüremezdi; çünkü üstün yapıları canlılar, yaşam biçimleriyle, besinlerini doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilerden sağlarken, ancak birçok bitki gerekli besinlerini güneş ışığından yararlanarak kendisi üretmektedir. Bitkiler aleminin 350.000'e yakın türü mevcuttur. 2004 itibarıyla 287.655 bitki türü tanımlanmıştır. Bunlardan 258.650'si çiçekli bitkilerden, 15,000'i de yosunlardan olarak tanımlanmıştır [1].

Türk halkının çoğunluğunun kırsal bölgelerde yaşaması nedeniyle, yabancı bitkiler ile yakından ilgilidirler. Halk yabancı bitkilerin bir bölümünden;

- Gıda,
- Baharat,
- Boyar madde,
- İlaç olarak yararlanmaktadır.

Örneğin; aromatik bitkiler; başta çay, baharat, çesni ve uçucu yağ kaynağı olarak kullanılırken bitkilerden elde edilen uçucu yağlar (esanslar, eterik yağlar) ve aromatik ekstratlar; koku ve tat endüstrileri tarafından parfüm, gıda katkıları, temizlik ürünleri, kozmetik ve ilaçların terki binde, aroma kimyasalların kaynağı olarak ya da doğala özdeş ve yarı sentetik yararlı aroma kimyasalların sentez başlangıç maddesi olarak da yaygın bir şekilde kullanılırlar. Doğal ürünlerin tüketimindeki artışa bağlı olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin dünya pazar hacmi hızlı bir artış göstermektedir. Önceleri doğadan toplanan bu bitkilere olan talebin artmasıyla birlikte tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımına yönelik çalışmalara da hız verilmiştir. Bugün birçok ülkede tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımı yapılmakta ve birçok bitki türünde çeşit geliştirilmektedir. Ülkemizde de son yıllarda daha çok baharat olarak kullanılan ve dış satımda önemli payları olan tıbbi ve aromatik bitkilerin tarımına başlanmıştır [2,27,31].

Bitkilerin tedavi amaçla kullanılmaları çok eski yıllardan beri sürmektedir. Dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de deneme yanılma yöntemiyle bulunmuş halk arasında şifalı bitkiler olarak anılan birçok bitki hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın 91 ülke üzerinde yaptığı araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginlik; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cinsin kökeni ve farklılaşım merkezinin Anadolu oluşu, ekolojik farklılaşmanın sonucu olarak tür endemizminin yüksek olmasına neden olmuştur [3].

Günümüzde ise üzerinde durulan bitkilerin başında, insan vücudunun kendini koruma gücünü artıran ve her türlü zorluğa karşı vücudun direncini artıran bitkiler gelmektedir. Bu özellikte olan bitkilerin kullanılması her geçen gün artmakta ve bu bitkileri yetiştiren ülkelere geniş bir ticari gelir sağlamaktadır.

Bitki seçimi

Bir farmakolojik çalışma için uygun bitkinin seçimi son derece önemlidir. Geleneksel kullanım, kimyasal bileşim, zehir etkisi, rastgele seçim veya farklı kombinasyonlar gibi unsurlar göz önünde bulundurulmalıdır. Bitki seçiminde kullanılan en yaygın yöntem etnofarmakolojik ve etnobotanik olarak bilinen farklı kültürlerdeki doğal kaynakların kullanımının dikkatle incelenmesidir. Bitkinin toplum tarafından nasıl kullanıldığının bilinmesi son derece önemlidir. Çünkü bu bilgi ekstraksiyon yönteminin belirlenmesinde yol gösterir. Bitkinin ağız yoluyla kullanılıp kullanılmaması ve uygulanan doz miktarı gibi kriterler farmakolojik aktiviteleri hakkında bilgi vermektedir. Bitki seçiminde kullanılan diğer bir yöntem ise; önceden yapılan çalışmaların aktif türlerinin değerlendirilerek, en iyi bilinen farmakolojik aktivitelerinin araştırılarak karar verilmesidir. Antitümör ilaçların araştırılması gibi alanlarda kullanılan strateji bu örneğe uygundur [4].

1.2. Çalışmada Kullanılan Bitkiler

1.2.1. *Thymus sipyleus* Boiss.

Kekik en çok baharat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin toprak üstü kısımları bağırsak rahatsızlıklarının, koroner hastalıkların tedavisinde, astım ve soğuk algınlıklarında, romatizma, mafsalsal, baş ve diş ağrılarında, böcek sokmalarında, kan dolaşımını uyarıcı, sinir sistemini kuvvetlendirici, kabız, hazmettirici, stomaşik, diüretik, antiseptik, stimulan, karminatif, diyaforatik, dispeptik, sedatif, antihelmintik ve ekspektoran olarak, gıdaların saklanması (doğal antioksidan), arı hastalık ve zararlılarının kontrolünde, böcek ve yabancı ot, nematot ve virüslerin kontrolünde organik hayvancılıkta yem rasyonlarında doğal antibiyotik ve anthelmintik (parazit düşürücü) olarak kullanılabilir. Parfümeri ve kozmetik sanayinde 'Thymol' problemlili ciltlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde kekik türleri daha çok et yemeklerinde baharat olarak da faydalanılmaktadır. Kekiğin ayrıca çevre düzenlemesinde süs bitkisi olarak kullanımı da mevcuttur [2].

Bu çalışmamızda halk arasında şifalı bitki olarak bilinen kekik bitkisi seçilmiştir. *Thymus* cinsi olan bitkilerin antioksidant ve antimikrobiyal çalışmaları yayınlanmaktadır. Fakat bu bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri yetiştiği bölge, iklim, toprak türü sebeplerden dolayı farklılık gösterebilmektedir. Kekik bitkisi çimenlik tarla kıyılarında, orman kıyılarında ve çayırlardaki karınca yuvalarının üstünde yer almaktan hoşlanır. Güneş ve sıcak istediği için, toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelere çoğalır [5].

Araştırmamıza konu olarak seçtiğimiz Kekik cinsinin sistematigi aşağıdaki gibidir:

Bölüm (Divisio) : Spermatophyta

Altbölüm (Subdivisio) : Angiospermae

Sınıf (Classis) : Dicotyledonae

Altsınıf (Subclassis) : Dialypetalae

Takım (Ordo) : Tubiflorae

Familiya (Familia) : Labiatae (Lamiaceae)

Cins (Genus) : *Thymus*



Şekil 1. 2. *Thymus sipyleus*

Yapılan bir çalışmada *Thymus sipyleus* bitkisinin uçucu yağları çıkarılmış ve bu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir [24]. Bu çalışmaya göre *Thymus sipyleus* bitkisi karvakrol, timol, α -terpinil asetat, linalol, α -terpinol, geraniol, β -karyofenilen, γ -terpinen, p-cymene uçucu yağlarını içerdiği görülmüştür [24]. Yapılan başka bir çalışmada ise *Thymus sipyleus* bitkisinden izole edilen glikozidaz ve luteolinin kimyasal yapısı ile antioksidan aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir [25].

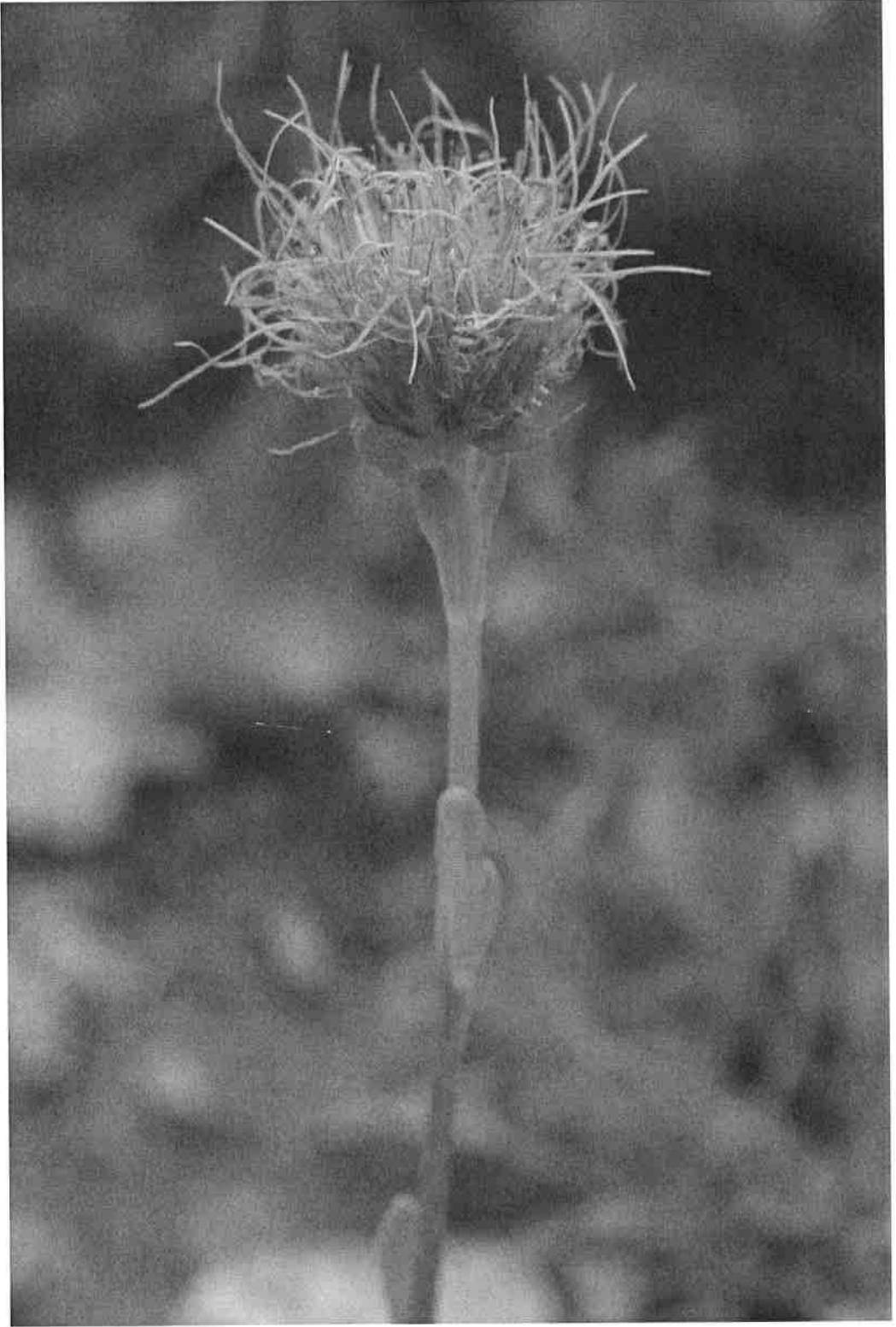
1.2.2. Globularia

Globulariaceae' ailesinden olan *Globularia* cinsinin yaklaşık 22 türü bulunmaktadır. Cinsin dünyadaki yayılışı güneybatı Asya, kuzeybatı Afrika, orta ve güney Amerika'dır. Cinsin üyelerinin Türkiye'de Ağrı, Ankara, Antalya, Bingöl, Bolu, Bursa, Denizli, Erzurum, Gaziantep, Gümüşhane, Hakkari, Mersin, İstanbul, Kars, Kastamonu, Konya, Kütahya, Manisa, Nevşehir, Samsun, Siirt, Sivas, Yozgat şehirlerinde yetişmektedir.

Kayalık ve çimenlik yerler, sık ormanlar, kireçtaşı, serpantin ve volkanik kayaların olduğu bölgelerde yetişirler. Genellikle yeşil-mat formda olan, 1-10 cm uzunluğunda yaprakları bulunan bitkilerdir. Mor, menekşe, pembe veya beyaz çiçekleri bulunur. Bu bitkiler bazı hayvanlar (*Lepidoptera* gibi) için yiyecek olarak kullanılırlar. Bunların yakından uzaktan papatyalarla ilgisi olmamalarına rağmen ‘dünya papatya’ ları olarak da bilinirler [5].

1999’ da Oran ve arkadaşları bazı *Globularia* türlerinin antimikrobiyal ve anti-tümör araştırmalarını yapmışlardır. Bu bitki aynı zamanda geleneksel tıpta kullanılmalarına rağmen henüz raporlanmamıştır (6). *Globularia* cinsi üstündeki çalışmalar aynı zamanda bunların zengin iridoid, bisiridoid, feniletanoid ve flavanoid kaynakları olduğunu göstermiştir. [7].

Çalışmamızda ‘*Globularia orientalis*’ ve ‘*Globularia trichosantha*’ cinsleri kullanılmıştır (Şekil 1.3 ve 1.4 de görülmektedir.)



Şekil 1. 3. *Globularia trichosantha*



Şekil 1. 4. *Globularia orientalis*

2.BÖLÜM

MİKROORGANİZMALAR

Mikroskobik (çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olup ancak mikroskop ile görülebilen) organizmaların genel adı olup; Yunanca mikros: küçük, organismos: canlı 'organizma'dan gelmektedir. Antonie van Leeuwenhoek, ilk mikrobiyolog ve mikroskop kullanarak mikroorganizmaları gözlemleyen ilk kişidir. Bunu yaparak Leeuwenhoek biyolojiye en önemli katkılardan birini yapmış ve mikrobiyoloji ve bakteriyoloji sahalarını açmıştır (Bu arada, Robert Hooke canlı organizmaları gözlemek için mikroskobu ilk kullanan kişidir ve 1665 tarihli Micrographia isimli kitabı bitki hücreleri tanımlamalarını içermektedir.).

Mikroorganizmalar, ortamda organik maddelerin parçalanmasının çoğundan ve doğal döngüden sorumludur. Mikroorganizmaların enerji-besin yetenekleri ve metabolik alanları şaşırtıcıdır. Bazıları, ölümcül ve diğer yaşam formları altında varolabilirler. Örneğin; bazı bakteriler enerji üretmek için sülfür ve amonyum iyonları gibi inorganik bileşikleri oksitleyebilirler ve bazıları 75⁰ C' nin üstündeki yaz sıcaklarında çoğalabilir ve yaşayabilirler.

Mikroorganizmalar çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. Örneğin;

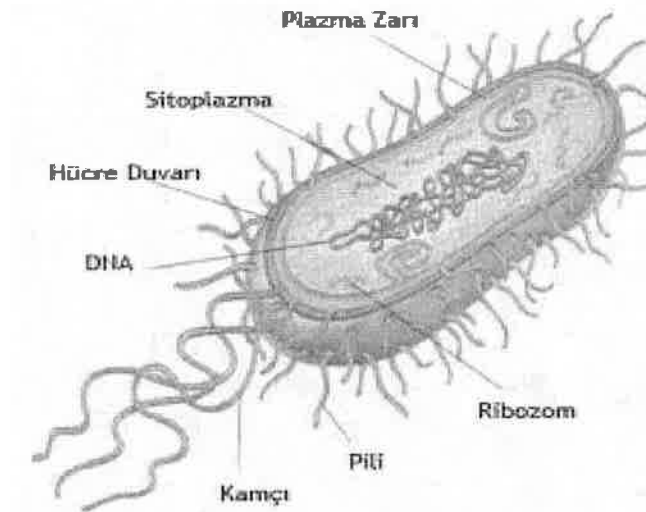
- a) Patojen mikroorganizmalar (hastalık yapanlar)
- b) Patojen olmayan mikroorganizmalar (hastalık yapmayanlar)

2.1.Önemli Patojen Mikroorganizmalar

2.1.1.Bakteriler

Tek hücreli mikroorganizma grubudur. Tipik olarak birkaç mikrometre uzunluğunda olan bakterilerin çeşitli şekilleri vardır, kimi küresel, kimi spiral şekilli, kimi çubuksu olabilir. Ciddi hastalıklara neden olurlar [29]. Yeryüzündeki her ortamda bakteriler mevcuttur.

Bakteriler, en küçük yaşayan canlılardır (0,1-10 μ m). Onlar, hücre duvarıyla sarılmış sitoplazmik membrana sahiptirler. Peptidoglikan olarak adlandırılan polimer, duvar sertliğini oluşturur. Basit prokaryotik hücreler mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum ya da diğer organelleri içermezler. Sitoplazma sadece ribozomları ve tek veya çift sarmal DNA kromozomu içerirler. Bakteriler çekirdeğe sahip değildir ama nükleik asit ve protein sentezinin bütün kimyasal elementlerini oluştururlar.



Şekil 2. 1. Bakteri hücresi(<http://altered states.net/barry/newsletter406/bacteria.htm>)

Gram boyama yöntemine göre bakteriler

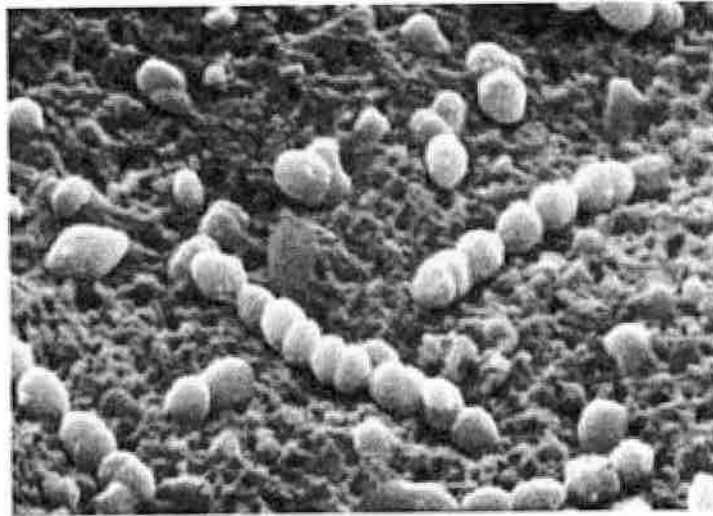
- Gram (+)
- Gram (-) olmak üzere 2' ye ayrılır.

Gram-pozitif bakteriler kristal viyole (iyot kompleksi) kompleksini peptidoglikan tabakaları sayesinde tutma özelliğine sahiptirler. Peptidoglikan tabaka kat kat ve ağısı bir yapıya sahiptir. Ve bu özellik sayesinde kristal viyole kompleksini tutar. Gram (-) bakterilerin ise çok ince bir peptidoglikan tabakaları mevcuttur. Bundan dolayı boyaları tutamaz. Ayrıca gram (-) bakterilerde lipid yapıda bir dış duvar vardır.

2.1.1.a. Streptococcaceae: Laktobacillales takımı içinde yer alan gram (+) bir bakteri familyasıdır. Şu cinsleri içermektedir;

- ✓ *Lactococcus*
- ✓ *Lactovum*
- ✓ *Pilibacter*
- ✓ *Streptococci*

Streptococci; streptococcaeae ailesinde yer alan gram (+), yuvarlak şekilli, fakültatif anaerob, katalaz negatif, sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir. Sabit bir çizgi üzerinde çoğaldıkları için zincir şeklinde görülürler. Kan ve serumla zenginleştirilmiş katı besi yerlerinde (kanlı agar, serumlu agar) ürerler.



Şekil 2. 2. *Streptococcus pneumoniae*

(http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_003

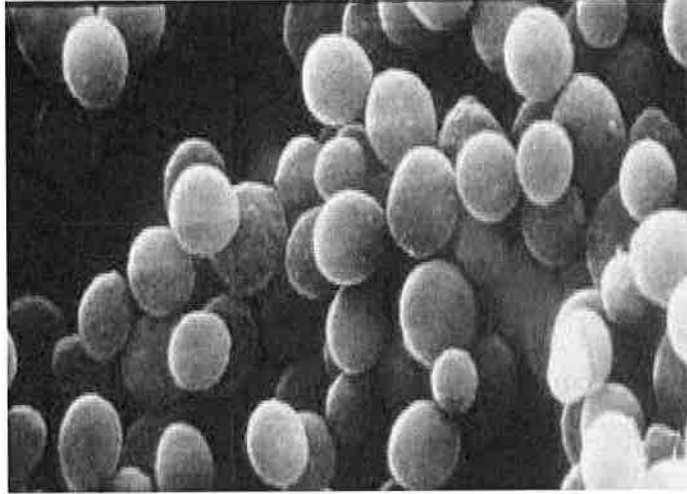
Deride en çok bulunan bakterilerdendir. Büyük çoğunluğu insan patojendir ve hastalık etkenidir. İnsanda hastalık yapan türleri; *Streptokok piyojenes*, *S. viridans* ve *S. pnömoni*' dir. *S. pnömoni* özellikle 1 yaşının altındaki çocuklarda akut pnömaniye sebep olmaktadır. Bunlardan birincisi bademcik iltihabı, impetigo, romatizmal ateş gibi hastalıklara etkindir. *S. pnömoni* bakteriyel zaatüre etkenidir. Streptokok enfeksiyonlarının en etkili ilacı penisilindir [8].

2.1.1.b. Staphylococci: Micrococcaeaceae ailesindedir. Staphylococcus sınıfının üyeleri, üzüm salkımı gibi düzenlenmeye eğilimli gram (+) coccidir. Staphylococci cinsi bakteriler genel olarak katalaz (+) bakterilerdir. Staphylococci cinsinin 26' dan fazla türü vardır. Oldukça yaygın, '*Staphylococcus aureus*' çok yaygın olanların bir tanesidir. Kuagule enzimine sahip olmasından dolayı diğerlerinden farklıdır ve akut iltihaplı enfeksiyonların ölümcül sebebidir. Diğer türleri deri floryasında yaygındır ve düşük seviye hastalıkları üretirler.

Staphylococci en iyi aerobik olarak büyür ama fakültatif anaerobik olarak da olabilirler. Streptococcinin tersine staphylococcielerin katalaz üretir. Staphylococcielerin katı besi yerlerinden kanlı agarda ise patojenik olan türleri hemoliz olarak ürerler. Staphylococcielerin 3 türü medikal olarak çok önemlidir.

- ✓ *S. aureus*
- ✓ *S. epidermidis*
- ✓ *S. saprophyticus*

Bu tip bakteriler genel olarak hastane çalışanlarında bulunmaktadır.



Şekil 2. 3. *S. aureus* (<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>)

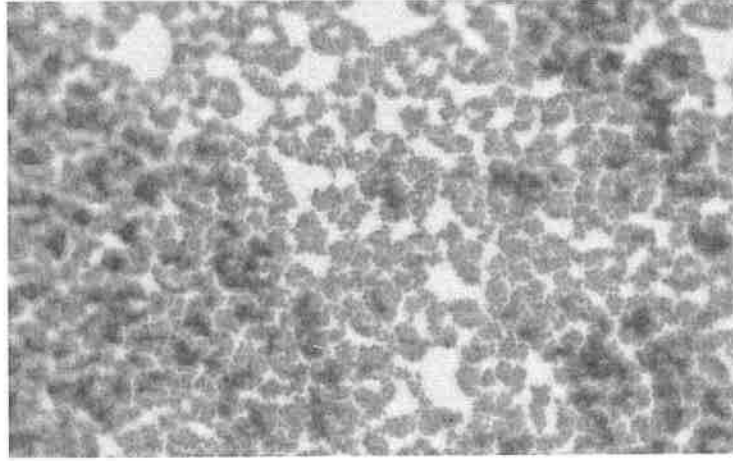
S. aureus, insanlarda menenjit, septisemi ve yara iltihaplarına ve önemli ölçüde gıda zehirlenmelerine neden olur. Bu bakteri kuru yüzeylerde yaşar ve geçirgenliği arttırır. *S. aureus*' u diğer Staphylococillerden ayırmada kullanılan en önemli testi; fibrinin polimerleşmesini başlatan kompleks oluşturan prothrombine enzimatik olmadan bağlanan koagülazın oluşumudur. *S. aureus*' un sefalosporin ve penisilinleri içeren β -laktamazlara direnç gelişmesiyle metisiline-dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları gelişmiştir. MRSA solunum yolu enfeksiyonlarına, üriner sistem enfeksiyonlarına, toksik şok sendromuna ve endokardit hastalıklarına neden olmaktadır [8].

S. epidermidis; katalaz (+) ve koagülaz (-) özelliktedir ve zaman zaman insan ve hayvan cildinin mukoz membranında görülür. *S. epidermidis*, genellikle patojen olmasa da, immün sistemi yetersiz çalışan hastalarda büyük bir risktir. *S. epidermidis* kolonileri bir gecelik inkübasyon süresinden sonra tipik olarak küçük, beyaz veya bej renkli ve yaklaşık olarak 1-2 μ m çapında görülürler. Bu organizma desferrioksamine duyarlıdır. Bu test onu diğerlerinden ayırmak için kullanılır.

S. saprophyticus çoğunlukla idrar yolu iltihaplanmalarında görülür. Bu bakteri koagülaz (-) özelliktedir.

2.1.1.c. Enterococcus: Streptococcaceae ailesine ait, kısa zincir ya da çift halinde yaşayan, gram (-) bir kok cinsidir. İnsanda 2 türü ortak yaşar. Bunlar *E. faecalis* ve *E.*

faecium' dur. 12 türünden daha fazlası üriner sistem enfeksiyonlarına, kalp iç zarı iltihaplarına, yara iltihaplarına neden olmaktadır. Enterokoklar antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç geliştirmiş ve bunun sonucu olarak hastane enfeksiyonları gelişmiştir. Enfeksiyonlara sebep olan diğer türleri de vardır. Bunlar; *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. raffinosus* dur. Bu mikroorganizmalar insan ve hayvanlarda normal bağırsak florasının önemli bir kısmını oluştururlar. Enterokoklar hastane içi ve hastane dışı enfeksiyonlara sebep olabilirler. Enterokoklar üriner sistem enfeksiyonlarına, endokardite, yumuşak doku enfeksiyonlarına neden oldukları gösterilmiştir.



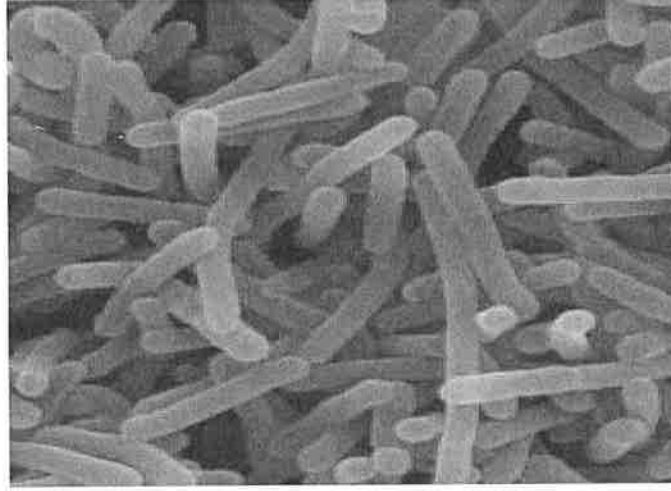
Şekil 2. 4. *E. faecalis* (<http://www.thetruthaboutgenetics.com/2011/08/ttag-in-depth-article-on-extremophilic.html>)

Bu mikroorganizmalar çok sayıda antimikrobiyal ajana (özellikle, sefalosporinler, klindamisin) intrensek olarak dirençli olduğu gibi, plasmid ve transpozonlar yoluyla yeni direnç mekanizmaları geliştirebilecek yeteneğe sahiptirler. Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları gibi enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde öncelikli penisilin G veya ampisilin tercih edilmelidir. Penisiline alerjisi olan hastalarda veya penisiline yüksek düzey dirençli mikroorganizmalar için vankomisin alternatif tedavi seçeneğidir [8].

2.1.1.d. Listeria: Gram (+), 6-10°C' den daha düşük sıcaklıklarda gelişebilen basilliler olup fakültatif anerob türü olan bir bakteridir. 6 tür içeren bakteri sınıfıdır. Araştırmacı Joseph LISTER tarafından bulunduğu için onun ismi verilmiştir. Türler;

- ✓ *L. grayi*
- ✓ *L. innocua*
- ✓ *L. ivanovii*
- ✓ *L. monocytogenes*
- ✓ *L. seeligeri*
- ✓ *L. murrayi*
- ✓ *L. welshimeri*

L. monocytogenes, toprakta, akarsularda, lağım suyunda ve yiyeceklerde bulunur. İnsanlarda menenjit, septisemi gibi hastalıklara neden olur. Bu tür özellikle *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* ve *Corynebacterium* ile benzer morfolojik özellikler gösterir.



Şekil 2. 5. *L. monocytogenes* (<http://itthing.com/whats-in-your-fast-food/listeria-monocytogenes>)

Ayırt edilebilmede en önemli özellik *Listeria*'nın hareketli olmasıdır. Tedavisi antibiyotiklerle yapılmaktadır. Kanlı agar ve Thioglycollate Broth besi yerlerinde ürerler [8].

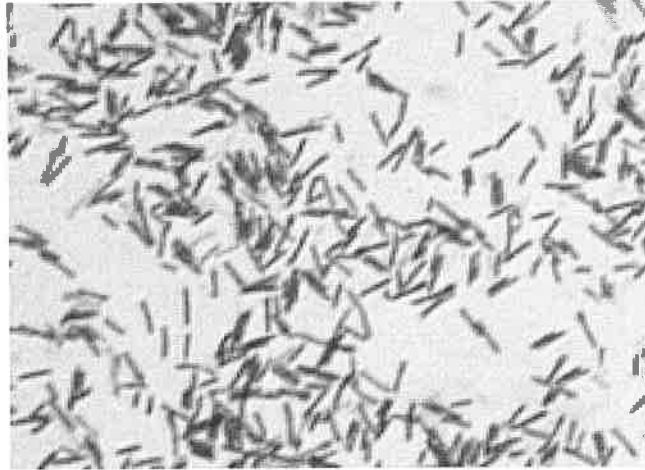
2.1.1.e. Bacillus: Gram (+) aerobik basiller spor formu yoluyla olumsuz çevre şartlarında yaşamlarına devam edebilirler. Bacillus cinsi içinde insanlar ve hayvanlar

için patojen '*B. anthracis*', '*B. subtilis*', '*B. cereus*' türleri ve saprofit türleri bulunur. '*B. myocoides*', '*B. sphaericus*', '*B. pumilus*', '*B. macerons*' gibi türleri de bulunur. Bacillus cinsi genel özellikleri; gram (+), sporlu, aerob ve basil şeklinde bakterilerdir.

'*B. cereus*' genellikle toprak kökenlidir. Bu yüzden bitkilerin üstünde çok rahat bulunabileceğinden bunlarla beslenen hayvanların süt ve süt ürünlerinde bulunabilir. Bunlardan dolayı genellikle gıda zehirlenmelerinde görülür. Sıcak stabil toksinlere neden olurlar [9].

'*Bacillus anthracis*' antrax, şarbon veya çoban çıbanı adı verilen hastalığın etkenidir. Kanlı agar besi yerinde ürer. Tedavisinde genellikle penisilin, aminoglikozidler, sefalosporinler kullanılır.

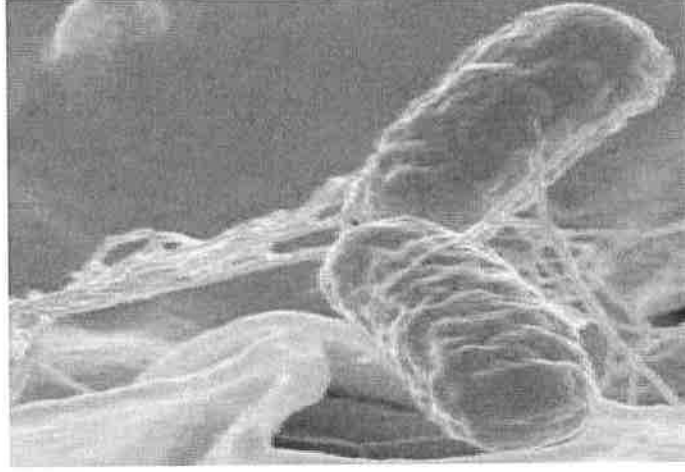
'*Bacillus subtilis*' saprofit bir bakteri olmakla beraber doku içine veya göz içine bulaşarak enfeksiyonlara ve bazı besin zehirlenmelerine neden olabilir.



Şekil 2. 6. *Bacillus anthracis* (<http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>)

2.1.1.f. Salmonella: Tifo ve gıda zehirlenmesine yol açabilen, çubuksu, gram (-) enterobakteri cinsidir. Salmonella türleri hareketlidir. MacConkey agar, XLD agar, XLT agar, DLA agar veya Önöz agar ile izole edilir.

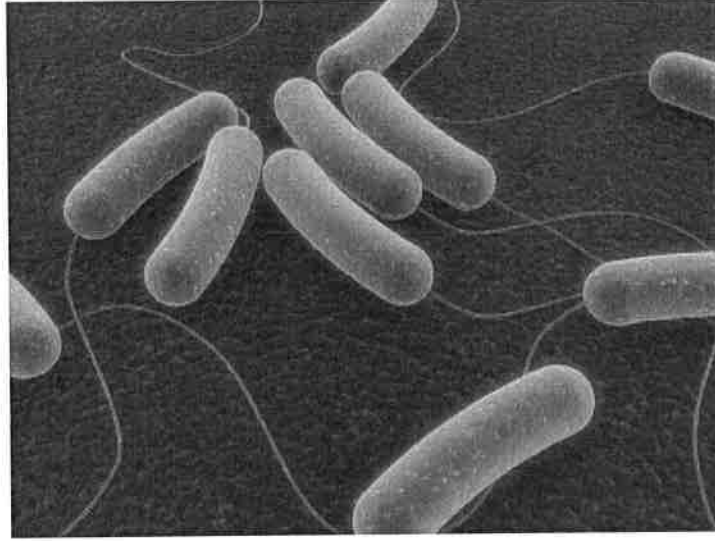
Salmonella typhi tifoya neden olur. Diğerleri daha çok gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır ('*S. cholerasuis*', '*S. enteritidis*').



Şekil 2. 7. *Salmonella typhi* (<http://www.bimcbali.com/medical-news/typhoid-fever-stay-vigilant.html>)

Tedavide antibiyotik kullanılır. Kullanılan antibiyotikler; kinolonlar, ampisilinler, kotrimaksazol, azitromisin [10].

2.1.1.g. Escherichia coli (E. coli): Coli basilli olarak bilinen '*E. coli*', memeli hayvanların ve insanların kalın bağırsağında yaşayan faydalı bakteri türlerindedir.



Şekil 2. 8. *E. coli* (<http://www.agricorner.com/e-coli-outbreak-german-farm-in-uelzen-likely-source/>)

Gram (-)' dir. Ancak bu bakteri meshaneye geçerse idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur. '*E. coli*' içinde hastalık yapan pek çok tipi vardır. Örneğin;

- ✓ *Enteroinvazif E. coli*; doku hücrelerinin içine girip çoğalırlar. Bunun yol açtığı enflamasyon tepkisi doku hasarını artırır.
- ✓ *Diffusely Adherent E. coli*; bir yaştan küçük çocuklarda ishale yol açar. Özelleşmiş fimbrialar sayesinde seyrek bir şekilde epitele bağlanırlar ve hücre içi sinyal mekanizmasını etkinleştirirler. Bu grup hakkında az şey bilinmektedir.
- ✓ *Uropatojenik E. coli*; İdrar yolu enfeksiyonlarının %90'ının nedenidir. Bu *E. coli* tipleri idrar yolu epitel hücrelerine özellikle bağlanabilen fimbriumlara sahiptir.

Uygun tedavi, enfeksiyonun nedeni olan '*E. coli*' tipinin antibiyotik duyarlılığına bağlıdır. *E. coli* enfeksiyonlarını tedavide kullanılacak antibiyotikler arasında amoksisilin, trimetoprim-sülfametoksazol, ciprofloksasin, nitrofurantoin sayılabilir. Geniş spektrumlu β -laktamaz üreten *E.coli* suşları çeşitli antibiyotiklere dayanıklı bir β -laktamaz enzimi üretirler ve bunların tedavisi çok daha zordur [11].

2.1.2.Mantarlar

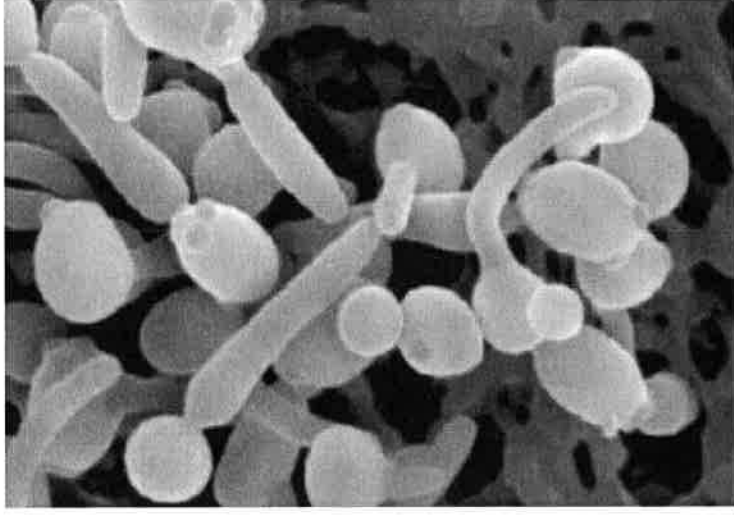
Mantarlar maya veya küf formunda bulunurlar. Mantarlar çok hücreli ve tek hücreli olabilen ökaryotik canlıları kapsayan bir canlılar alemi ve şapkalı mantarların genel adıdır. Halk arasında küf, pas, rastık, maya, mildiyö, şapkalı mantar, kav mantarı, puf mantarı gibi çeşitli isimlerle anılan bütün mantarlar, mantarlar alemi içerisinde incelenirler.

Dünyanın her yerinde bulunurlar. Fazla nemli yerlerde daha çokturlar. Yeryüzünde 1,5 milyon kadar mantar türü olduğu düşünülmekte ise de günümüzde sadece 69.000 kadar türü tanımlanmıştır.

Çoğu insan, mantarların bitki olduğunu düşünmektedir, ancak mantarlar bitki değildir ve mantarlar kendi besinlerini üretemezler. Mayaların en küçüğü (0,1- 10 µm) boyutundadır ama çoğu büyüktür (2- 12 µm), ve mantarlar eşeyli ve eşeysiz üremeyle çoğalırlar. Her 2 durumda da spor oluştururlar. Sporlar 'humenium' adı verilen yapılarda meydana gelir. Eşeyli üremeleri 2 haploid hücrenin birleşmesini içerir. Tek hücreli mantarlar ise tomurcuklanarak çoğalabilirler.

Mantarların hücre duvarları, glukan, manan ve kitin adı verilen polimerlerden oluşur. Çoğu mantarlar parazit olmadan yaşarlar. Ve doğada geniş alana yayılmışlardır.

2.1.2.a. Candida: İnsanlarda ve hayvanlarda mantar hastalığına yol açabilen bir maya cinsidir. En önemli türü *Candida albicans* tır. '*Candida dubliniensis*' diğer bir Candida türüdür. '*Candida albicans*', eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyon etmenidir. *C. albicans* insan ağız ve sindirim sistemi içinde yaşayan pek çok organizmadan biridir.



Şekil 2. 9. *Candida albicans* (<http://popular-science.net/key-step-to-fight-the-candidiasis.html>)

3.BÖLÜM

ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

Günümüzde antibiyotiklerin yanlış kullanılmasından dolayı patojen bakteriler bunlara karşı direnç kazanmıştır ve artık araştırmalar yeni antibiyotik çeşitlerine yönelmiştir. Bundan dolayı da uzun yıllardan beri araştırmacılar ise bitkileri veya bitkilerden elde edilen sekonder ürünleri kullanarak bunların bakteriler üzerindeki etkilerini incelemektedirler. İşte mikrobiyal büyümeyi önleyen kimyasal veya biyolojik maddelere antimikrobiyal denilirken bunların etkilerine ise antimikrobiyal aktivite denir. Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çok değişik şekilde duyarlılık gösterirler. Bu durum, hem antibiyotiklerin yapısına ve hem de mikroorganizmaların türüne göre değişebilir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığın saptanmasında yaygın olarak kullanılan, başlıca 2 yöntem vardır.

3.1.Mikrodilüsyon Metodu

Bu teknik antimikrobiyal ilaçların MIC (minimal inhibitör konsantrasyonu) ve MLK (minimal letal konsantrasyonlu) değerlerini belirlemede yardımcı olur. Bu amaçla, Mueller-Hinton buyyonunda antimikrobiyal ilacın 2 veya 10 katlı dilüsyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta ilaç içeren dilüsyonları elde edilir. Örn; ilaç 1 mL'de 256 µg' dan başlayarak, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 µg/mL giderek azalan şekilde iki katlı sulandırılır. Üzerlerine, izole edilen test mikroorganizmanın 24-48 saatlik sıvı besiyeri kültüründen ekilir ve iyice karıştırıldıktan sonra 24-48 saat 37 °C' de inkübe edilir. Tüplerdeki üreme gözle değerlendirilir. Böylece üremenin olmadığı son dilüsyon MIC değeri olarak kabul edilir. Ancak, bu noktanın kesin olması için, testin

ikili paralel yapılması uygundur. Eğer, süre yetersiz ise uygun bir süre yine inkübasyon da tutulabilir [12].

3.2.Disk Difüzyon Metodu:

Kirby-Bauer yöntemi olarak da bilinen bu teknikte, test mikroorganizmanın 6-8 saatlik buyyon kültüründen (hafif bulanık) Mueller-Hinton agar plaklarına 0,1-0,2 mL miktarında ekilir ve bir baget'le iyice yayılır (steril swab'ta aynı amaç için kullanılabilir). Agarın yüzeyi oda ısısında kuruduktan sonra (5-10 dk), agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlar da değişik antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ve 24-48 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonları kompas veya cetvelle ölçülür ve standart zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı (S), indermediate (İ) ve duyarsız (R) olarak değerlendirme yapılır [12].

Kirby-Bauer yönteminde, aynı zamanda, bir ilacın sıvı besiyerinde saptanan (MIC) değeri (?g/mL) ile agar üzerindeki zon çapı/mm karşılaştırılarak da duyarlı intermedier ve dirençli bölgeler grafikte belirlenebilir. Böylece, kandaki konsantrasyonunun ne olacağı saptanır. Ayrıca, zon çapına göre MIC değerlerini de bulmak mümkündür. Disk diffüzyon yöntemi az masraflı, az zahmetli ve kolay uygulanırlığı yanı sıra, bir petri kutusunda 5-6 antibiyotiğe karşı duyarlılığı belirlemek ve en etkili olan ilacı saptamak mümkündür. Bu nedenle çok fazla tercih edilmektedir [12].

Önemli olan nokta, bulunan bu değerlere dayanarak kandaki ilaç yoğunluğunun ne olması gerektiğini belirlemek ve bu konsantrasyonun devamını yeterli sürede sağlamaktır. Genellikle, MİK değerinin üstündeki MLK değerlerinden uygun olanı seçilir ve kısa süre içinde bu yoğunluğa ve infeksiyon odağına ulaşabilmek için verilecek doz ve zaman ayarlanır.

Bu yöntemde en önemli nokta, ilk 24 saat içinde inhibisyon zonu içinde hiçbir koloni görülmezken, inkübasyon 48 saat'e çıkarıldığında, bu zon içinde koloniler oluşmaya başlar. Bu durumda, MIC ile MLK değerlerini kesin belirlemede acele edilmemesi gerekeceğini ifade eder. Bu yönden dikkatli olmak lazımdır.

3.3.Diğer Teknikler:

Mikrotitrasyon ve agar içinde dilusyon yöntemleri daha az başvurulan teknikler arasındadır [12].

4.BÖLÜM

ANTIOKSİDAN

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında (örneğin; enerji üretilirken), hücresel solunum gerçekleştirilirken veya çevresel ajanlar (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Bu tür reaktifler çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olmaktadır. Bunlar vücuttan uzaklaştırılmazsa baş ağrısı, kanser, kalp hastalıkları, erken yaşlanma gibi hastalıklara neden olur [13,26,29]. Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü, reaktif moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), singlet oksijen (1O_2) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) olup “reaktif oksijen türleri (ROT)” olarak bilinirler. ROT’ lar organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilirler [13].

Dokuları bu zararlardan koruyabilmek için serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Antioksidanlar serbest radikallerin etkilerini yok edici sistemlerdir. Vücutta ROT’ ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek üzere enzimatik veya enzimatik olmayan birçok endojen antioksidan savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunun yanında bazı ilaçlar, vitaminler ve sentetik gıda

antioksidanları da eksojen antioksidanlar olarak değerlendirilebilir. Serbest radikal oluşumunu geciktiren veya tamamen durduran koruyucu antioksidanlar (enzimler, metal şelatörleri) veya lipid peroksidasyonunun ilerlemesini engelleyen zincir kırıcı antioksidanlar (askorbik asit, α -tokoferol, flavonoidler) olarak etki gösterirler [13].

Serbest Radikaller

Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduruyorsa “serbest radikal (SR)” olarak tanımlanır. Kimyasal tepkimeler atomların en dış kabuklarında yer alan değerlik elektronlarla gerçekleşir. Bundan dolayı serbest radikallerin en dış kabuğunda eşleşmemiş elektron olduğundan kimyasal türün reaktivitesini oldukça fazla arttırlar. Ve bundan dolayı oldukça reaktiflerdir [14]. En basit serbest radikal bir elektron ve bir protonu olan hidrojen atomudur. Serbest radikallerde eşleşmemiş elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile belirtilir.

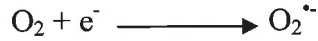
Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücresele koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur:

- a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar veya yüksek sıcaklık (300-400°C) kovalent bağın kopmasına neden olur. Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır.



- b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalabilir. Bu durumda radikal formu oluşur. Örneğin, askorbik asit ve tokoferol gibi hücresele antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.

- c) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektronun transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşturuluyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi oluşturur.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller, serbest oksijen radikalleri (SOR) olmakla beraber; C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller de vardır. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [13].

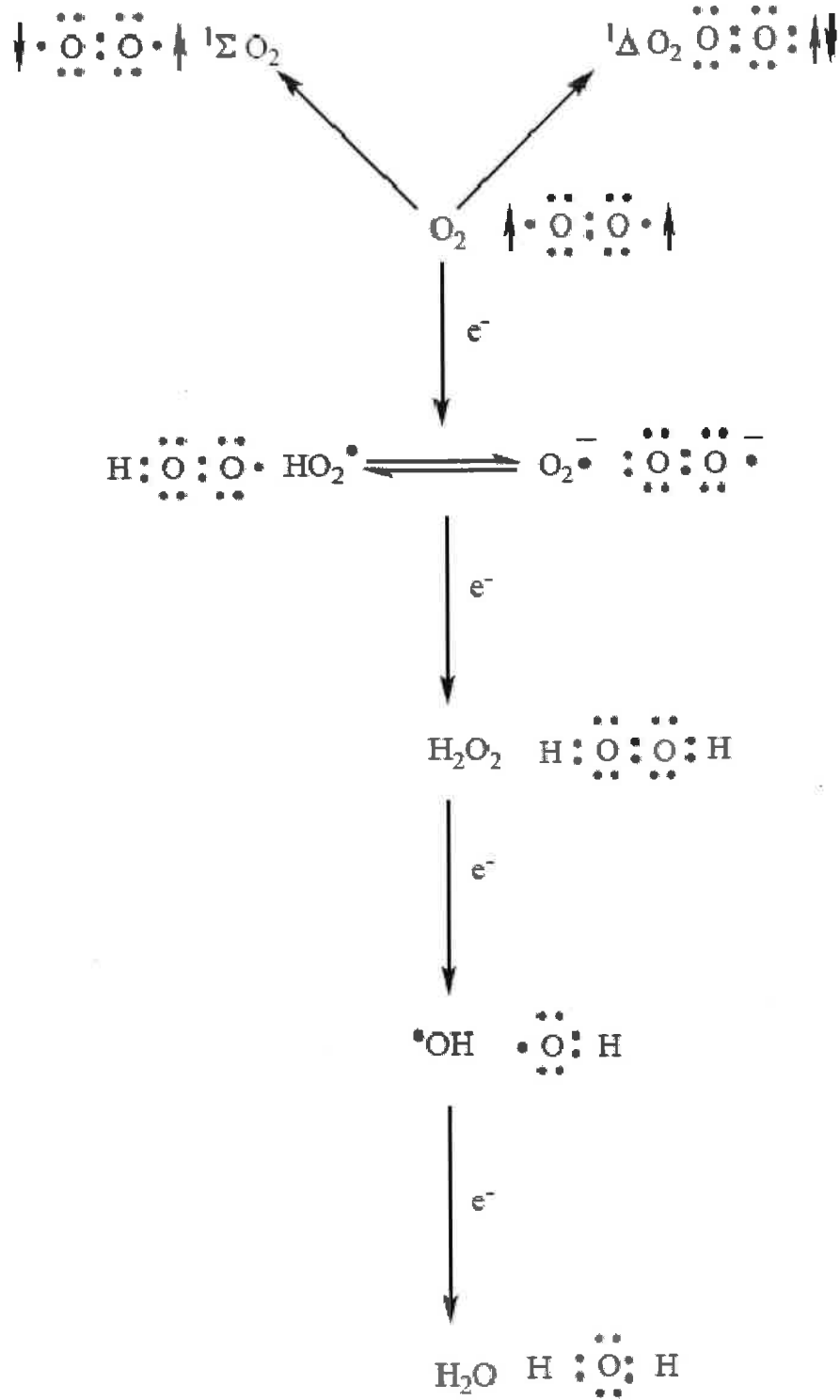
4.1.Oksijen ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen bütün canlılar için çok önemli bir element olup karbon, azot, hidrojen ve kükürtle birlikte organik moleküllerin yapısına katılır. Bunun dışında aerobik canlıların enerji metabolizması rolü nedeniyle oldukça önemlidir. Bilinen bütün canlı türleri için oksijene moleküllerin içindeki şekli ile gereksinim duysalar da; moleküler oksijen bütün canlılar için aynı anlamı ifade etmez. Moleküler oksijen (O_2), iki kovalent bağ yapmasına rağmen, molekülün paramanyetik özellikte olması eşleşmemiş elektron içerdiğini gösterir. Dış orbitallerinde bulunan iki elektron, spinleri aynı yönde ve farklı orbitallerde iken molekül minimum enerji seviyesindedir. Serbest radikal tanımına göre oksijen bir “diradikal” olarak değerlendirilir. Diradikal oksijen, spin kısıtlanmasından dolayı radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde, diğer serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girer.

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. Bunlar arasında süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet -}$),

hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin (H_2O_2) özel yerleri vardır ve “reaktif oksijen türleri (ROT)” olarak bilinirler [13,28].

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}\bullet$), peroksil (peroksi) radikalleri ($\text{ROO}\bullet$), alkoksil (alkoksi) radikalleri ($\text{RO}\bullet$), tiyil radikalleri ($\text{RS}\bullet$) gibi önemli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Tiyil radikalleri oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($\text{RSO}\bullet$) veya tiyil peroksil ($\text{RSO}_2\bullet$) gibi radikalleri de meydana getirebilirler [13].



Şekil 4. 1. Oksijenin suya indirgenmesi ve diğer oksijen türlerinin oluşumu

Aerobik canlılarda süperoksitlerin hidrojen perokside dönüşmesini katalitik etkisi çok yüksek olan süperoksit dismutaz (SOD) gerçekleştirir.

Tablo 4. 1. Bazı serbest radikal türleri

ADI	FORMÜLÜ	TANIMI
Hidrojen atomu	H^{\bullet}	En basit serbest radikal
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif
Hidroksil	$^{\bullet}OH$	En fazla reaktif oksijen radikali. İnsan vücudundaki tüm radikallere saldırır.
Triklorometil	CCl_3^{\bullet}	Karbon merkezli radikal. CCl_4 metabolizması sonucu üretilir ve genellikle O_2 ile kolay reaksiyona girer.
Tiyil	RS^{\bullet}	Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adıdır.
Peroksil, Alkolsil	RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet}	Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikaller.
Nitrik oksit	NO^{\bullet}	L-arginin amino asidinden <i>in vivo</i> koşullarda üretilir.
Azotdioksit	NO_2^{\bullet}	NO^{\bullet} ' nun O_2 ile reaksiyonu sonucu oluşur. Kirli hava, sigara dumanı vb. bulunur.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.
Singlet oksijen	1O_2	Oksijenin güçlü oksidatif formu.

Reaktivite radikale ve ortamda bulunan moleküle bağlıdır. İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronları kovalent bağ yaparak birleşir. Ancak bunun sonucunda oluşan türler de reaktif olabilir. Buna örnek NO^{\bullet} ve $O_2^{\bullet-}$ 'in çok hızlı reaksiyonu ile bir nonradikal ürün olan peroksinitritin oluşumu verilebilir:

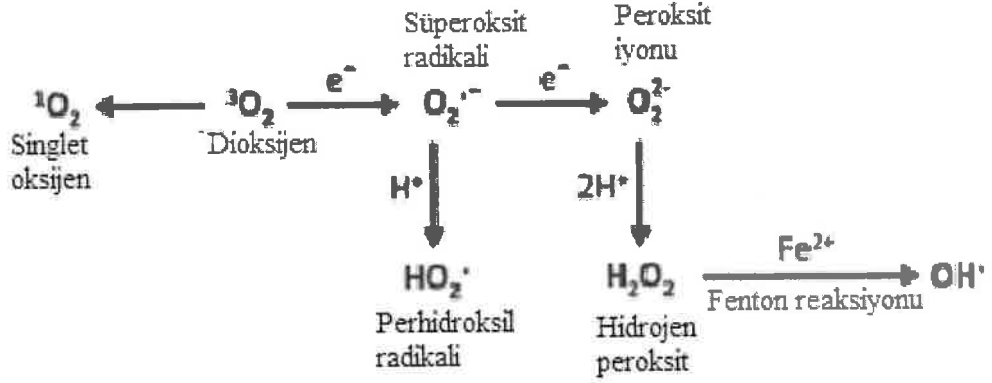


Bununla birlikte bir serbest radikal, radikal olmayan bir madde ile reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturabilir. Biyolojik moleküllerin büyük bir kısmı radikal olmadığı için, in vivo şartlarda reaktif bir radikalin oluşumu, genellikle zincir reaksiyonunun başlamasına yol açabilir [13].

4.1.1. Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

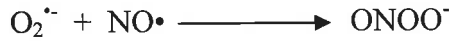
Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınışına neden olabilir. Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Başlıca şu yollarla üretilmektedir:

1. Katekolaminler, hidrokinoonlar, redükte flavinler, tiyoller, tetrahidrofolatlar gibi biyolojik moleküllerin aerobik ortamda otooksidasyonu sonucu süperoksit oluşur.
2. Aktive olmuş fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller), virüs veya bakteriyi inaktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler.
3. Mitokondriyal enerji metabolizması sırasında oluşan elektron sızıntısı sonucu kullanılan oksijenin %1-3'ü süperoksit radikali yapımı ile sonlanır.
4. İndirgenmiş geçiş metallere otooksidasyonu süperoksidi meydana getirebilir. Süperoksit radikalının önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücresel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Süperoksit radikali ve perhidroksi radikali birbiriyle reaksiyona girince biri yükseltgenir, diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu H_2O_2 oluşur:



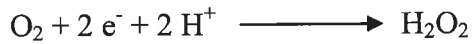
Şekil 4. 2. Enerji transferi yoluyla ROS' un üretimi

Süperoksidin fizyolojik bir serbest radikal olan NO^{\bullet} ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevidir olan peroksinitrit meydana gelir. Bu şekilde NO^{\bullet} normal etkisini inhibe eder, ayrıca peroksinitritler direkt proteinlere etki ederler.



4.1.2.Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu H_2O_2 oluşur.

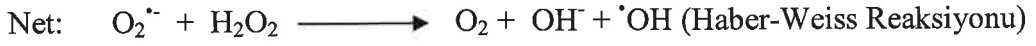
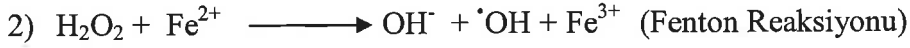


Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi süperoksidin nonenzimatik veya SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 'ye dönüşmesiyle olur.



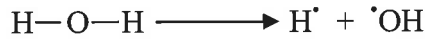
Örneğin; süperoksit anyon radikali ferritinden demiri serbest bırakarak demir(III)'ün demir(II)'ye indirgenmesini sağlar. Daha sonra SOD' un sonucu olarak üretilen

indirgen H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ nin OH^{\bullet} e dismutasyonuna yol açar. Bu reaksiyonlar Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılır. Bunu tam tersine final adımı H_2O_2 yoluyla demir(II)' nin oksidasyonunu içerir. Bu da fenton reaksiyonları olarak bilinir [18]. H_2O_2 bir radikal olmadığı halde, ROT içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür.

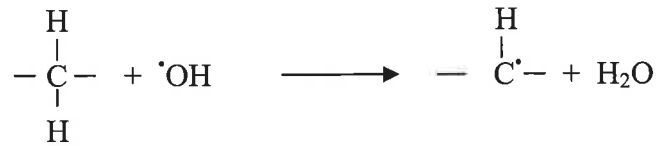


4.1.3.Hidroksil Radikali ($\text{}^{\bullet}\text{OH}$)

Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur.



Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekül ile tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS^{\bullet}), C merkezli organik radikaller (R^{\bullet}), organik peroksitler (RCOO^{\bullet}) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olur.



Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girse de özellikle elektronca zengin bileşikler tercihli hedefleridir, nükleik asitler (pürin ve pirimidin bazları) ve proteinler (aromatik amino asitler) ile çeşitli radikalik tepkimeler verir.

4.1.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşimidir.

Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kJ) olduğundan sigma şekline (155 kJ) göre daha uzun yarı ömürlüdür.

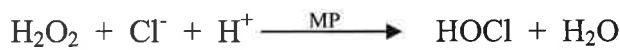


Şekil 4. 3. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) [13]

Vücutta, pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorblamasıyla, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyon tepkimesi sırasında, porfirya gibi porfirin metabolizması hastalıklarında oluşabilir [13].

4.1.5. Hipoklorik Asit (HOCl)

Doku makrofajları gibi fagositik hücreler, nötrofil, eozinofil gibi granülositler mikroorganizmaları öldürmek için klorlanmış oksidanlar üretebilir. HOCl miyeloperoksidaz enzimi tarafından H_2O_2 ve Cl⁻ iyonunun birleşmesi sonucu oluşur. Dokularda hasar oluşturan güçlü bir oksidandır [13].



4.1.6. Nitrik Oksit (NO[•])

NO[•] hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahip serbest radikaldir. Nitrik oksit çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arginin ve oksijenden nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle sentezlenir. Vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatördür, önemli bir nörotransmitterdir, inflamasyon ve enfeksiyon durumlarında sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenerek bol miktarda üretilir ve parazitlerin öldürülmesinde rol oynar.

NO[•] insan metabolizmasında yararlıdır, fakat fazlası sitotoksik olabilir. Nitrik oksidin süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO⁻), nitrik oksitin toksisitesinden sorumlu başlıca bileşiktir. Proteinlerdeki -SH gruplarını oksitleyerek direkt zarar verebilir. Ayrıca fizyolojik pH'da protonlanabilir ve güçlü bir lipid peroksidasyon başlatıcısı olan azotdioksiti (NO₂[•]), hidroksil radikalini ([•]OH), fenilalanin, tirozin gibi aromatik halkaları nitrolama ajanı olan nitronyum iyonunu (NO₂⁺) oluşturabilir [13].

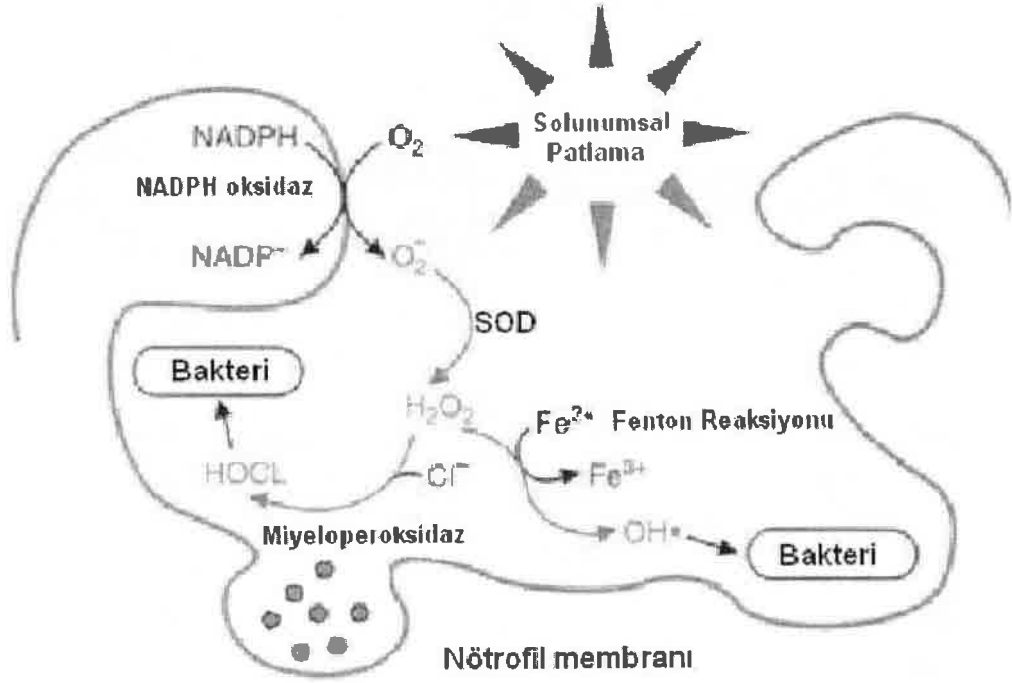
4.2. Hücredeki Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri organizmada özel metabolik olaylar için veya "kazara" üretilirler.

Biyolojik Kaynakları

- a) Solunumsal Patlama: Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve fagositik lökositler çeşitli biyolojik hedeflerin parçalanmasını sağlayan ve enfeksiyona karşı vücudun hücre sel cevabını başlatan hücrelerdir. Fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu, H₂O₂, hidroksil radikali ve hipoklorik asit) oluşur. Fagositte edilmiş mikroorganizma, bakteri bu ürünlerin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konakçı hücrelerine zarar verirler ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynarlar. Örneğin romatoit artritli (RA) hastaların diz eklemlerinde fazla miktarda nötrofil

birikir ve bunlardan ortalama salınan serbest radikaller eklem hasarını hızlandırır.

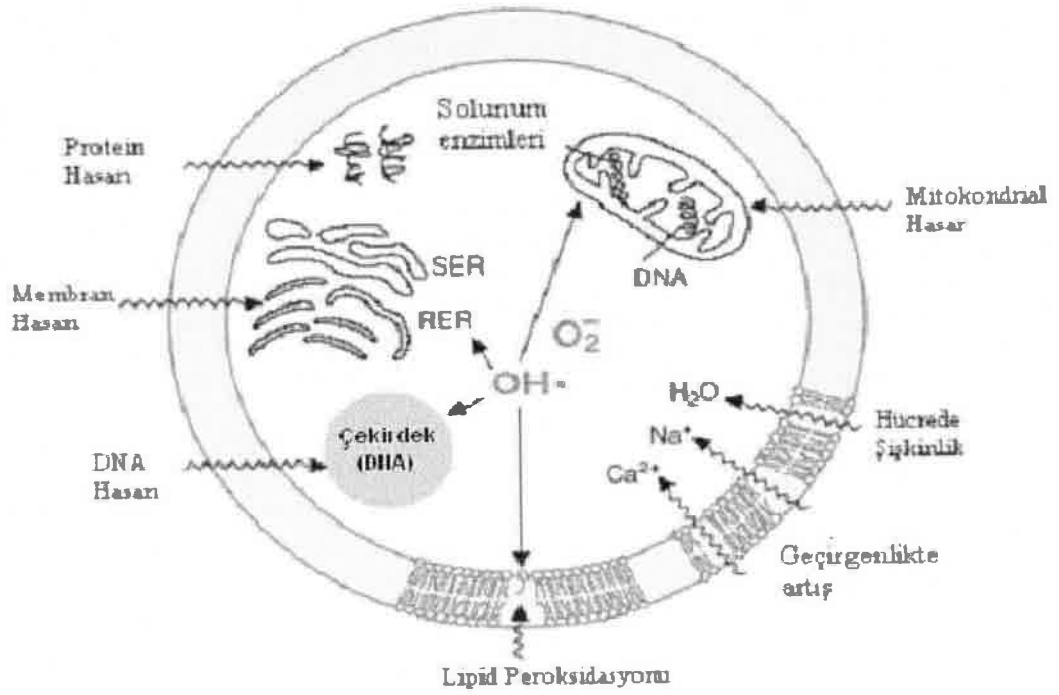


Şekil 4. 4. Fagositik solunumsal patlamada oluşan reaktif oksijen türleri [13]

- b) Radyasyon ve çevresel ajanlar (hava kirliliği, pestisidler, sigara dumanı, çözücüler, anestezipler, aromatik hidrokarbonlar) serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır.
- c) Antineoplastik ajanlar (nitrofurantoin, bleomisin, doxorubicin, adriksimicin): Antikarsinojen bir ajan olan doxorubicin hücrenin DNA replikasyonu inhibe eder. Bu sırada H₂O₂ ve O₂^{•-} oluşumuna ve sonuçta lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar.
- d) Stres: Sinirsel uyarılar katekolaminlerin sentezinde artış yapar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır. Bu olay stresin hastalıkların patogeneziindeki rolünün serbest radikal üretimiyle ilgili olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

4.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Güçlü reaktif özelliğe sahip olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşebilirler. Hücresinin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin oluştuğu zincirleme bir reaksiyon başlatırlar.



Şekil 4. 5. Serbest radikallerin hedefleri [13]

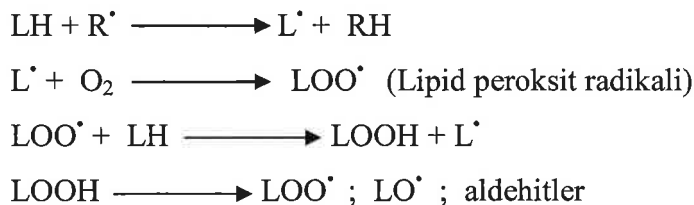
4.3.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki ve gıdalardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poli doymamış yağ asitlerinin (Poly unsaturated fatty acid- PUFA) oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler [20]. Bu da **nonenzimatik lipid peroksidasyonu** olarak bilinir. Lipit peroksidasyonunda membranda veya serbest yağ asitlerinde

başlaması hidrojen atomu çıkarabilecek reaktiviteye sahip herhangi bir türün saldırısından kaynaklanır. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle $\cdot\text{OH}$ ' in, membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerindeki (PUFA) konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar (radikalik reaksiyonun başlama aşaması). Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali ($\text{L}\cdot$) niteliği kazanır. Molekül içi bir düzenlenme ile daha kararlı olan konjuge dienler oluşur. Aerobik şartlarda, konjuge dienin moleküler oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksil radikalleri ($\text{LOO}\cdot$) oluşur. $\text{LOO}\cdot$ oluşumu önemlidir, çünkü membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin ($\text{L}\cdot$) oluşumuna yol açar. Kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlere (LOOH) dönüştür. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir [20]. Ayrıca membran proteinlerine de saldırabilir. Böylece reaksiyon otokatalitik olarak devam eder. Bu lipid peroksidasyonunun ilerleme aşamasıdır. Aslında çoklu doymamış yağ asidindeki karbon atomu, yeni moleküler düzenleme ile daha kararlı hale gelmek istemektedir [14].

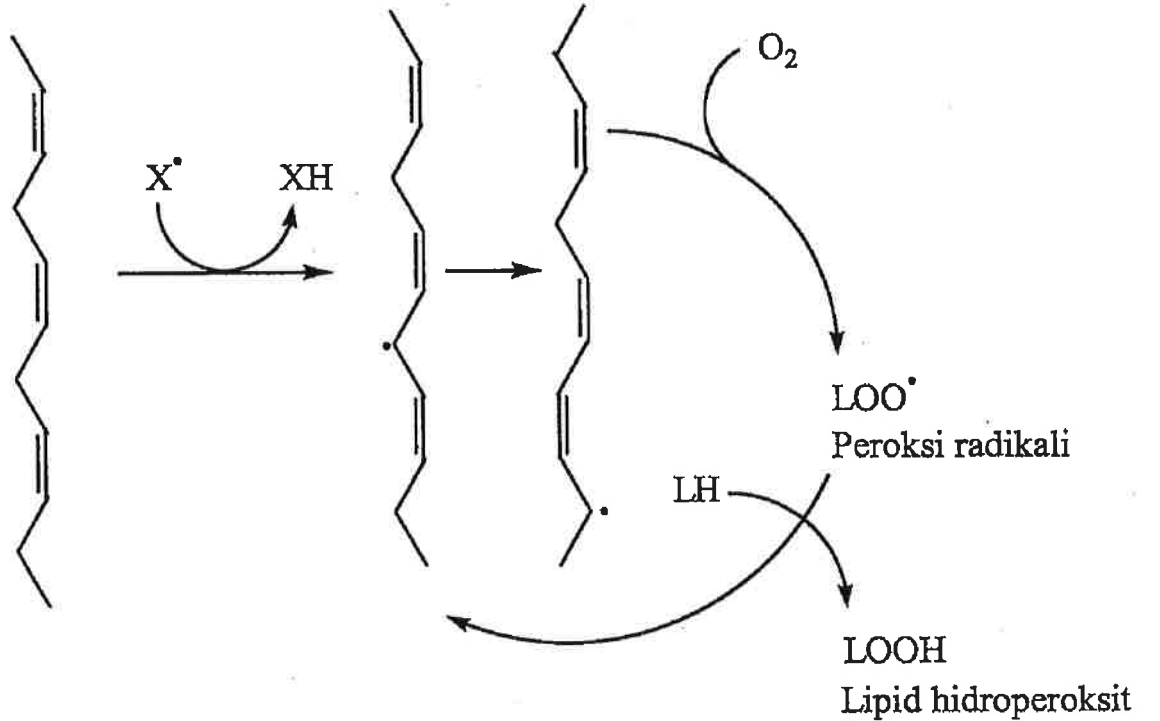
Lipid peroksidasyonu lipid peroksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine yıkılması ile sona erer (sonlanma basamağı). Yıkıldıklarında, çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir veya ilk atak bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu; lipid peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilen malondialdehit (MDA) oluşur. Lipid peroksidasyonu, membran yapısına direkt ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirekt olarak zarar veren geri dönüşümsüz bir olaydır [13].

Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen hücre zararları geri dönüşümsüzdür [20]. Aşağıdaki reaksiyon serisi lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonlarıdır.



Hücre membranındaki ve intrasellüler membranlardaki lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hepsiyle uyarılabilir ve redoks katalisti olarak görev yapan geçiş metallere varlığında artar.

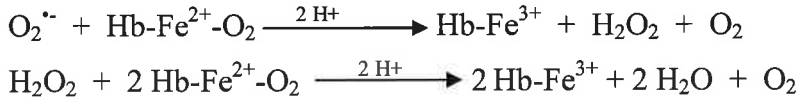
Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehytlere üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması yüzünden reaksiyonlarının çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bunun sonucu deformasyon, iyon geçişi, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi farklı şekillerde membran özelliklerini değiştirir [20].



Şekil 4. 6. Poli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu [20]

4.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

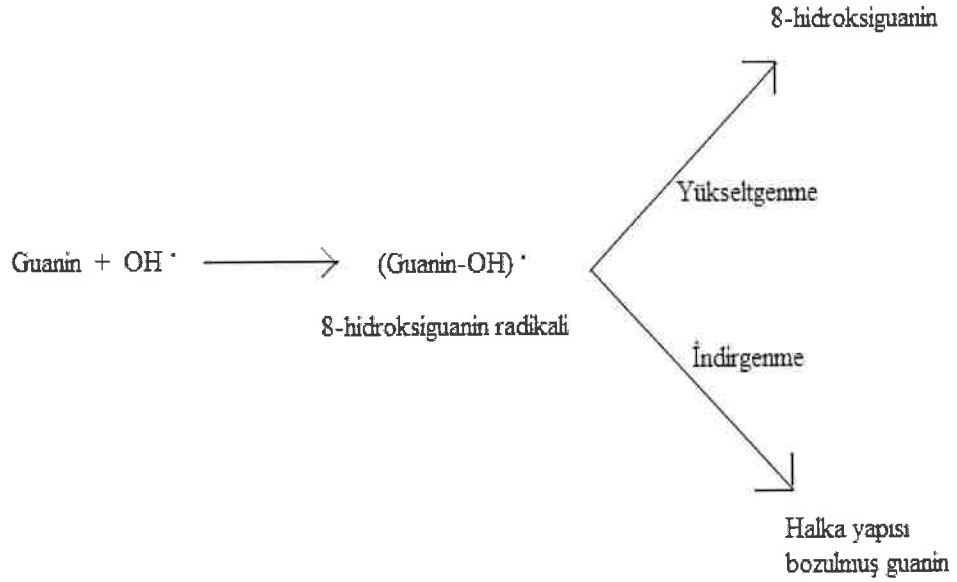
Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastır, ancak proteinin aminoasit içeriğine göre radikalik hasardan etkilenme derecesi değişir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobulin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. ‘Hem’ proteinleri (hemoglobin) de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{+2}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlıdır. Özellikle oksihemoglobinin $O_2^{\cdot-}$ veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşmasına sebep olur [20].



4.3.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA’ ya Etkileri

DNA serbest radikallerden kolay etkilenen bir hedeftir. İyonize edici radyasyonla oluşan radikaller, DNA’yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yol açabilirler. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar. DNA hasarı onarılmazsa hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir [13].

Süperoksit üretimi ise en fazla mitokondride olduğundan mitokondrial DNA daha fazla zarar görür.



Şekil 4. 7. Hidroksil radikallerinin DNA' ya etkileri

4.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve oksoaldehitler meydana gelmektedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelen süperoksitler ve okzalaldehyitler diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynar. Okzaldehyitler ayrıca DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar [13].

Organizmada normal metabolizma sırasında ve patolojik işlemler sonucu üretilen serbest radikaller hücrel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldığı için, ROT üretimi antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Ancak bazen serbest radikallere metabolize olan toksinler, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, malnütrisyon sonucu diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Hücrel savunma mekanizmaları vasıtasıyla ortadan kaldırılından daha fazla ROT oluştuğunda “oksidatif stres” durumu ortaya çıkar. **Oksidatif stres** “oksidanlar ve

antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve hücre hasarına yol açması” olarak tanımlanır. Oksidatif stresin, ROT’ ların neden olduğu hücre hasarları sonucu birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit, iskemi/reperfüzyon hasarı, ateroskleroz, yaşlanma, diabetes mellitus, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, sigara kullanımı ve hava kirliliğinin neden olduğu rahatsızlıklar ve KOAH gibi akciğer hastalıkları, çeşitli kanser türleri, felç, hipertansiyon, romatoid artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar, alerji, astım, septik şok, inflamasyon, akut pankreatit, yaşlanmaya bağlı maküler hastalıklar ve katarakt gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir. Ancak serbest radikallerin hastalıklar üzerindeki önemi ve rolü incelenirken, serbest radikal oluşumunun hastalığın nedeni mi, yoksa sonucu mu olduğunun ayırımına varılmasının önemi vurgulanmaktadır [17].

4.4. Antioksidanlar

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve ekzergonik kaynaklı, çok çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplasmin gibi) ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan çeşitli antioksidan fitonutrientlerdir.

“**Antioksidan**” terimi uluslararası kabul edilmiş herhangi bir tanım ile sınırlanmamıştır. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir ve doku hastalıklarını engelleyebilirler. Antioksidanlar serbest radikallere dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirmek. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip; onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltmak veya inaktif şekle dönüştürmek. Vitaminler, flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Zincir kırıcı: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak fonksiyonlarını engellemek. Mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarları onarmak [4].

Prooksidanlar ise lipitler, proteinler, nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olan ve bunun sonucu olarak çeşitli patojenik olaylara ve hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Antioksidanlar hücrelere zarar veren bu prooksidanları etkin bir şekilde düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler [16]. Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir:

a) ROT oluşmasını engelleyen sistemler: Demir ve bakır iyonlarını bağlayan metal şelatörleri, mitokondride doğal olarak oluşan ROT' ları indirgeyen mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi.

b) ROT' ları yakalayıp nötralize eden antioksidanlar: Flavonoidler, α - tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit, β -karoten, indirgenmiş glutatyon, mukus gibi. Bu tür antioksidanlar radikalik zincir reaksiyonunun başlamasını inhibe eder veya zincir reaksiyonunun ilerlemesine engel olarak radikalik reaksiyonu sona erdirirler.

b) Oluşan radikalleri detoksifiye eden sistemleri: ROT' ları daha az toksik ürünlere dönüştüren enzim sistemleridir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

4.5. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanların Sınıflandırılması

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, serbest radikal ürünleri ve peroksidler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı, antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan iki kategoride incelenebilir [17]:

Tablo 4.2. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal	Yapay
Süperoksit Dismutaz(SOD)	Vitamin C	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon Peroksidaz (GPx)	α -Tokoferol	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon-S-Transferaz (GST)	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Katalaz	Karotenoidler	Tersiyer bütillhidrokinonlar(TBHK)
Glutatyon redüktaz (GR)		Nordihidroguareyetik asit(NDGA)

Doğal kaynaklardan antioksidanlar için araştırmalar çok ilgi almış ve aktif antioksidan bileşikleri için yeni doğal kaynaklar araştırılmaktadır.

4.6. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili çalışmalar incelendiği zaman farklı araştırmacılar tarafından antioksidan kapasiteyi tanımlamak için farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Karşılaşılan terimler total antioksidan ‘kapasite’ veya ‘etkinlik’, ‘güç’, ‘parametre’, ‘potansiyel’ ve ‘aktivite’ dir. Bir kimyasalın ‘aktivitesi’ basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı, diğer reaktifler gibi spesifik reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır. Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen ‘antioksidan aktivite’ o yöntemde uygulanan spesifik

koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığı için verileri 'total antioksidan aktivitenin' göstergesi olarak genellemek uygulanamayabilir ve yanıltıcıdır. Bu nedenle 'aktivite' terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları 'kapasite' olarak sunmak önemlidir. Ya da 'süperoksit süpürücü kapasite', 'demir iyonu indirgeme kapasitesi' gibi ölçüm yöntemini daha spesifik olarak belirten terimlerin kullanılması da önerilmektedir [18].

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından 2 ye ayrılır:

- i. Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
- ii. Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT- esaslı analiz yöntemlerinin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir. HAT- esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur. ET-esaslı yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan (aynı zamanda reaksiyonu takip etmek için prob olarak kullanılır) ile redoks reaksiyonunu içerir.

HAT reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır. HAT analiz yöntemleri:

- a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu,
- b) Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC)
- c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- d) Crocin bleaching deneyleri
- e) Süperoksit radikali indirgeme aktivitesi
- f) Hidrojen peroksit giderme aktivitesi
- g) ABTS radikali süpürücü grup olarak sıralanabilir.

ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgendiğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılıdır. ET esaslı analiz yöntemleri:

- a) Folin- Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- b) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan (FRAP) ölçümü

- d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan ‘toplam antioksidan potansiyel’ ölçüm yöntemi
- e) DPPH kullanarak ‘toplam antioksidan potansiyel’ ölçüm yöntemi
- f) CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi
- g) Metal-Şelat aktivitesi tayini olarak sıralanabilir.

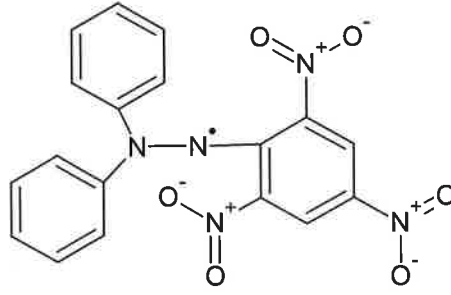
Bu yöntemlerden FCR’ in antioksidanın indirgeme kapasitesinin belirlenmesinde ve ORAC’ in antioksidan radikal süpürücü kapasitesinin belirlenmesinde kullanılması önerilmektedir [19].

Antioksidan kapasitenin ölçümünü için literatürde 20 den fazla yöntem vardır. Bitkilerin antioksidan kapasiteleri, seçilen tayin yöntemine oldukça bağımlıdır [17].

Bu çalışmada kullanılan antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin prensipleri aşağıda açıklanmıştır.

4.6.1.DPPH Kullanarak ‘Toplam Antioksidan Potansiyel’ Ölçüm Yöntemi

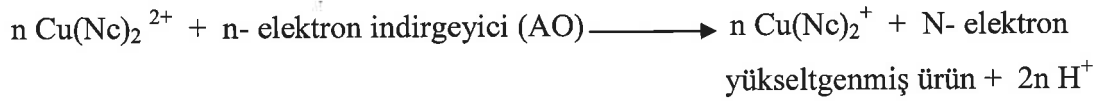
Serbest radikal süpürücü aktiviteyi belirlemek için kullanılır. Bu yöntem ilk kez 1958’ de Blois tarafından kullanılmaktadır. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali ticari olarak mevcut, stabil radikallerden biridir. Fenolik antioksidanların aktiviteleri üzerinde yapı etkisini çalışmak için kullanılan ilk sentetik antioksidanlardan biridir [13]. DPPH’ ın yapısında bulunan radikalik azot etanol çözeltilisinde mor renklidir ve 515 nm’de maksimum absorban verir. Antioksidan tarafından indirgenince rengi açıldığı için reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometrik yol ile izlenir. DPPH’ in renginin açılması antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Kolay, verimli ve hızlı olmasından dolayı avantajlıdır. Birçok antioksidan bileşik lipid peroksidasyonunda rol oynayan peroksit radikalleri ile hızlı tepkime verir. Ancak DPPH ile peroksit radikalleri yavaş tepkime verir. Bu da bu yöntemin dezavantajı sayılmaktadır.



Şekil 4. 8. DPPH' ın yapısı

4.6.2.CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Bu yöntem 1991 yılında kullanılmaya başlanmış ancak daha ileriki zamanlarda Reşat Apak grubu tarafından geliştirilmiştir. Bu yeni geliştirilen yöntem toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiştir ve hem hidrofilik hem de lipofilik toplam antioksidan kapasitesi ölçülebilir. Bu yöntemde kullanılan bis(neokuproin) bakır(II)klorür kolaylıkla elde edilebilir, stabil ve seçicidir. Antioksidan polifenol arasındaki reaksiyon aşağıdaki gibi ilerlemektedir:



Bu reaksiyon sonucunda iki proton açığa çıkmaktadır. Cu(II)-Nc ise 450 nm' de ise maksimum absorbans veren renk oluşumuyla birlikte Cu(I)- Nc kelatına dönüşmektedir. Bu işlem pH=7,0 amonyumasetat tamponunda gerçekleşir. Bu yöntemi uygulamak çok basit ve hızlıdır. Bu CUPRAC reaktifi diğer kromojenik reaktiflerden daha stabil ve elde edilmesi daha kolaydır. Bu CUPRAC reaktifinin reaksiyonu oldukça hızlıdır. Bu metotta konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineerdir. Bunlardan da görüldüğü gibi bu yöntemin birçok avantajı mevcuttur [21].

4.6.3. ABTS Radikal Süpürücü Kapasitesi Ölçüm Yöntemi

1993 yılında Miller ve arkadaşları tarafından tanımlanmış bir yöntemdir. Renk değişimine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde göre; 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) peroksidaz ile inkübe edildiği zaman stabil radikal katyonu olan $ABTS^+$ formu oluşur. $ABTS^+$ 'nın bu formu numune ile etkileşimi stabil mavi-yeşil renk oluşur ve en yüksek absorban değerinde ölçüm yapılır [22].

4.6.4. Metal-Şelat Aktivitesi Tayini

Yaşamamız için temel elementlerden biri olan demir, aynı zamanda lipid, protein ve diğer bileşenlerle istenmeyen oksidatif reaksiyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca demir fenton reaksiyonları sonucunda serbest radikal oluşturma kabiliyetindedir. Bu nedenle Fenton reaksiyonlarındaki Fe^{2+} konsantrasyonunun azalması ile oksidatif hasara karşı koruyucu etki görülmektedir [23].

Metal-şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler ve böylece fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumunu inhibe ederler. Bir başka deyişle, metal şelatlama aktivitesi, ortamda bulunan Fe^{2+} iyonlarının inhibisyonuna dayanır. Aktivite kendini şelat ajanlarının demir iyonlarını şelatlaması sonucu kırmızı renkteki azalmayla gösterir. Metal-şelatlama aktivitesi lipid peroksidasyonundaki katalize olmuş geçiş metallerini indirgediği için önem taşımaktadır [23].

4.6.5. Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü

Bu metotta $Fe(III)$ tripiridiltriazin (TPTZ) kompleksinin antioksidanlar varlığında renkli $Fe(II)$ şelatına indirgenmesinden yararlanılmaktadır. Reaksiyon süresi kısadır (yaklaşık olarak 4 dk) ancak bazı polifenoller daha yavaş reaksiyon verebilirler. FRAP sadece ferik iyonları indirgeyebilen maddeleri ölçer [23]. FRAP' ın dezavantajı ise glutatyona cevap vermemesidir.

4.6.6. Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Analizi

Bu yöntem 1965' de Singleton ve Rossi tarafından önerilmiş ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır. Yöntem test edilen materyalin reaktifin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer. Ancak bu reaktifin sadece total fenolik bileşik miktarını ölçmediği ve örnek içinde mevcut tüm indirgen maddelerle de reaksiyon vereceği bilinmektedir. Bu nedenle reaktifin sadece örnekteki fenolik bileşik düzeyini değil örneğin total indirgeme kapasitesini de ölçtüğü konusunda tartışma vardır. Buna rağmen Folin-Ciocalteu reaktifi ile total fenolik bileşik miktarı tayini çoğu antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir [17].

4.6.7. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi

NADH/PMS/O₂ sistemi ile ve riboflavin/metiyonin sisteminde flavinin fotokimyasal indirgenmesi ile non-enzimatik olarak veya hipoksantin/ksantin oksidaz sistemi ile enzimatik olarak süperoksit radikali üretilir. Radikal giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT' nin indirgenmesiyle tayin edilir. Bu metotta oluşturulan O₂^{•-} radikalleri sarı renkli NBT²⁺ yi mavi renkli formazan türevine indirger. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilir. Ancak NBT' nin direk antioksidan tarafından indirgenmesi de söz konusudur [13].

5.BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

5.1. Materyal

5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda EtOH (Merck), Mueller-Hinton besiyeri (MHB) (Oxoit), Kanlı besiyeri (Biomerieux), RPMI besiyeri, MOPS (Sigma), CuCl₂ (Merck), CH₃COONH₄ (Merck), Neocuproine (Nc) (Aldrich), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Aldrich), K₂S₂O₈ (Merck), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-aldrich), FeCl₂ (Merck), Benzenesulfonic acid,4,4'-[3-(2-pyridinyl)-1,2,4-triazine-5,6-diyl]bis-sodium salt (Ferrozin) (Sigma-aldrich), HCl (Merck), 2,4,6-Tris-2-Pyridyl-1,3,5-Triazine (TPTZ) (Sigma-aldrich), FeCl₃ (Merck), CH₃COOH (Merck), CH₃COONa (Merck), Na₂CO₃, CuSO₄ (Merck), NaKC₄H₄O₆ (Merck), NaOH (Merck), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck), NaH₂PO₄ (Sigma-aldrich), Na₂HPO₄ (Riedel-de Haen), H₂O₂ (Merck), Catalase from bovine liver(Sigma-aldrich), nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) (Sigma-aldrich), nitrotetrazolium blue chloride (NBT) (Sigma-aldrich), N-Methyl phenazonium methyl sülfate (PMS) (Sigma-aldrich), dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck), Trolox (Calbiochem), Quercetin (Calbiochem) kimyasal maddeleri kullanılmıştır.

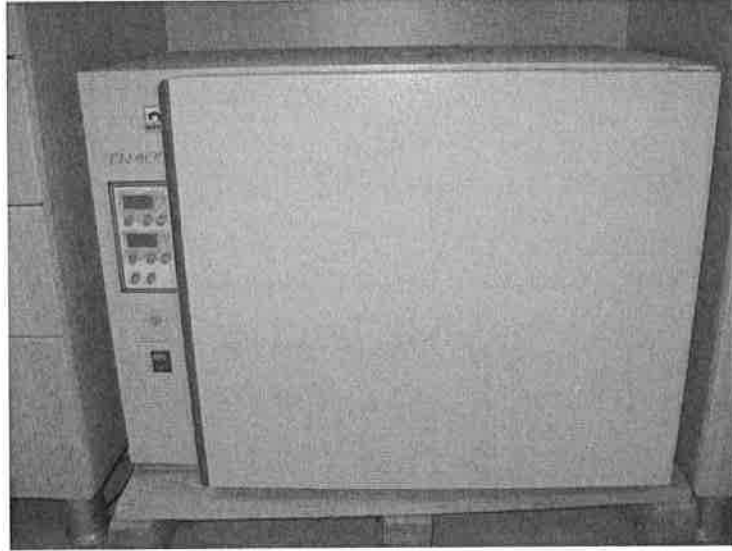
5.2. Kullanılan Cihazlar

Otoklav : Nüve Steam Art OT18B



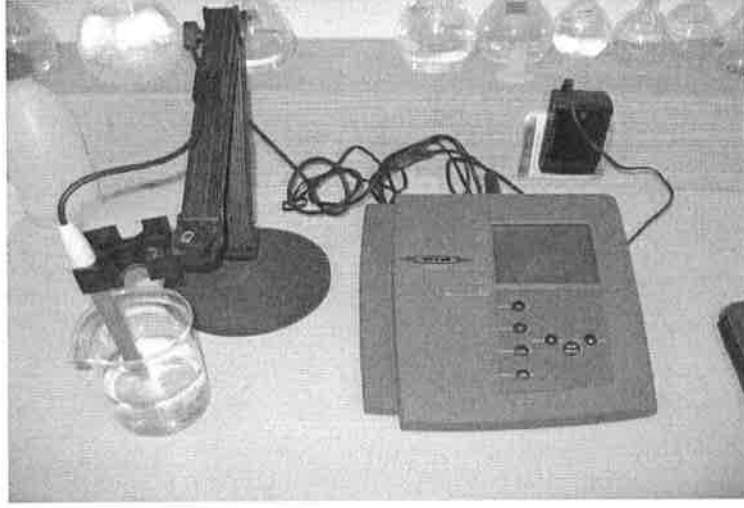
Şekil 5. 1. Otoklav

Etüv : Nüve EN 400



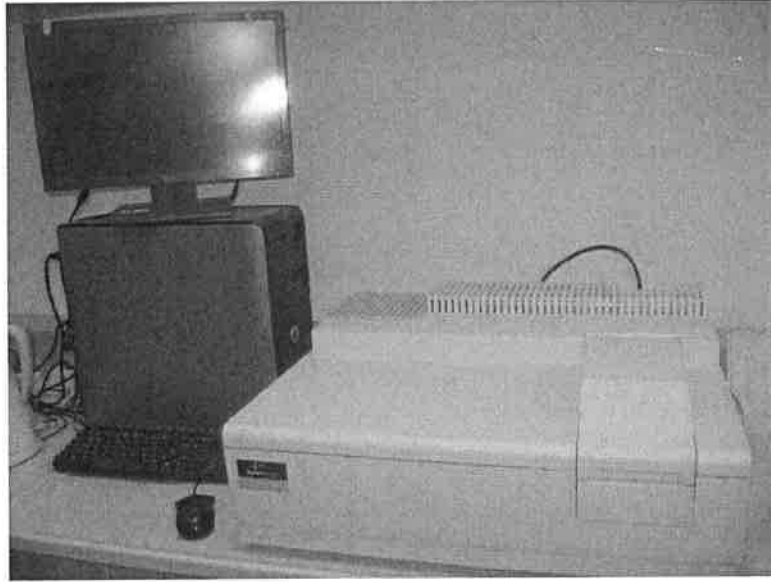
Şekil 5. 2. Etüv

pH metre : InoLab WTW-Series



Şekil 5. 3. pH metre

UV/VIS Spektroskopisi : PerkinElmer Lambda 25



Şekil 5. 4. UV/VIS Spektroskopisi

McFarland Cihazı : Biosan DEN-1



Şekil 5. 5. McFarland Cihazı

Karıştırıcı	: Velp Scientifica F20220176
Ultrasonic Cleaner	: Project Ultrasonic Cleaner P-1
Dondurucu	: Sanyo Biomedical Freezer
Mikropipet	: Eppendorf
Buzdolabı	: Uğur
Ependorf Tüpler	
Mikroplakalar	

5.3. Kullanılan Çözeltiler Ve Hazırlanması

5.3.1. Antimikrobiyal Çalışmalar İçin Hazırlanacak Kimyasallar

5.3.1.a. Bakteriler İçin Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- 1) MHB çözeltisi: 10,5 g MHB' den alınmıştır ve 500 mL destile suda çözülmüştür. Daha sonra 120 °C' de otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.3.1.b. Mayalar İçin Antimikrobiyal Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

1) RPMI çözeltisi: 0,52 g RPMI ve 1,725 g MOPS tartılmıştır. 45 mL destile suda çözünmüştür. Daha sonra pH=7,0 olacak şekilde 1 M'lık NaOH ile pH'ı ayarlanmıştır. Daha sonra toplam çözelti 50 mL olacak şekilde eksik kalan kısım tekrar destile su ile tamamlanmıştır. 0,20 µm çapında süzgeçten geçirilerek sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.3.2. Antioksidan Çalışmalar İçin Hazırlanacak Kimyasallar

5.3.2.a. DPPH Kullanarak 'Toplam Antioksidan Potansiyel' Ölçüm İçin Kullanılan Kimyasallar

1) 2×10^{-4} M'lık DPPH çözeltisi: İlk başta 2×10^{-3} M'lık DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 0,0394 g DPPH tartılmıştır ve 50 mL'ye etanol ile seyreltilmiştir. Daha sonra bu hazırladığımız 2×10^{-3} M'lık DPPH çözeltisinden 10 mL alınmıştır ve 100 mL'ye etanol ile seyreltilerek 2×10^{-4} M'lık DPPH çözeltisi hazırlanmıştır.

5.3.2.b. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi İçin Kullanılan Kimyasallar

- 1) 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisi: 0,4262 g CuCl_2 tartılmıştır ve 250 mL destile suda çözünmüştür.
- 2) 1,0 M'lık pH=7,0 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması: 19,27 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tartıldı ve 250 mL destile suda çözüldü. pH metre ile pH'ı kontrol edilmiştir.
- 3) $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık Neocuproine (Nc) çözeltisi: 0,039 g Neocuproine tartılmıştır ve 25 mL etanolde çözünmüştür.

5.3.2.c. ABTS Radikali Süpürücü Kapasitesi Ölçüm Yöntemi İçin Kullanılan Kimyasallar

1) ABTS⁺ çözeltisi: 0,1920 g ABTS ve 0,0331 g K₂S₂O₈ tartılmıştır ve toplam 50 mL olacak şekilde destile suda çözülmüştür. Bu çözelti hazırlandıktan sonra kullanımı için 12-16 saat karanlıkta ve oda koşullarında bekletilmiştir.

5.3.2.d. Metal-Şelat Aktivitesi (FERROZİN) Tayini İçin Kullanılan Kimyasallar

- 1) 5 mM' lık Ferrozin çözeltisi: 0,2462 g tartılmıştır ve 100 mL destile suda çözülmüştür.
- 2) 2mM' lık FeCl₂ çözeltisi: 0,1037 g FeCl₂.4H₂O tartılmıştır ve 100 mL destile suda çözülmüştür.

5.3.2.e. Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü

- 1) (A) 10⁻² M TPTZ çözeltisi: 0,1570 g tartıldı ve 50 mL etanolün içinde çözülmüştür.
- 2) (B) 2x10⁻²M FeCl₃ çözeltisi: 0,1622 g FeCl₃ tartıldı ve 1 mL 1M' lık HCl çözeltisinde çözünüp 50 mL' ye destile su ile tamamlanmıştır.
- 3) (C) pH=3,6 0,3 M CH₃COOH/CH₃COONa tampon çözeltisi: 3,1 g CH₃COONa.3H₂O tartılmıştır ve üstüne 16 mL CH₃COOH eklenmiştir. Daha sonra bunlar 1L' ye destile su ile tamamlanmıştır.
- 4) TPTZ reaktif çözeltisi: (A:B:C) = 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

5.3.2.f. Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Ölçümü

- 1) Lowry A: 2 g Na₂CO₃ tartılmıştır ve 100 mL 0,1 M' lık NaOH çözeltisi içinde çözülmüştür.
- 2) Lowry B: 1,2485 g CuSO₄ tartılmıştır ve 100 mL %1' lik NaKC₄H₄O₆ içerisinde çözülmüştür.
- 3) Lowry C: 50 mL Lowry A çözeltisi ile 1 mL Lowry B çözeltisi karıştırılmıştır.
- 4) Folin ciocalteu reaktif çözeltisi: Folin ciocalteu reaktifi su ile 1:3 oranında seyreltilmiştir.

5.3.2.g. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Ölçümü

- 1) 468 μM 'lık NADH çözeltisi: 0,035 g NADH tartılmıştır ve 100 mL destile suda çözünmüştür.
- 2) 300 μM 'lık NBT çözeltisi: 0,025 g NBT tartılmıştır ve 100 mL destile suda çözünmüştür.
- 3) 60 μM 'lık PMS çözeltisi: 0,0918 g tartılmıştır ve 50 mL destile suda çözünmüştür. Daha sonra bu hazırladığımız çözeltiden 1 mL alınmıştır ve 100 mL'ye seyreltilmiştir.

5.3.2.h. Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesi Ölçümü

- 1) pH=7,4, 0,2 M'lık fosfat tamponu çözeltisi: 0,2M'lık NaH_2PO_4 çözeltisinden 39 mL 0,2 M'lık Na_2HPO_4 çözeltisinden 61 mL alınmıştır, karıştırılmıştır ve destile su ile 1L'ye tamamlanmıştır.
- 2) 10^{-3} M H_2O_2 çözeltisi: 21,2 μL alınmıştır ve 200 mL'ye destile su ile seyreltilmiştir.
- 3) 10^{-4} M CuCl_2 çözeltisi: İlk olarak 10^{-3} M'lık CuCl_2 çözeltisi hazırlanmıştır. Bunu hazırlamak içinde 0,0340 g CuCl_2 tartılmıştır ve 200 mL destile suda çözünmüştür. Daha sonra hazırladığımız 10^{-3} M'lık CuCl_2 çözeltisinden 20 mL alınmıştır ve 200 mL'ye destile su ile seyreltilerek 10^{-4} M CuCl_2 çözeltisi hazırlanmıştır.
- 4) Katalaz enzim çözeltisi: 1 mL catalase from bovine liver çözeltisinden alınmıştır ve 500 mL'ye destile su ile seyreltilmiştir.
- 5) 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisi: 0,4262 g CuCl_2 tartılmıştır ve 250 mL destile suda çözünmüştür.
- 6) 1,0 M'lık pH=7,0 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tamponunun hazırlanması: 19,27 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tartılmıştır ve 250 mL destile suda çözünmüştür. pH metre ile pH'ı kontrol edilmiştir.
- 7) $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık Neocuproine (Nc) çözeltisi: 0,039 g Neocuproine tartılmıştır ve 25 mL etanolde çözünmüştür.

5.4. Bitkilerin Toplanması

Çalışmada kullanılan bitkilerden *Globularia trichosantha* ve *Globularia orientalis* Nevşehir Üniversitesi Kampüsü karşısındaki araziden, *Thymus sipyleus* (kekik) bitkisi ise Nevşehir Paşabağı Vadi' sinden Haziran-Temmuz 2011 döneminde toplanmıştır. Bu

bitkiler daha sonra gölgede kurutulmuştur. Çalışmamızda ise *Globularia trichosantha* ve *Globularia orientalis* bitkisinin yaprak, çiçek ve gövde kısımları, *Thymus sipyleus* (kekik) bitkisinin ise gövde ve yaprak kısımları kullanılmıştır. (Bitkilerin resimleri Yrd. Doç. Dr. Gencay AKGÜL' den temin edilmiştir.)

5.5. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Serin ortamda kurutulan bitkilerin yaprak, gövde ve çiçek kısımları birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra ayrılan kısımları, soksilet cihazı kullanılarak etil alkolde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar -39°C dondurucuda saklanılmıştır.

5.6. Bitki Çözeltilerinin ve Standardın Hazırlanışı

Bitki ekstraktları antimikrobiyal çalışmada kullanılmak üzere 4096 µg/mL 'ye etil alkol ile seyreltilmiştir. Antioksidan çalışmamızda kullanılmak üzere ise bitki ekstraktlarımız etil alkolde çözülmüştür ve bulanıklığı önlemek için mikrosüzgeçlerden geçirilmiştir. Deneyimizde karışmaması için isimlerinde kısaltma kullanılmıştır. *Thymus sipyleus* gövde (TSg), *Thymus sipyleus* yaprak (TSy), *Globularia orientalis* bütün (GOk), *Globularia trichosantha* gövde (GTg), *Globularia trichosantha* tohum (GTt), *Globularia trichosantha* yaprak (GTy), *Globularia orientalis* tohum (GOt), *Globularia orientalis* gövde (GOg), *Globularia orientalis* yaprak (GOy) olarak kısaltmalar yapılmıştır. Standart olarak 10^{-3} M' lık Trolox etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

5.7. Mikroorganizmalar

Deneysel çalışmamızda, *Candida albicans* (KUEN 1475), *Escheria coli* (W 3110), *Staphylococcus aureus* (ATTC 46300), *Salmonella typhi* (CCM 5445), *Metisiline dirençli Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Bacillus cereus* (ATCC 7064), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114) olmak üzere bir mantar ile sekiz çeşit bakteri kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar çalışma yapılmadan bir gün önce kanlı agar besi yerine öze ucu yardımı ile çizgiler çekilerek ekim yapılmıştır. Bunun içinde öze ucu ilk

başta ateşe tutularak steril edilmiştir. Daha sonra kanlı besi yerine ve daha sonra öze ucu ependof tüplerindeki bakteri suşlarına batırılmıştır. Bu bakterili öze ucu kullanılarak kanlı agar besi yerine çizgiler çekilmiştir. Bu işlem tamamlandıktan sonra 37°C' deki etüve bir gün bekletilmeye bırakılmıştır.

5.8. Deneysel Çalışmalar

5.8.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

5.8.1.a. Bakteriler için

Antimikrobiyal aktivitenin belirleneceği bitki ekstraktları (4096 µg/mL) ve standart antibiyotik (64 µg/mL) çözeltileri deneyde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 8x12 kuyucuklu mikrolakaların her birine 100 µL miktarında MHB besiyeri konulmuştur. Birinci kuyucuktan itibaren 4096 µg/mL'den başlayarak seri bir şekilde 8 µg/mL'ye kadar sekiz kanallı mikropipet yardımıyla seyreltilmiştir. Diğer bir aşamada ise kanlı agarda 12 saat bekletilmiş bakteriler steril destile su içinde çözülerek bulanıklığı yardımıyla okunulan yoğunluk 0,5 McFarlanda ayarlanmıştır. Karıştırılmış ve 1/100 oranında seyreltilerek 1. sıradaki kuyucuklardan 11. sıradaki kuyucuklara kadar (1 ve 11 kuyucukları dahil) 100µL konulmuştur. Bu işlem tamamlandıktan sonra 36°C'de ki inkübatöre konulmuştur ve 1 gün beklendikten sonra okuma yapılmıştır.

5.8.1.b. Mayalar İçin

Antimikrobiyal aktivitenin belirleneceği bitki ekstraktları (4096 µg/mL) ve standart antibiyotik çözeltileri deneyde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 8x12 kuyucuklu mikrolakaların her birine 50 µL miktarında RPMI besiyeri konulmuştur. Hazırlanan bitki ekstark çözeltileri ¼ oranında RPMI besi yeri ile seyreltilmiştir. Birinci kuyucuktan itibaren 2048 µg/mL'den başlayarak seri bir şekilde 4 µg/mL'ye kadar sekiz kanallı mikropipet yardımıyla seyreltilmiştir.

Diğer bir aşamada ise kanlı agarda 12 saat bekletilmiş bakteriler steril destile su içinde çözülerek bulanıklığı yardımıyla okunulan yoğunluk 0,5 McFarlanda ayarlanmıştır.

Karıştırılmıştır ve 1/1000 oranında seyreltilerek 1. sıradaki kuyucuklardan 11. sıradaki kuyucuklara kadar (1 ve 11 kuyucukları dahil) 50µL konulmuştur.. Bu işlem tamamlandıktan sonra 36°C’de ki inkübatöre konulmuştur ve 2 gün beklendikten sonra okuma yapılmıştır.

5.8.2. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

5.8.2.a. CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Dört tüpe ilk olarak 1 mL 0,01 M’lık CuCl₂ çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra bu tüplerin üstlerine 7,5x10⁻³ M’lık Nc çözeltisinden 1 mL ve 1M’lık 1mL (pH=7,0) amonyum asetat tamponundan eklenilmiştir. Bir tanesi referans olmak üzere referansın üstüne toplam hacim 4,1 mL olacak şekilde destile su eklenilmiştir. Diğer üç tüpe ise x mL örnek numunelerimizden eklenilmiştir. Toplam hacim ise 4,1 mL (4,1- x mL) olacak şekilde destile su ile tamamlanmıştır. Yarım saat beklendikten sonra 450 nm’de referansa karşı absorbans okuması yapılmıştır. Bu işlemler her bitki örnekleri için ayrı ayrı yapılmıştır ve standart için ise 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL miktarlarında alınarak aynı işlemler tekrarlanılmıştır. Ve referansa karşı 450 nm’de absorbansları okunmuştur. Standartın ise molar absorptivitesi hesaplanmıştır.

Aşağıdaki formül ile CUPRAC yöntemi ile Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite ölçümü yapılmıştır.

$$Troloks\ eşitliği = \frac{A}{\epsilon_{TR}} \times \frac{4,1}{Vörn} \times \frac{Veks}{m(g)} \times \text{seyrelme faktörü}$$

A = Numune absorbansları (3 numunenin absorbanslarının ortalaması)

ϵ_{TR} = Cuprac için Troloks’ un molar absorptivitesi (17000)

Vörn = Örnekten aldığımız hacim

Veks = Bitki ekstraksiyon çözeltisinin toplam hacmi

m (g) = Bitki ekstraksiyon çözeltisindeki ekstraktın kütlesi

5.8.2.b. DPPH Kullanarak ‘Toplam Antioksidan Potansiyel’ Ölçümü

Dört tüpe ilk olarak 1 mL DPPH çözeltisi eklenilmiştir. Daha sonra referansa 4 mL etil alkol eklenilmiştir. Diğer üç deney tüplerine ise x mL örnek çözelti eklenilmiştir ve bu üç deney tüpünün üstüne 4,0-x mL etil alkol eklenerek toplam hacim 5 mL’ ye tamamlanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra 30 dk beklenilmiştir ve etil alkole karşı 515 nm’ de absorbans okuması yapılmıştır. Bu işlem diğer örnekler içinde gerçekleştirilmiştir.

Aşağıdaki formül ile de DPPH kullanarak ‘toplam antioksidan potansiyel’ ölçümü % inhibisyon şeklinde bulunmuştur.

$$\%inhibisyon = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 = Referansın absorbansı

A_1 = Örnek numunenin absorbansı (bunun için 3 numunenin absorbanslarının ortalaması alınmıştır.)

5.8.2.c. ABTS Radikali Süpürücü Kapasitesi Ölçümü

Dört tüpe ilk olarak 1 mL ABTS⁺⁺ çözeltisi eklenilmiştir. İlk tüp referans olarak kullanılmıştır ve referansa 4 mL, diğer üç tüpe ise 4,0-x mL etil alkol eklenilerek bu diğer üç deney tüpüne x ml daha bitki örneklerimizden koyulmuştur. Toplam hacim 5 mL’ ye tamamlanmıştır. 6 dk sonunda ise etil alkole karşı 734 nm’ de absorbans okuması yapılmıştır. Bu işlemler diğer bitki örneklerimiz ve standart içinde gerçekleştirilmiştir. Standart için ise 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL konsantrasyonlarında alınarak aynı işlemler tekrarlanılmıştır. Standartın ise molar absorptivitesi hesaplanmıştır.

Aşağıdaki formül ile ABTS radikali ile süpürücü kapasitesi ölçümü yapılmıştır.

$$\text{Troloks eşitliği} = \frac{A}{\epsilon_{TR}} \times \frac{5,0}{V_{\text{örn}}} \times \frac{V_{\text{eks}}}{m(g)} \times \text{seyrelme faktörü}$$

A = Numune absorbansları (3 numunenin absorbanslarının ortalaması)

ϵ_{TR} = ABTS için Troloks' un molar absorptivitesi (26000)

Vörn = Örnekten aldığımız hacim

Veks = Bitki ekstraksiyon çözeltisinin toplam hacmi

m (g) = Bitki ekstraksiyon çözeltisindeki ekstraktın kütlesi

5.8.2.d. Metal-Şelat Aktivitesi (FERROZİN) Ölçümü

Dört tüpe ilk olarak x mL 2 mM FeCl₂, bunun üstüne de 0,2 mL Ferrozin eklenilmiştir. İlk tüp referans olarak kullanılmıştır ve referansa 4,7 mL etil alkol eklenilmiştir. Diğer üç tüpe ise x mL örnek ve bunun üstüne de 4,7-x mL etil alkol eklenilerek 10 dk sonunda etil alkole karşı 562 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır. Bu işlem diğer bitki örnekleri içinde gerçekleştirilmiştir.

5.8.2.e. Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan (FRAP) Ölçümü

Dört tüpe 3 mL FRAP çözeltisi eklenilmiştir. İlk tüp referans olarak kullanıldı ve referansın üstüne 0,4 mL destile su eklenilmiştir. Diğer üç tüpe ise 0,4-x mL destile su eklenmiştir ve üstüne x mL bitki örneğinden konulmuştur. 6 dk sonunda referansa karşı 595 nm' de absorbans ölçülmüştür. Aynı işlem diğer bitki numuneleri içinde gerçekleştirilmiştir. Standart için ise 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL konsantrasyonlarında alınarak aynı işlemler tekrarlanılmıştır. Standartın ise molar absorptivitesi hesaplanmıştır.

Aşağıdaki formül ile ferrik iyonu indirgeme antioksidan (FRAP) ölçümü yapılmıştır.

$$\text{Troloks eşitliği} = \frac{A}{\epsilon_{TR}} \times \frac{3,4}{V_{\text{örn}}} \times \frac{V_{\text{eks}}}{m(g)} \times \text{seyrelme faktörü}$$

A = Numune absorbansları (3 numunenin absorbanslarının ortalaması)

ϵ_{TR} = FRAP için Troloks' un molar absorptivitesi (46300)

Vörn = Örnekten aldığımız hacim

Veks = Bitki ekstraksiyon çözeltisinin toplam hacmi

m (g) = Bitki ekstraksiyon çözeltisindeki ekstraktın kütlesi

5.8.2.f. Folin- Ciocalteu Reaktifi (FCR) İle Toplam Fenolik Madde Ölçümü

Dört tüpün ilki referans olarak kullanılmıştır. Referansa 1 mL destile su konulmuştur ve üstüne 2,5 mL Lowry C çözeltisi eklenerek 10 dk beklenilmiştir. Bu beklemin sonunda bu referans tüpüne 0,25 mL Folin Ciocalteu reaktif çözeltisinden eklenilmiştir. Diğer üç tüpe ilk başta x mL örnek konulmuştur ve bunun üstüne 1,0-x mL destile su eklenilmiştir. Daha sonra 2,5 mL Lowry C çözeltisi eklenerek 10 dk beklenilmiştir. Bu beklemin sonunda bu üç tüpe 0,25 mL Folin Ciocalteu reaktif çözeltisinden eklenilmiştir ve 30 dk beklenildikten sonra referansa karşı 750 nm' de absorbans ölçümü yapılmıştır. Aynı işlem diğer bitki numuneleri içinde gerçekleştirilmiştir. Standart için ise 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL konsantrasyonlarında alınarak aynı işlemler tekrarlanılmıştır. Standartın ise molar absorptivitesi hesaplanmıştır.

Aşağıdaki formül ile toplam fenolik madde ölçümü yapılmıştır.

$$\text{Troloks eşitliği} = \frac{A}{\epsilon_{TR}} \times \frac{3,75}{Vörn} \times \frac{Veks}{m(g)} \times \text{seyrelme faktörü}$$

A = Numune absorbansları (3 numunenin absorbanslarının ortalaması)

ϵ_{TR} = FRAP için Troloks' un molar absorptivitesi (46300)

Vörn = Örnekten aldığımız hacim

Veks = Bitki ekstraksiyon çözeltisinin toplam hacmi

m (g) = Bitki ekstraksiyon çözeltisindeki ekstraktın kütlesi

5.8.2.g. Süperoksit Radikali Giderme Aktivitesi Ölçümü

Dört tüpün ilki referans olarak kullanılmıştır. Referansa 2,5 mL DMSO eklenilmiştir. Üstüne 468 μM 'lık 2 mL NADH, 300 μM 'lık 1 mL NBT, 60 μM 'lık 1 mL PMS konulmuştur. Diğer üç tüpe ise 2,5-x mL DMSO, x mL bitki örneği, 468 μM 'lık 2 mL NADH, 300 μM 'lık 1 mL NBT, 60 μM 'lık 1 mL PMS konulmuştur ve 5 dk beklenildikten sonra 560 nm' de DMSO'ya karşı absorban ölçülmüştür. Aynı işlem diğer bitki numuneleri içinde gerçekleştirilmiştir.

Aşağıdaki formül ile süperoksit radikali giderme aktivitesi % inhibisyon şeklinde bulunmuştur.

$$\%inhibisyon = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 = Referansın absorbası

A_1 = Örnek numunenin absorbası (bunun için 3 numunenin absorbanlarının ortalaması alınmıştır.)

5.8.2.h. Hidrojen Peroksit Süpürme Aktivitesinin Ölçümü

Bu deneyimizde modifiye CUPRAC yöntemi kullanılmıştır. Deneyimizde yedi ayrı tüp alınmıştır. Bu tüplerden ilki referans olarak kullanılmıştır. Referansa 0,2 M'lık pH=7,4 fosfat tamponundan 0,7 mL, 0,4 mL 10^{-3} M H_2O_2 çözeltisinden ve 0,4 mL 10^{-4} M CuCl_2 çözeltisinden eklenilmiştir. Diğer altı tüpe ise 0,2 M'lık pH=7,4 fosfat tamponundan 0,7-x mL, 0,4 mL 10^{-3} M H_2O_2 çözeltisinden, 0,4 mL 10^{-4} M CuCl_2 çözeltisinden ve x mL ise bitki örneklerinden konulmuştur. Daha sonra bunlar 30 dk 37°C su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun sonunda üç deney tüpüne 0,4 mL katalaz çözeltisi diğer üç tüpe ise 0,4 mL destile su eklenilmiştir. Bu deneyimizin ikinci aşamasında ise sekiz ayrı tüp alınmıştır. Birinci tüp referans olarak kullanılmıştır. Bu tüpe ilk olarak 1 mL 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisi eklenilmiştir. Daha sonra bu tüplerin üstlerine $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık Nc çözeltisinden 1 mL ve 1M'lık (pH=7,0) amonyum asetat tamponundan 2 mL eklenilmiştir. Daha sonra diğer yedi tüpe ise 0,01 M'lık CuCl_2 çözeltisinden 1 mL,

$7,5 \times 10^{-3}$ M'lık Nc çözeltisinden 1 mL ve 1M'lık (pH=7,0) amonyum asetat tamponundan 2 mL eklenilmiştir. Bu yedi tüpün üstüne 30 dk bekletilmiş, üstüne katalaz ve destile su koyduğumuz çözeltilerden 1 mL alınarak eklenilmiştir ve bunlar 30 dk bekletildikten sonra 450 nm' de referansa karşı absorbans ölçümü yapılmıştır.

Aşağıdaki formül ile hidrojen peroksit süpürme aktivitesi % inhibisyon şeklinde bulunmuştur.

$$\%Süpürme (HPS) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$$

A_0 = Referansın absorbansı

A_1 = Su eklediğimiz numunenin absorbansı (3 numunenin absorbansının ortalaması)

A_2 = Katalaz enzimi eklediğimiz numunenin absorbansı (3 numunenin absorbansının ortalaması)

6.BÖLÜM

BULGULAR VE TARTIŞMA

6.1. Antimikrobiyal Aktivite

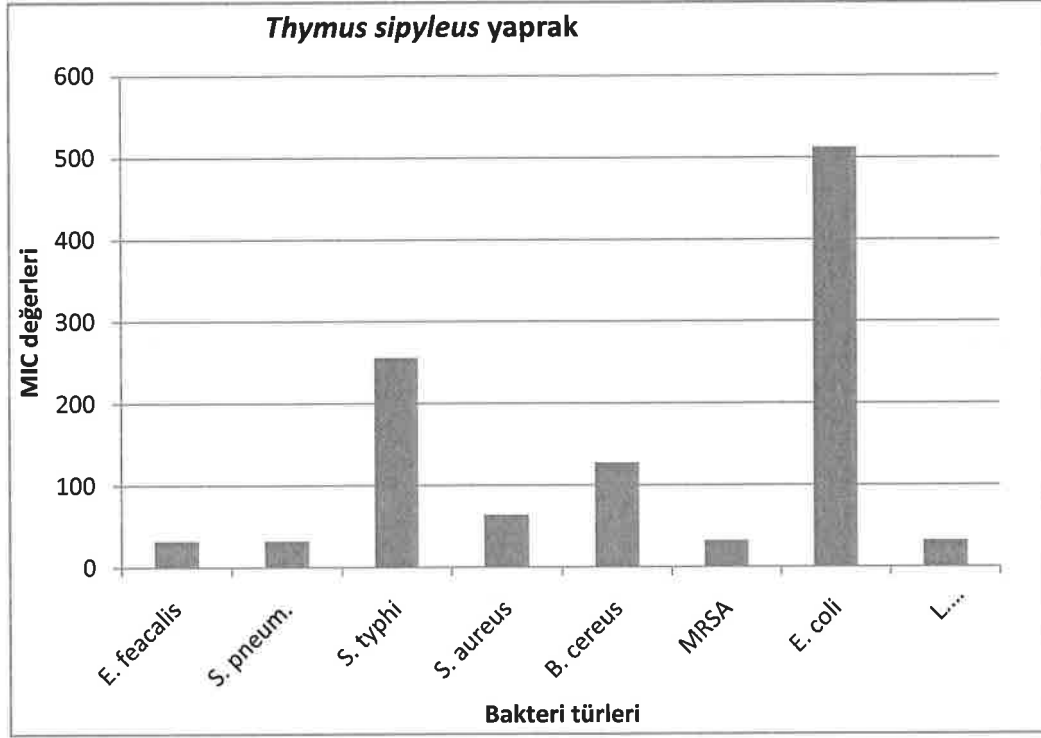
Thymus sipyleus bitkisinin gövde ve yaprak; *Globularia orientalis* bitkisinin gövde, yaprak, tohum ve bütün kısımlarının karışımı; *Globularia trichosantha* bitkisinin gövde, yaprak ve tohum kısımları deneyde kullanılmıştır. *Globularia orientalis*, *Globularia trichosantha* ve *Thymus sipyleus* bitkilerinin gram (+), gram (-) bakteriler ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar tablo 3'de görülmektedir. *Thymus sipyleus* (kekik), antimikrobiyal aktivitesi en iyi olan bitki türüdür. *Globularia orientalis* türündeki bitkilerin ise gram (-) bakterilere ve bazı gram (+) bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivite değerleri birbirine yakındır. Tablo 6.1.'de görüldüğü gibi maya türü olan *Candida albicans*' ın MIC >2048 µg/mL olarak *Globularia orientalis*, *Globularia trichosantha* ve *Thymus sipyleus* bitkilerine duyarlı değildir.

Tablo 6.1. Antimikrobiyal çalışma sonuçları

	<i>E. feacalis</i>	<i>S. pneum.</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>MRSA</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monotyge.</i>	<i>C. albicans</i>
GOy	256	128	256	512	256	128	256	64	>2048
GOt	256	64	256	256	256	128	256	128	>2048
GOg	128	64	256	256	256	128	256	64	>2048
GOk	256	16	256	256	256	128	256	128	>2048
GTt	64	64	256	128	256	32	256	64	>2048
GTg	32	16	256	128	128	64	256	64	>2048
GTy	256	16	256	256	256	256	256	256	>2048
TSy	32	32	256	64	128	32	512	32	>2048
TSg	32	64	512	32	64	32	512	32	>2048
Etanol	2048	2048	2048	2048	1024	2048	2048	512	>2048
vank.	1	0,125	-	1	1	1	-	0,5	-
cipr.	-	-	0,125	-	-	-	-	-	-
AmpB	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5

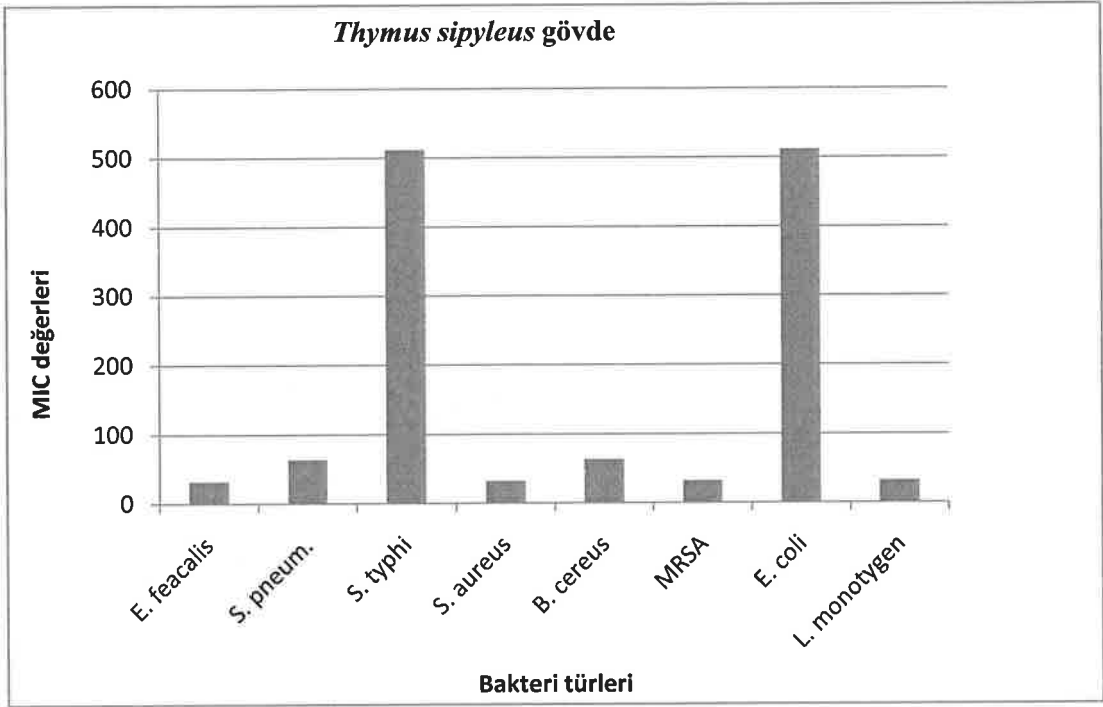
Amp-B: Amphotericin B, **B. cereus:** *Bacillus cereus*, **C. albicans:** *Candida albicans*, **Cipr:** Ciprofloxacin, **E. coli:** *Escheria coli*, **E. feacalis:** *Enterococcus feacalis*, **GOt:** *Globularia orientalis* tohum, **GOg:** *Globularia orientalis* gövde, **GOy:** *Globularia orientalis* yaprak, **GOk:** *Globularia orientalis* bütün, **GTg:** *Globularia trichosantha* gövde, **GTt:** *Globularia trichosantha* tohum, **GTy:** *Globularia trichosantha* yaprak, **L. monotyge:** *Listeria monocytogenes*, **MRSA:** Metisiline dirençli *Staphlococcus aureus*, **S. aureus:** *Staphlococcus aureus*, **S. typhi:** *Salmonella typhi*, **S. pnemoniae:** *Streptococcus pnemoniae*, **TSg:** *Thymus sipyleus* gövde, **TSy:** *Thymus sipyleus* yaprak, **Vank:** Vankomisin

TSy bitkisi; *E. feacalis*, *S. pnemoniae*, *L. monotygenes* ve *MRSA*' da aynı sayısal değerleri (MIC: 32 µg/mL) vermiştir. Bu durum çalışmamızda ki en iyi sonuçlardan bazılarıdır. *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi*, *E. coli* gibi gram (+) bakterilerin MIC değerleri sırasıyla 64, 128, 256 ve 512 µg/mL' dir.



Şekil 6. 1. *Thymus sipyleus* bitkisinin yaprak kısmının MIC değerleri grafiği

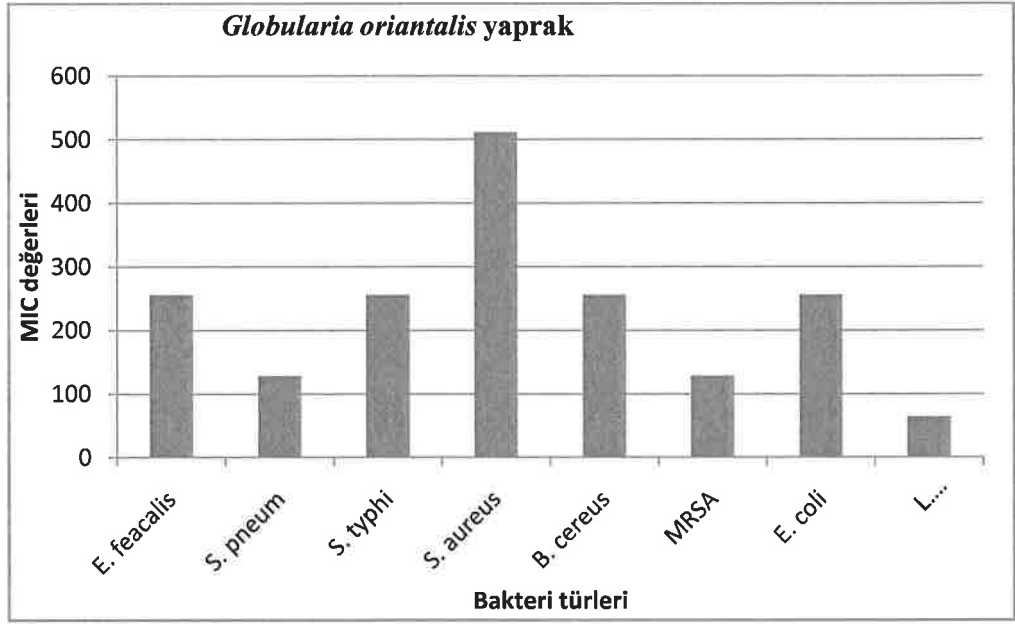
TSg bitkisi *L. monotygenes*, *E. feacalis*, *S. aureus* ve *MRSA* MIC değerleri 32 $\mu\text{g/mL}$ olarak en iyi aktiviteyi göstermiştir. *S. pneumoniae* ve *B. cereus*' da 64 $\mu\text{g/mL}$ MIC değer göstererek bunların antimikrobiyal etkileri *L. monotygenes*, *E. feacalis*, *S. aureus* ve *MRSA* ile karşılaştırıldığı zaman ise bu bakterilerden az da olsa düşük olduğu gözlemlenmiştir. Gram (-) bakteri olan *S. typhi* TSg bitkisine duyarlı değildir (MIC: 256 $\mu\text{g/mL}$).



Şekil 6. 2. *Thymus sipyleus* bitkisinin gövde kısmının MIC değerleri grafiği

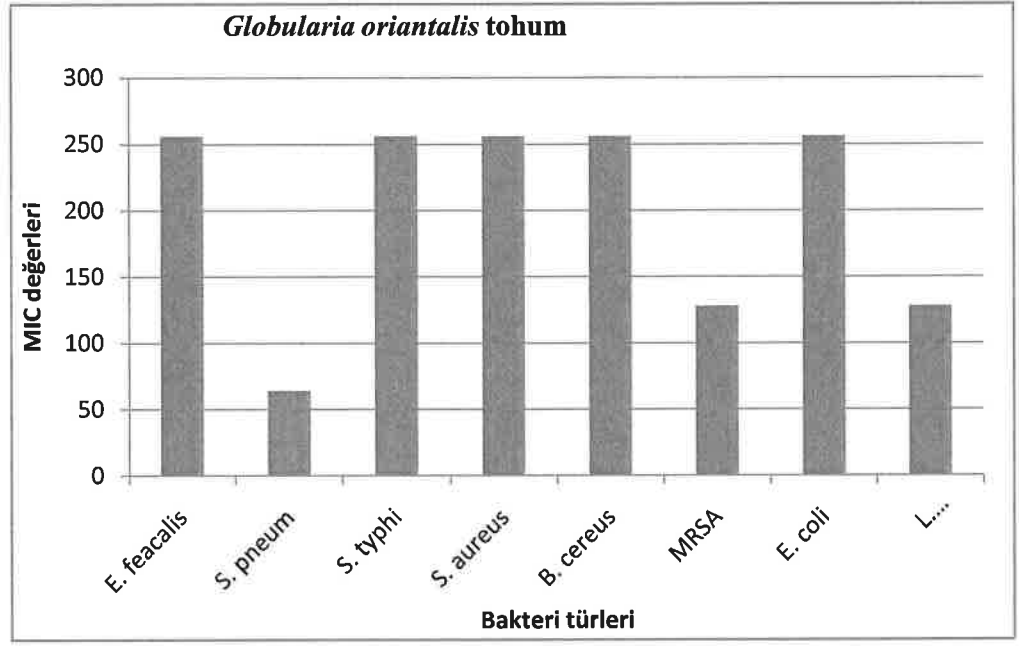
2009 da yapılan *Thymus sipyleus*' un 26 bakteri 14 mantarla yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasın da bizim deneyimizde olduğu gibi gram (+) bakterilerin gram (-) bakterilerden daha duyarlı olduğu görülmüştür [24]. Ayrıca yapılmış olan bu çalışmaya göre Erzurum-İspir bölgesinden toplanan *Thymus sipyleus* bitkisi *C. albicans* maya türüne oldukça güçlü etki gösterirken Kapadokya bölgesinden toplanan *Thymus sipyleus* bitkisi *C. albicans* maya türüne etki göstermemektedir [24]. *E. coli*, *B. cereus* ve *S. aureus* bakterilerinin Erzurum bölgesinden toplanan *Thymus sipyleus* bitkisine olan duyarlılıkları, Kapadokya bölgesinden toplanan *Thymus sipyleus* bitkisine olan duyarlılıklarından daha iyidir [24].

L. monotygenes bakterisinin GOy bitkisine duyarlılığı (MIC: 64 µg/mL) diğer bakterilerin duyarlılıklarıyla kıyaslandığı zaman oldukça iyidir. *S. pneumoniae* ve MRSA 128 µg/mL gösterirken antimikrobiyal etkisi *L. monotygenes*' e (MIC: 64 µg/mL) göre daha düşüktür. Bu bitkinin antimikrobiyal etkisini sırasıyla *E. Feacalis* (MIC: 256 µg/mL) = *S. typhi* = *B. cereus* = *E. coli* > *S. aureus* (MIC: 512 µg/mL) takip etmektedir.

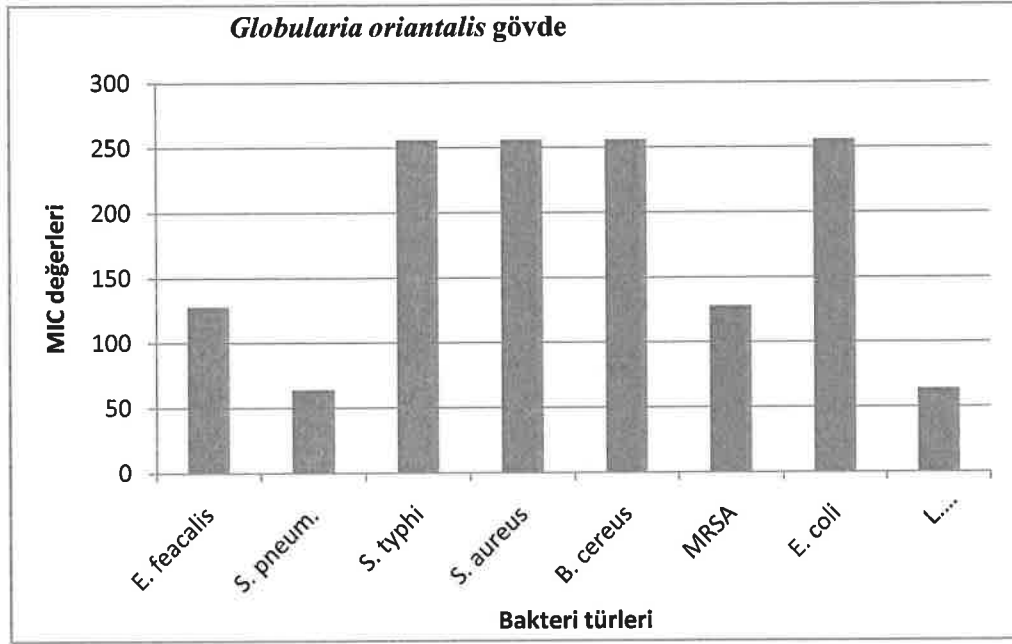


Şekil 6. 3. *Globularia orientalis* bitkisinin yaprak kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği

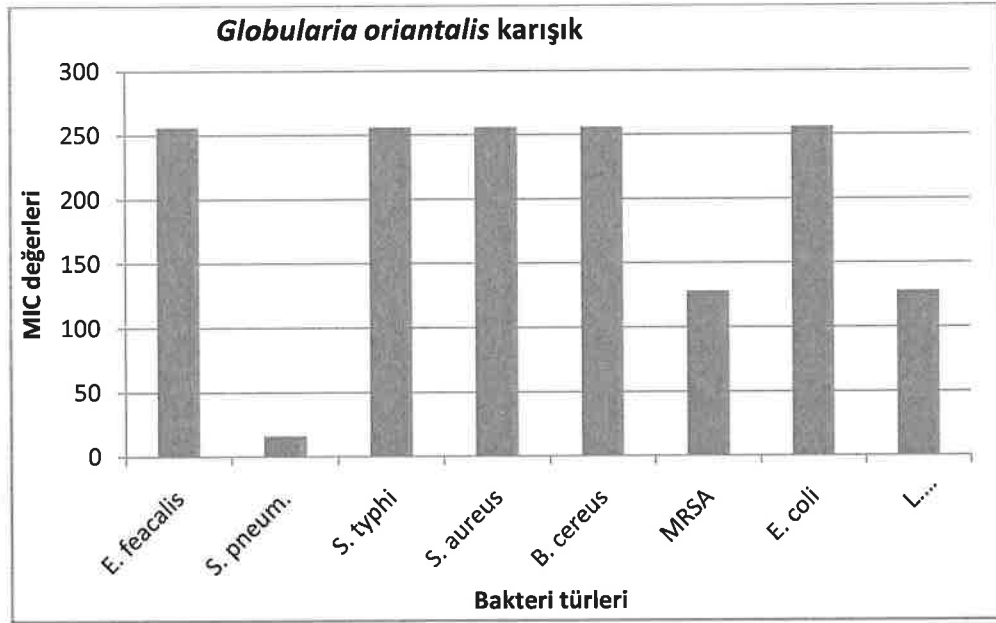
GOT, GOg ve GOk bitkilerinin *S. pneumoniae* üstündeki antimikrobiyal etkisi sırası 64 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. GOk bitkisinin 16 $\mu\text{g/mL}$ olan MIC değeri en iyi sonuçlardan biridir. GOT bitkisinin *E. feacalis*, *S. typhi*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi 256 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. *MRSA*, *L. monotygenes* bakterisine GOT bitkisine duyarlılığı 128 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bu MIC değerlerinden de görüldüğü gibi bu bitkinin antimikrobiyal etkisi (*S. pneumoniae* hariç) birbirine yakındır. GOg bitkisinin antimikrobiyal etkisi *S. pneumoniae* ile *L. monotygenes*' de (MIC: 64 $\mu\text{g/mL}$) birbirine eşittir. *S. pneumoniae* ve *L. monotygenes* bakterilerinin duyarlılıkları GOg bitkisi için oldukça iyidir. GOg bitkisinin ise antimikrobiyal etkisi *S. typhi*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*' de 256 $\mu\text{g/mL}$ ' dir. *E. feacalis*, *S. typhi*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* bakterilerinin ise GOk bitkisi üzerinde duyarlılığı *L. monotygenes*, *MRSA* ve *S. pneumoniae* üzerindeki duyarlılığından oldukça azdır.



Şekil 6. 4. *Globularia orientalis* bitkisinin tohum kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği



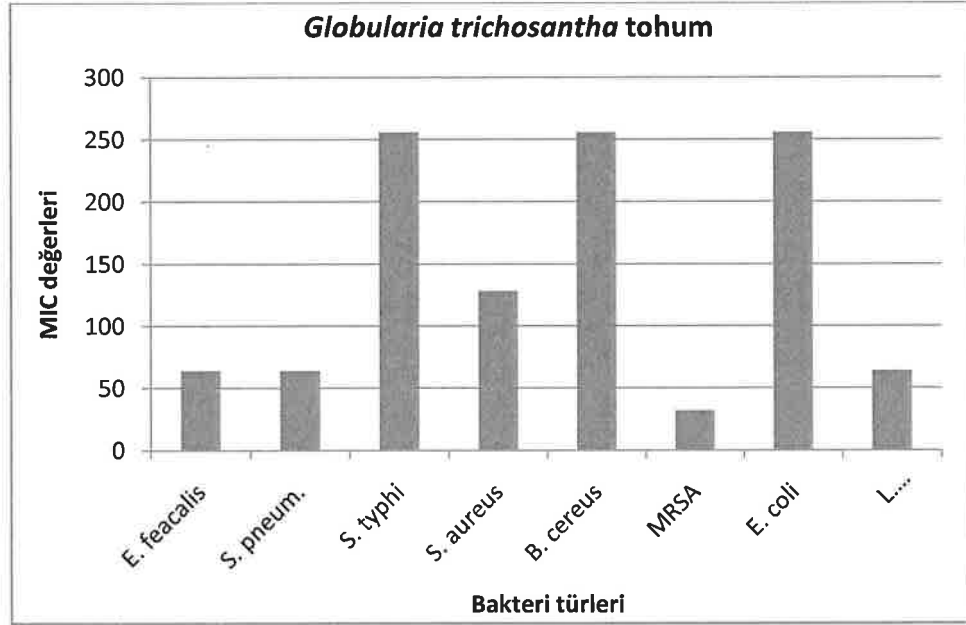
Şekil 6. 5. *Globularia orientalis* bitkisinin gövde kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği



Şekil 6. 6. *Globularia orientalis* bitkisinin karışık kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği

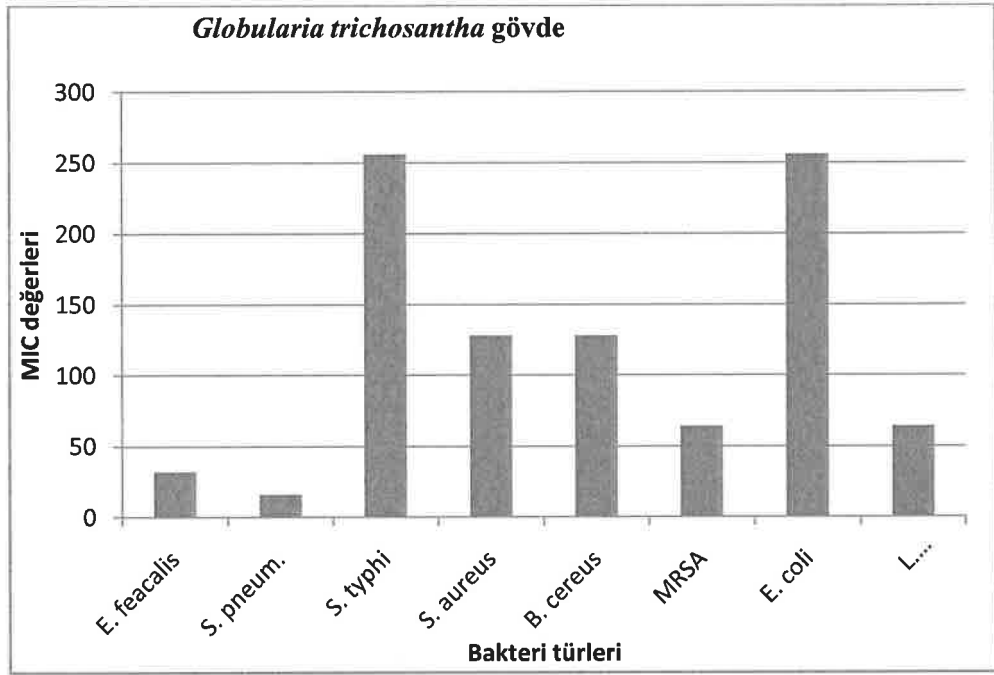
Globularia orientalis bitkileri diğer bitkiler ile kıyaslandıkları zaman antimikrobiyal aktivitelerinin çok iyi olmadığı görülmektedir. *S. pneumoniae* hariç diğer bakterileri türlerinin duyarlılıkları *Globularia orientalis* bitkisinin tohum, gövde ve bütün kısımları üzerinde çok azdır.

GTt bitkisi en iyi aktiviteyi *MRSA*' da (MIC: 32 $\mu\text{g/mL}$) göstermiştir. Bu bitki için antimikrobiyal aktivitesini kıyasladığımız zaman *MRSA* (MIC: 32 $\mu\text{g/mL}$) > *E. feacalis* (MIC: 64 $\mu\text{g/mL}$) = *S. pneumoniae* = *L. monotygenes* > *S. aureus*(MIC: 128 $\mu\text{g/mL}$) > *S. typhi*(MIC: 256 $\mu\text{g/mL}$) = *B. cereus* = *E. coli* şeklinde sıralanabilir.



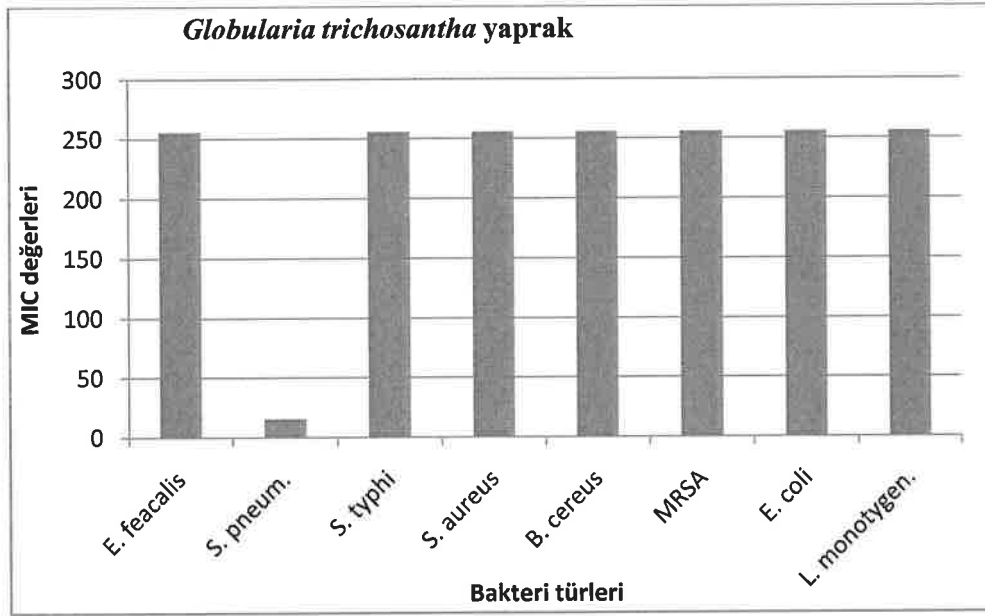
Şekil 6. 7. *Globularia trichosantha* bitkisinin tohum kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği

GTg bitkisi için antimikrobiyal aktiviteyi *S. pneumoniae*(MIC: 16 $\mu\text{g/mL}$) > *E. feacalis*(MIC: 32 $\mu\text{g/mL}$) > *MRSA*(MIC: 64 $\mu\text{g/mL}$) = *L. monotygenes* > *S. aureus*(MIC: 128 $\mu\text{g/mL}$) = *B. cereus* > *S. typhi* (MIC: 256 $\mu\text{g/mL}$) = *E. coli* şeklinde sıralanabilir.



Şekil 6. 8. *Globularia trichosantha* gövde bitkisinin bakterilere karşı MIC değerleri grafiği

GTy bitkisinde en iyi aktiviteyi GTg bitkisindeki gibi *S. pneumoniae* (MIC: 16 $\mu\text{g/mL}$) göstermektedir. Diğer bakterilerde ise MIC 256 $\mu\text{g/mL}$ ' yi göstererek bu bitki için antimikrobiyal aktivite değerleri eşittir. Yani *S. pneumoniae* bakterisi bu bitkiye duyarlı iken diğer bakteri türlerine ve mayalara duyarlı değildir.



Şekil 6. 9. *Globularia trichosantha* bitkisinin yaprak kısmının bakterilere karşı MIC değerleri grafiği

Globularia trichosantha ve *Globularia orientalis* bitkilerinin antimikrobiyal aktiviteleri hemen hemen birbirine yakındır. *Globularia trichosantha* ve *Globularia orientalis* bitkileri *Thymus sipyleus* bitkisi ile karşılaştırıldıkları zaman daha az antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları görülmektedir.

TSg ve TSY bitkileri kıyaslandığında antimikrobiyal aktiviteleri *E. feacalis*, *MRSA*, *E. coli* ve *L. monotygenes* bakterileri üzerinde aynı MIC değeri olan 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ' yi göstermektedirler. *S. pnemoniae*, *S. typhi*, *S. aureus*, *B. cereus* bakterileri farklı MIC değerleri gösterse de bu değerler birbirine oldukça yakındır. *Thymus sipyleus* bitkisinin gövde ve yaprak gibi farklı kısımlarının antimikrobiyal etkisi birbirine yakındır. *Thymus sipyleus* bitkisi karvakrol, timol, α -terpinil asetat, linalol, α -terpinol, geraniol, β -karyofenilen, γ -terpinen, p-cymene uçucu yağlarını içerdiği için ve bu uçucu yağlar antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir [25].

GOy, GOt, GOG ve GOk bitkileri kıyaslandığı zaman *S. typhi*, *B. cereus*, *MRSA*, *E. coli* bakterilere karşı sergiledikleri antimikrobiyal etkileri aynıdır. Diğer bakterilerde ise farklı MIC değerleri gözlenmiştir. Ancak bu değerler birbirinden çok uzak değildir. Sadece GOk bitkisinin *S. pneumoniae* üstündeki MIC değeri 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iken GOt, GOG bitkisinin aynı bakteri üstündeki MIC değeri 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ' tür. GO bitkisinin bütünüünün

antimikrobiyal aktivitesi tohum ve gövde ile kıyaslandığı zaman daha iyi bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

GTt, GTg ve GTy bitkilerinin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri (MIC: 256 µg/mL) eşittir ve bu gram (+) bakterinin bu bitkilere duyarlılığı oldukça azdır. En iyi sonuçlar ise *S. pneumoniae* üzerinde görülmüştür. Bu bitkilerin *S. pneumoniae* üzerindeki MIC değerleri ise GTt' de 64 µg/mL, GTg' de ve GTy' de ise 16 µg/mL olarak gözlemlenmiştir. Yani bu bitkinin yaprak ve gövde kısımları tohum kısmından daha aktiftir. Genel olarak baktığımızda ise bu bitkilerin MIC değerlerinin birbirlerine yakın olduğu sonucuna varılmıştır.

Thymus sipyleus, *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* bitkilerinin *S. typhi* (gram (-)) üzerindeki MIC değerleri (256 µg/mL) hemen hemen birbirine eşittir. Gram (-) bakteri türünün, gram (+)' ler ile kıyaslandığı zaman *Thymus sipyleus*, *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* bitkilerine duyarlılığının daha az olduğu gözlemlenmiştir.

Thymus sipyleus, *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* karşılaştırıldığında; birbirinden farklı MIC değerleri verirken, kendi içlerinde kıyaslandıkları zaman ise hemen hemen birbirine yakın MIC değerleri vermiştir. Yani bitki kısımlarının antimikrobiyal etkisi hemen hemen birbirine yakındır. Bitkiler arasındaki genel kıyaslamada *Thymus sipyleus* bitkisinin *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* bitkilerinden daha aktif olduğu görülmektedir. Kendi içlerindeki kıyaslamada ise GTg bitkisinin GTy bitkisinden, GOk bitkisinin GOy, GOt, GOg bitkilerinden, GTg bitkisinin ise GTy ve GTt bitkilerinden daha aktif olduğu tablo 6.1' de görülmektedir.

Deneyimizde kullandığımız vankomisin, ciprofloaxin ve Amphoterin-B antibiyotikleri referans olarak kullanılmış ve elde edilen MIC değerleri normal sınırlar arasında bulunmuştur. Ciprofloaxin, gram (-) bakterilerde etki gösterirken vankomisin ise gram (+) bakterilerde, Amphotericin-B mantarlarda etki göstermektedir.

6.2. Antioksidan Aktivite

Thymus sipyleus bitkisinin gövde ve yaprak; *Globularia orientalis* bitkisinin gövde, yaprak, tohum ve bütün kısımlarının karışımı; *Globularia trichosantha* bitkisinin gövde ve yaprak kısımları deneyde kullanılmıştır. Bu bitkilerin çeşitli yöntemlerle antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonuçları da tablo 6.2' de verilmiştir.

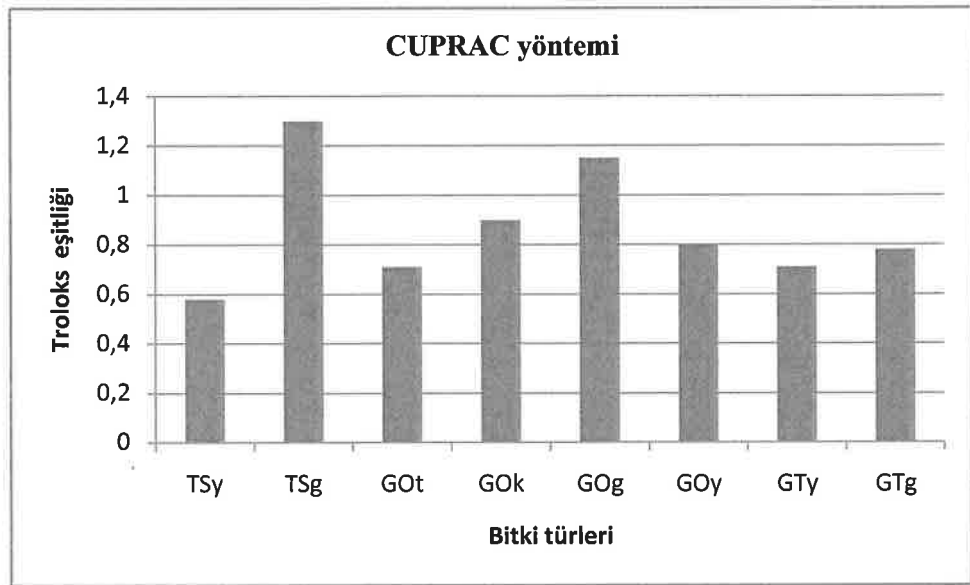
Çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında bitkilerin kısımları kıyaslandığı zaman; en iyi antioksidan aktiviteleri *Globularia trichosantha* gövde, *Globularia orientalis* gövde ve *Thymus sipyleus* gövde göstermiştir.

Tablo 6.2. Antioksidan aktivite sonuçları

	Cuprac Trolöks Eşitliği mmol/g	DPPH % İnhibisyon (1:5)	ABTS Trolöks Eşitliği mmol/g	FERROZİN	FRAP Trolöks Eşitliği mmol/g	FOLİN Trolöks Eşitliği mmol/g	Süperoksit % İnhibisyon	HPS % İnhibisyon
TSy	0,58±0,03	18,6±0,66	0,33±0,03	-	0,27±0,01	0,74±0,03	8,75±0,20	51,5
TSg	1,30±0,02	36,9±1,09	0,49±0,01	-	0,58±0,03	1,37±0,04	24,9±0,23	71,4
G0t	0,71±0,01	25,9±0,56	0,39±0,02	-	0,40±0,01	0,93±0,01	6,82±0,17	40,8
G0k	0,90±0,02	33,3±1,00	0,45±0,04	-	0,45±0,01	1,05±0,03	6,87±0,17	54,8
G0g	1,15±0,03	40,1±0,45	0,53±0,03	-	0,48±0,04	1,41±0,01	16,0±0,40	34,9
G0y	0,80±0,01	29,4±0,80	0,60±0,03	-	0,47±0,02	1,03±0,02	6,57±0,20	39,1
G1y	0,71±0,03	23,6±1,03	0,62±0,02	-	0,40±0,04	0,92±0,01	20,1±1,05	36,4
G1g	0,78±0,01	31,9±1,10	0,49±0,03	-	0,41±0,02	1,17±0,01	27,2±1,01	30,0

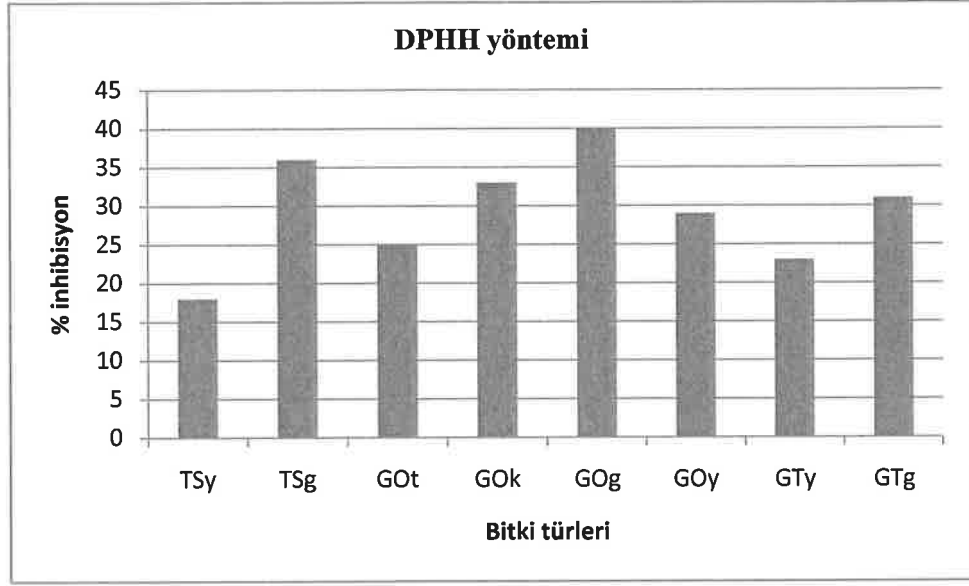
G0t: *Globularia orientalis* tohum, **G0g:** *Globularia orientalis* gövde, **G0y:** *Globularia orientalis* yaprak, **G0k:** *Globularia orientalis* bütün, **G1g:** *Globularia trichosantha* gövde, **G1t:** *Globularia trichosantha* tohum, **G1y:** *Globularia trichosantha* yaprak, **TSg:** *Thymus sipyleus* gövde, **TSy:** *Thymus sipyleus* yaprak, **HPS:** Hidrojen Peroksit Süpürmesi, **Cuprac:** bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite, **DPPH:** toplam antioksidan potansiyel ölçümü, **ABTS:** ABTS radikal süpürücü ölçümü, **FERROZİN:** Metal şelatlama aktivitesi ölçümü, **FRAP:** Ferrik iyonu indirgenme antioksidan ölçümü, **FOLİN:** Folin- ciocalteu reaktif i ile toplam fenolik madde ölçümü ($p<0,05$)

CUPRAC (bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yönteminde Troloks' a göre bir oran bulunarak antioksidan aktivitelerini kıyaslama yapılmıştır. Aralarındaki bu oran kıyaslandığında ise en iyi sonucu TSg (kekik) bitkisi göstermiştir. Antioksidan kapasitesi ise sırayla TSg > GOg > GOk > GOy > GTg > GTy = GOt > TSy bu şekildedir. Kekiklerin kısımları de kendi aralarında kıyaslandığı zaman gövde kısmı yaprak kısmına oranla daha fazla aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bütün bitki cinslerinde de en iyi aktivite gövde kısımlarında mevcuttur.



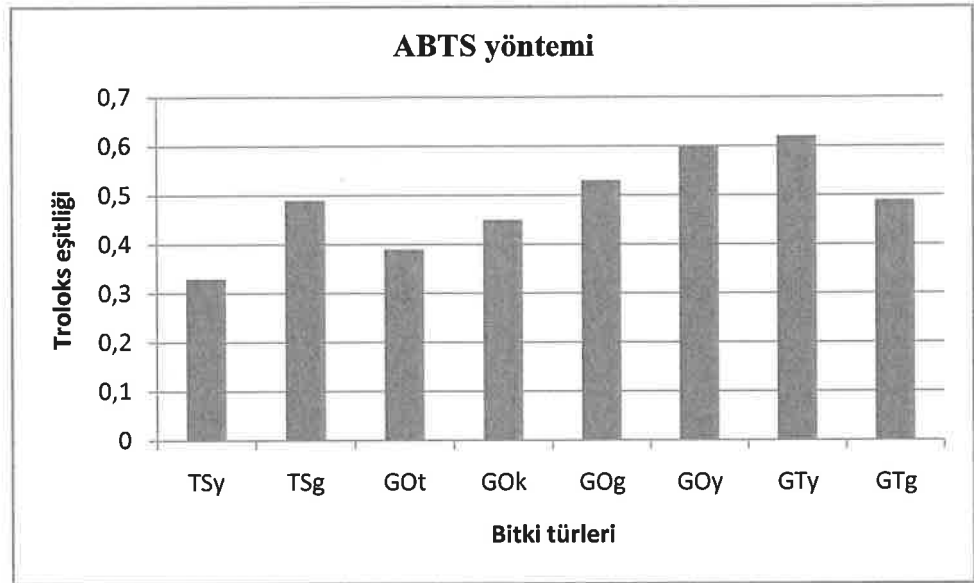
Şekil 6. 10. CUPRAC yöntemine göre bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği

DPPH yöntemi ile toplam antioksidan kapasite ölçümü yapılmaktadır ve bu yöntemde sonuçlar % inhibisyon şeklinde verilmektedir. En iyi inhibisyona GOg sahiptir. Antioksidan kapasite sıra ile GOg > TSg > GOk > GTg > GOy > GOt > GTy > TSy sıralanmaktadır. Bunlarda da görüldüğü üzere bitki kısımları kıyaslandığı zaman en iyi aktiviteyi gövde kısımları göstermektedir.



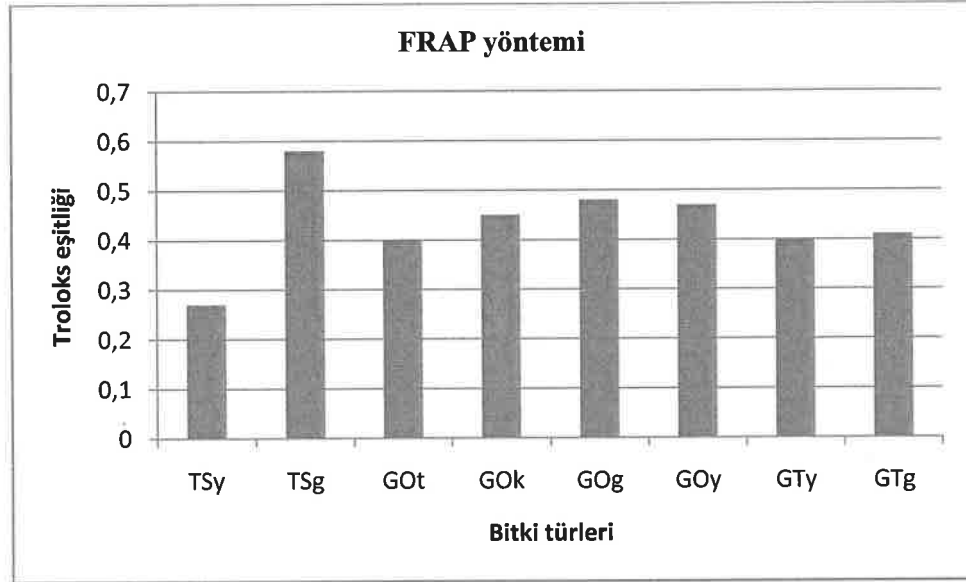
Şekil 6. 11. DPPH yönteminde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği

ABTS radikali süpürücü aktivite Troloksa göre bir oran bulunarak antioksidan aktivitelerini kıyaslama yapılmıştır. En iyi orana diğer bitki kısımlarından farklı olarak GTy sahiptir yani en iyi ABTS radikali süpürücü etkiye GTy sahiptir. Bitkiler arasında bir kıyaslama yapıldığı zaman Globularia cinsi bitkiler daha aktiftir. Sıralama ise şu şekildedir: GTy > GOy > GOg > TSg = GTg > GOk > GOt > TSy



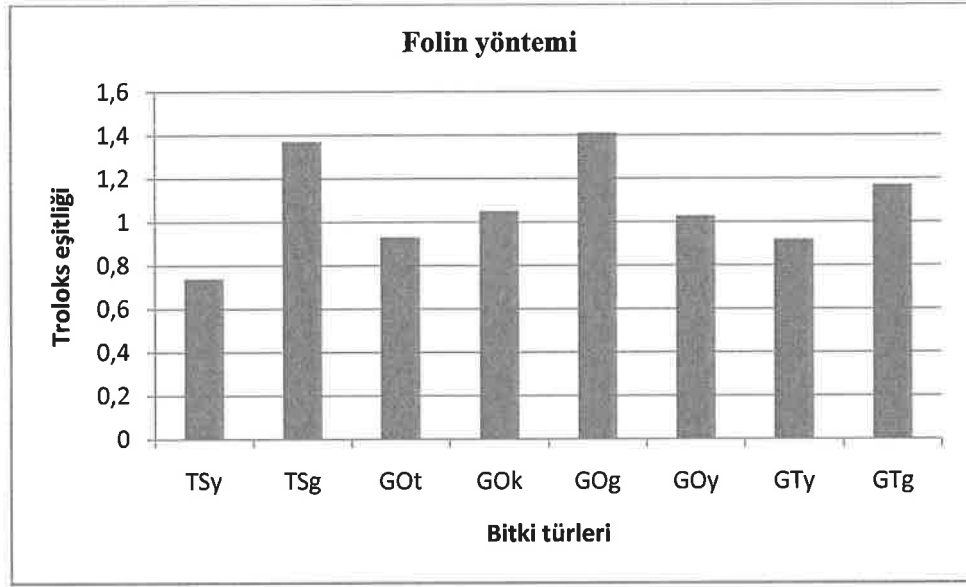
Şekil 6. 12. ABTS yönteminde bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği

FRAP yönteminde Fe(III), Fe(II)' ye indirgenir. Bu yöntemde Troloksa göre bir oran bulunarak antioksidan aktiviteleri arasında kıyaslama yapılmıştır. Bitkilerden en iyi indirgeme kapasitesi ise TSg (kekik)' de vardır. Bu kıyaslama şöyledir: TSg > GOg > GOy > GOk > GTg > GOt = GTy > TSy



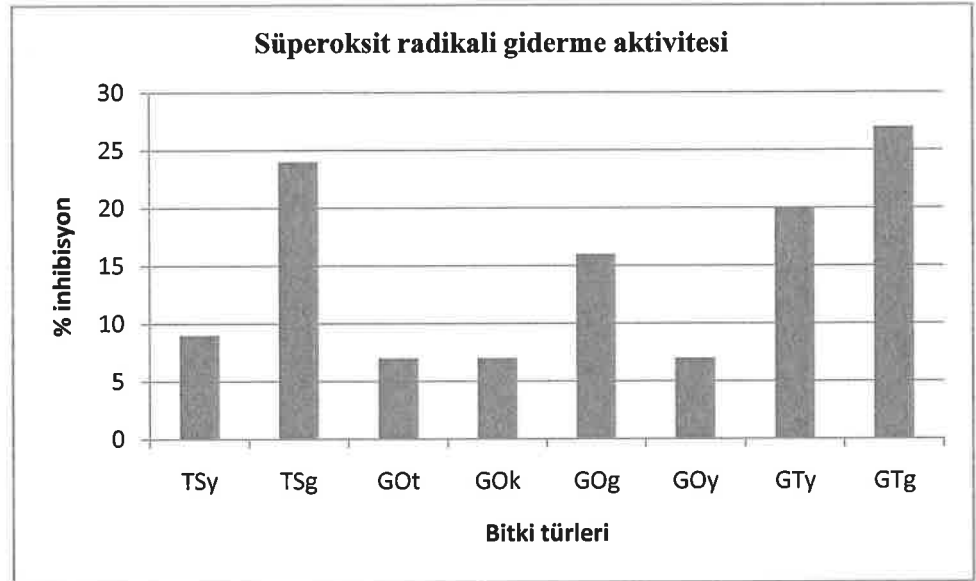
Şekil 6. 13. FRAP yönteminde bitki türlerinin troloks eşitliğine karşı grafiği

FOLİN yönteminde fenolik madde ölçümü yapılmaktadır. Bu yöntemde GOg > TSg > GTg > GOk > GOy > GOt > GTy > TSy sıralaması mevcuttur. En iyi fenolik madde tayini ise GOk' da görülmüştür.



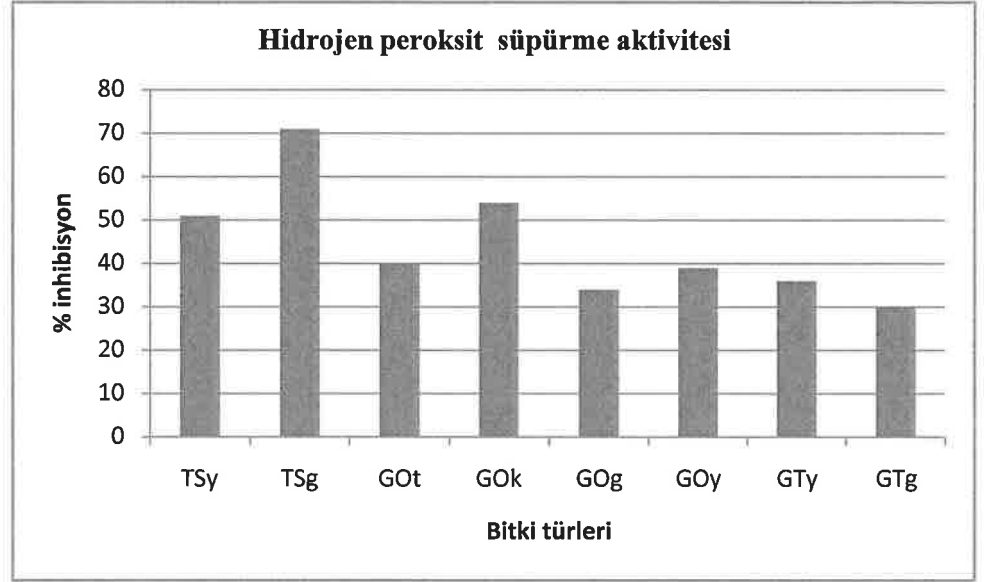
Şekil 6. 14. FOLİN yönteminde bitki türlerinin trolox eşitliğine karşı grafiği

Süperoksit radikali giderme aktivitesinin de sonuçlar % inhibisyon şeklinde bulunmuştur. En iyi giderme aktiviteyi GTg vermiştir. $GTg > TSg > GTy > GOg > TSy > GOk > GOt > GOy$ sıralaması mevcuttur. Buna göre bu yöntemde de bitkilerin kısımları karşılaştırıldığı zaman en iyi süperoksit giderme aktivitesi gövde kısımlarında olduğu görülmüştür.



Şekil 6. 15. Süperoksit radikali giderme aktivitesinde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği

Hidrojen peroksit süpürme aktivitesinin de sonuçlar % inhibisyon Şeklinde bulunmuştur. En iyi süpürme aktivitesini kekiğin gövde kısmı göstermiştir. Bitkiler arasında bir kıyaslama yapıldığı zaman ise süpürme aktivitesi en iyi bitki kekiktir. Sıralama ise Őu Şekildedir: TSg > GOk > TSy > GOt > GOy > GTy > GOg > GTg



Şekil 6. 16. Hidrojen peroksit süpürme aktivitesinde bitki türlerinin % inhibisyona karşı grafiği

Bitkilerimiz ferrozinin yöntemine cevap vermemiŐtir. Bundan da bu bitkilerimizin Fe (II)'yi Fe (III)' e yükseltgeme kapasitesinin olmadığı anlaşılmaktadır.

7.BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Thymus sipyleus bitkisinin gövde ve yaprak; *Globularia orientalis* bitkisinin gövde, yaprak, tohum ve bütün kısımlarının karışımı; *Globularia trichosantha* bitkisinin gövde, yaprak ve tohum kısımlarının gram (+), gram (-) bakteriler ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Bitkilerin antibakteriyal etkilerinin olduğu, antifungal etkilerinin olmadığı ve gram (+) bakterilerin gram (-) bakterilerden daha çok duyarlı olduğu tablo 3' de görülmektedir.

Bitkiler arasında bir kıyaslama yapıldığı zaman en iyi aktiviteye *Thymus sipyleus* türünün sahip olduğu anlaşılmıştır.

TSy ve TSg bitkilerinin *E. feacalis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *L. monotygenes* ve MRSA üzerinde MIC değeri 32 µg/mL, GOk, GTg ve GTy bitkilerinin *S. pneumoniae* üzerindeki MIC değeri 16 µg/mL' dir. GOk, GTg ve GTy bitkilerinin verdiği 16 µg/mL olan MIC değerlerinin bu deneydeki en iyi sonuçlar olduğu görülmektedir.

Thymus sipyleus türünün gövde ve yaprak; *Globularia orientalis* türünün gövde, yaprak, tohum ve bütün kısımlarının karışımı; *Globularia trichosantha* türünün gövde ve yaprak kısımlarının antioksidan aktiviteleri 8 ayrı metotta incelenmiştir. *Thymus*

sipyleus, *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* türleri, metal-şelatlama yöntemi olan FERROZİN hariç bütün metodlarda antioksidan aktivite göstermektedirler. Bitkilerin kısımları karşılaştırıldığı zaman en iyi antioksidan aktiviteye *Globularia trichosantha* gövde, *Globularia orientalis* gövde ve *Thymus sipyleus* gövde kısımlarının sahip olduğu tablo 6.1' de görülmektedir. Yani bitkilerimizin gövde kısımları diğer kısımlarından daha aktiftir.

TSg bitkisinin TSy bitkisinden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu (FERROZİN yöntemi hariç) bütün yöntemlerde görülmektedir.

Globularia orientalis bitkisinin gövde, yaprak, tohum ve bütün kısımları kıyaslandığı zaman gövde kısmının aktif olduğu; yaprak kısmının ise daha az aktif olduğu anlaşılmaktadır. Çoğu yöntemde GOg' nin antioksidan aktivitesi yüksek iken; HPS yönteminde GOk (% 54,8), ABTS yönteminde GOy (0,60 mmol/g) yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaktadır.

GTg bitkisi GTy bitkisi ile kıyaslandığı zaman çoğu yöntemde gövde kısmının daha aktif olduğu tablo 6.2' de görülmektedir. Ancak HPS yönteminde GTy bitkisi GTg bitkisine göre daha aktiftir.

Literatür taramalarımıza göre *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ilk kez bu çalışmayla aydınlatılmıştır.

Bu deneyler sonucunda ise *Thymus sipyleus*, *Globularia orientalis* ve *Globularia trichosantha* bitkilerinin antimikrobiyal ve antioksidan kapasiteye sahip olmaları nedeniyle hastalıkların tedavisinde destekleyici doğal ürün olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bitki>, Kasım, 2012.
2. Fakılı, O., Türkiye’ de Kekik Adı ile Anılan Bitkiler Konusunda Yapılan Çalışmaların Envanteri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2010.
3. Benli, M., Yiğit, N., Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus Vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 8(3):1-8, 2005.
4. Güder, A., *Urtica Dioica L. ve Malva Neglecta Wallr.* Bitkilerinin ve Karışımlarının Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2008.
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/Globularia>, Kasım, 2012.
6. Elbeticha, A., et al., Fetotoxic Potentials of *Globularia Arabica* and *Globularia Alypum* (Globulariaceae) İn Rats, MEDLINE , 72(1-2) :215-9, 2000.
7. Tundis, R., et al., Iridoid and Bisiridoid Glycosides from *Globularia Meridionalis* (Podp.) O. Schwarz Aerial And Underground Parts, Journal article, 40(71–74), 2011.
8. Gillespie, S., Bamford, K., Medical Microbiology and Infection at a Glance, University Collage London, London, 2000.
9. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942124051.pdf>, Kasım, 2012.
10. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Salmonella>, Kasım, 2012.
11. http://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli, Kasım, 2012.
12. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF10CC3F7A155F5A36>, Kasım, 2012.
13. İşbilir, Ş., Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 2008.

14. Bektaşoğlu, B., Hidroksil Radikal Süpürülmesine Dayalı Antioksidan Aktivite Ölçümünde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2007.
15. Gill, S., Tuteja, N., Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stres Tolerance in Crop Plants, *Plant Physiol Biochem.*, 48(12):909-30, 2010.
16. Cao, G., Prior, R.L., In Vivo Antioksidan Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radic Biol Med.*, 27(11-12):1173-81, 1999.
17. Ardađ, A., Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2008.
18. Koleva, I, I., et al., Screening of Plant Extracts for Antioksidan Activity: A Comparative Study on Three Methods, *Phytochem Anal.*, 13(1):8-17, 2002.
19. Lopez-Alarcon, C., Lissi, E., A Novel and Simple ORAC Methodology Based on The Interaction of Pyrogallol Red With Peroxyl Radicals, *Free Radic Res.*, 40(9):979-85, 2006.
20. Özen, T., Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitesinin In Vitro ve In Vivo Araştırılması, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2003.
21. Apak, R., ve ark., Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and The CUPRAC (Cupric İon Reducing Antioksidan Capacity) Assay, *Microchimica Acta*, 160(7): 413-419, 2007.
22. Badarinath, A. V., et al., A Review On In- Vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations And Considerations, *PharmTeac*, 2(2):1276-1285, 2010.
23. Öztan, T., Mor Havuç, Konsantresi, Şalgam Suyu, Nar Suyu ve Nar Ekşisi Ürünlerinde Antioksidan Aktivitesi Tayini ve Fenolik Madde Profilinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, 2006.
24. Çetin, B., ve ark., The Investigation of Antimicrobial Activity of Thyme And Oregano Essential Oils, *Turk J Agric For.*, 2(35):145-154, 2009.

25. Özgen, U., ve ark., Relationship Between Chemical Structure and Antioxidant Activity of Luteolin and Its Glycosides Isolated From *Thymus Sipyleus* Subsp. *Sipyleus* Var. *Sipyleus*, *PlantaMed*, 1(5):12-21, 2010.
26. Siddhuraju, P., Manian, S., The Antioxidant Activity and Free Radikal-Scavenging Capacity of Dietary Phenolic Extracts from Horse Gram (*Macrotyloma uniflorum*(*Lam.*) Verdc.) Seeds, *Elsevier*, 3(105):950-958, 2007.
27. Khalaf, N., A., et al., Antioxidant Activity of Some Common Plants, *Turk J Biol*, 32:51-55, 2008.
28. Köksal, E., ve ark., In Vitro Antioxidant Activity of Silymarine, *Informa Healthcare*, 24(2): 395-405, 2009.
29. Baravalia, Y., et al., Antioxidant and Antibacterial Activity of *Diospyros ebenum* Roxb. Leaf Extracts, *Turk J Biol*, 33:159-164, 2009.
30. Patra, J., K., et al., Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Seaweed (*Sargassum* sp.) Extract: A Study on Inhibition of Glutathione-S-Transferase Activity, *Turk J Biol*, 32:119-125, 2008.
31. Park, Y., et al., Comparison of the Nutrient and Chemical Contents of Traditional Korean Chungtaejeon and Green Teas, *Plant Foods Hum Nutr*, 65(2):186-191, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Mersin' de doğdu. İlköğretim ve orta öğretimini Mersin' de tamamladı. Liseyi Manisa' da tamamladı. 2006 yılında Adnan Menderes Üniversite' si Kimya bölümünü kazandı. 2010 yılında bu bölümü bitirdi ve aynı sene Nevşehir Üniversite' si Kimya bölümünde yüksek lisansa başladı. Hala Nevşehir üniversitesinde öğrenimine devam etmektedir.

Adres: 2000 Evler Mah. Refikbaşaran Sok.
Toki 3. Etap C5 Blok Kat 1/5
Merkez/ NEVŞEHİR

Telefon: 0539 303 00 54
e-posta : merve_durmus88@hotmail.com

