

*CİRSİUM CRETİCUM* (Lam.) d'Urv.  
(*ASTERACEAE*) BİTKİSİNDEKİ UÇUCU  
BİLEŞİKLERİN TAYİNİ VE BİTKİNİN  
ANTİFUNGAL/ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Cansu ŞANDA

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

2019

**T.C.**

**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***CIRSİUM CRETICUM* (LAM.) D'URV. (ASTERACEAE) BİTKİSİNDEKİ UÇUCU  
BİLEŞİKLERİN TAYİNİ VE BİTKİNİN ANTİFUNGAL/ANTİMİKROBİYAL  
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Cansu ŞANDA**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK**

**TEKİRDAĞ-2019**

**Her hakkı saklıdır**

Bu tez TÜBİTAK tarafından 116Z450 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Temine ŞABUDAK danışmanlığında, Cansu ŞANDA tarafından hazırlanan “*Cirsium creticum* (Lam.) d’Urv. (*Asteraceae*) Bitkisindeki Uçucu Bileşiklerin Tayini ve Bitkinin Antifungal/Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. Hülya ORAK

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *CIRSİUM CRETICUM* (Lam.) d'Urv. (ASTERACEAE) BİTKİSİNDEKİ UÇUCU BİLEŞİKLERİN TAYİNİ VE BİTKİNİN ANTİFUNGAL/ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

**Cansu ŞANDA**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Temine ŞABUDAK

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. (Asteraceae) bitkisinden elde edilen n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrofotometri cihazıyla tayin edilmesi ve bitkiden elde edilen ekstrelerde (n-hekzan, eter, etilasetat ve metanol) antifungal ve antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında çalışılan *C. creticum* bitkisi Temmuz 2017 tarihinde Trakya bölgesinden toplanmıştır. *C. creticum* bitkisi kurutulduktan sonra metanol ile maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapılmış, metanol buharlaştırıldıktan sonra ham ekstre elde edilmiştir. Daha sonra, ham ekstreye polarite sırasına göre n-hekzan, diklorometan, etilasetat ve n-bütanol ile geri ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen n-hekzan ekstresinin kimyasal içeriği, GC-MS cihazıyla tayin edilmiştir. *C. creticum*'un GC-MS analiz sonucu *C. creticum* da en bol bulunan uçucu bileşikler, terpenoidler (% 33.26) ve hidrokarbonlar (% 41.11) olmuştur. *C. creticum* n-hekzan ekstresinin GC-MS analizi, ekstredeki farklı kimyasal yapıya sahip çeşitli farmasötik olarak önemli kimyasal bileşiklerin varlığını göstermiştir. Bununla birlikte, elde edilen dört ekstre için antimikrobiyal ve antifungal aktivite araştırılmıştır. Aktivite sonuçlarına genel olarak bakıldığında, *C. creticum*'un metanol ekstresinin, diğer ekstrelere göre, antifungal ve antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu tez çalışmasıyla, *C. creticum* n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin tayini ve bitkinin antifungal ve antibakteriyal aktivitesi ilk kez literatüre sunulmuş bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Cirsium creticum*, uçucu bileşik, antimikrobiyal aktivite, antifungal aktivite.

2019, 49 Sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

VOLATILE COMPOUND INVESTIGATION OF *CIRSIUM CRETICUM* (Lam.) d'Urv.  
(*ASTERACEAE*) PLANT WHICH GROWING IN TRAKYA REGION AND  
DETERMINATION OF ITS ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY

**Cansu ŞANDA**

Tekirdağ Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Temine ŞABUDAK

The aim of the present research was to identify of volatile compounds in hexane extracts by GC-MS and to determine antibacterial, antifungal activities of *C. creticum* in 4 different extracts. *C.creticum* plant was collected from Trakya region in July 2017. After the *C. creticum* plant was dried, it was extracted with methanol by maceration, and the crude extract was obtained after the methanol was evaporated. The crude extract was then back-extracted with n-hexane, dichloromethane, ethylacetate and n-butanol according to the polarity order. The chemical content of the obtained n-hexane extract was determined by GC-MS. The most abundant volatile compounds in *C.creticum* were the terpenoids (33.26%) and the hydrocarbons (41.11%). GC-MS analysis of *C.creticum* n-hexane extract indicated the presence of various pharmaceutically important chemical compounds with different chemical structure in the extract. In addition, antimicrobial and antifungal activity were investigated for the four extracts obtained. In general, the results of the activity of the methanol extract of *C.creticum*, antifungal and antimicrobial activity were found to be higher than the other extracts. With this thesis study, antifungal and antibacterial activities of the volatile compounds of n-hexane extract of *C.creticum* were presented for the first time in the literature.

**Keywords:** *Cirsium creticum*, volatile compounds, antimicrobial activity, antifungal activity.

**2019, 49 Pages**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
TABLO DİZİ .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR .....	ix
<b>1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....</b>	<b>4</b>
2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	4
2.1.1. <i>Asteraceae</i> Familyasının Özellikleri ve Yayılışı.....	4
2.1.2. <i>Cirsium</i> Cinsinin Genel Özellikleri .....	4
2.1.3. <i>Cirsium creticum</i> (Lam.) d’Urv. ( <i>Asteraceae</i> ) Bitkisinin Genel Özellikleri .....	5
2.1.4. <i>Cirsium</i> Türlerinde Uçucu Bileşiklerin Tayini İle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	6
2.1.5. <i>Cirsium</i> Türlerinde Antifungal/Antimikrobiyal Tayini ile İlgili Yapılan Çalışmalar .....	9
2.2. Uçucu Yağlar ve Özellikleri .....	9
2.3. Uçucu Yağların Sınıflandırılması.....	10
2.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerine Göre Sınıflandırılması .....	10
2.3.1.1. Terpenler.....	10
2.3.2. Uçucu Yağların Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	12
2.3.3. Farmakolojik ve Terapötik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması .....	13
2.4. Uçucu Yağların Eldesi.....	13
2.4.1. Distilasyon Yöntemi .....	13
2.4.1.1. Su Distilasyon.....	14
2.4.1.2. Buhar Distilasyonu .....	14
2.4.1.3. Su-Buhar Distilasyonu.....	14
2.4.1.4. Hidrodifüzyon.....	15
2.4.2. Ekstraksiyon .....	15
2.4.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon .....	15
2.4.2.2. Sabit Yağ ile Ekstraksiyon .....	15
2.4.2.3. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon .....	15
2.4.3. Sıkma.....	16

2.5. Kromatografi .....	16
2.5.1. Gaz Kromatografisi .....	17
2.5.1.1. Taşıyıcı Gaz .....	18
2.5.1.2. Numune Girişi .....	19
2.5.1.3. Kromatografik Kolon .....	19
2.5.1.4. Sıcaklığın Etkisi ve Kontrolü .....	20
2.5.1.5. Gaz Kromatografi Dedektörleri .....	21
2.6. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite .....	22
2.6.1. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	23
2.6.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri .....	23
2.6.1.1.1. Dilüsyon Yöntemi .....	23
2.6.1.1.1.1. Broth Dilüsyon Yöntemi .....	24
2.6.1.1.1.2. Agar Dilüsyon Yöntemi .....	24
2.6.1.1.2. Difüzyon Yöntemi .....	24
2.6.1.1.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi .....	25
2.6.1.1.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi .....	25
2.6.1.2. Antifungal Aktivite Tayin Yöntemleri .....	26
2.6.1.2.1. Dilüsyon Yöntemi .....	26
2.6.1.2.2. Difüzyon Yöntemi .....	26
2.6.1.2.3. E Test Yöntemi .....	26
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>28</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	28
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	28
3.3. Kullanılan Belirteçler ve Çözeltiler .....	28
3.4. Deneysel Bölüm .....	29
3.4.1. Bitkinin Toplanması .....	29
3.4.2. Bitkinin Ekstraksiyonu .....	29
3.4.3. <i>C. creticum</i> Bitkisinin n-Hekzan Ekstresinde GC-MS Yöntemiyle Uçucu Bileşik Tayini .....	30
3.4.4. <i>C. creticum</i> Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Tayini .....	30
3.4.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayini .....	30
3.4.4.2. Antifungal Aktivite Tayini .....	32
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>34</b>



4.1. <i>C. creticum</i> Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Sonuçları .....	34
4.1.1. <i>C. creticum</i> Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları .....	34
4.1.2. <i>C. creticum</i> Antifungal Aktivite Sonuçları.....	35
4.2. <i>C. creticum</i> Bitkisinin n-Hekzan Ekstresindeki Uçucu Bileşik Tayini Sonuçları.....	36
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>40</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>42</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>49</b>

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. creticum</i> (Lam.) d'Urv. <i>subsp. creticum</i> (Asteraceae) bitkisi .....	5
Şekil 2.2. Uçucu yağlar içerisinde bulunan bazı monoterpenlerin kimyasal yapıları .....	12
Şekil 2.3. Bisabolol ve kamazulenin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 2.4 Gaz kromatografi cihazının bölümleri .....	18
Şekil 3.1. Cam kavanozlarda bekletilen <i>Cirsium creticum</i> bitkisi .....	29
Şekil 3.2. Mikroplak ve ekimlerin yapılışı .....	32
Şekil 4.1. <i>C. creticum</i> n-hekzan ekstresinin GC-MS kromatogramı .....	38

## TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>C.creticum</i> ssp. <i>Triumfetti</i> (Cc) ve <i>Carduus nutans</i> 'ın (Cn) uçucu yağ bileşenleri ...	8
Tablo 2.2. Bazı bitkilerde bulunan monoterpenler .....	11
Tablo 2.3. Gaz kromatografi dedektörlerinin uygulandığı numune tipleri .....	21
Tablo 4.1. <i>C. Creticum</i> 'un ham ekstrelerinde antimikrobiyal aktivite sonuçları .....	35
Tablo 4.2. <i>C. Creticum</i> 'un ham ekstrelerinde antifungal aktivite sonuçları.....	36
Tablo 4.3. <i>C. creticum</i> 'un n-hekzan ekstresinin uçucu bileşik kompozisyonu (%)......	37
Tablo 4.4. <i>C. creticum</i> bitkisinin n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin sınıf dağılımı ....	39

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
A/A	: Ağırlıkça/ağırlık
mL	: Milimetre
DK	: Dakika
ATCC	: American Type Culture Collection
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
<i>S. AUREUS</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. SUBTILIS</i>	: <i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. COLI</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P. AERUGINOSA</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. MIRABILIS</i>	: <i>Proteus mirabilis</i>
<i>S. TYPHIMURIUM</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>C. CRETICUM</i>	: <i>Cirsium creticum</i>
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
CFU	: Colony Forming Unit
Ri	: Alıkonma İndeksi

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında ve Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleşmiştir.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, her konuda bana yardımcı olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Temine ŞABUDAK'a,

Antibakteriyel ve antifungal aktivite çalışmaları boyunca sundukları laboratuvar imkanı ve desteklerden dolayı Sayın Doç.Dr. Dumrul GÜLEN ve Arş. Gör.Dr. Mine AYDIN KURÇ'a,

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını benden esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Aslı ŞİMŞEK, Merve ÖZER ve Hilmican ÇALIŞKAN'a,

Benden desteklerini esirgemeyen arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN'a,

Hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, bana güç veren aileme, yeğenim Arda Tuna ŞANDA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Ocak, 2019

Cansu ŞANDA

## 1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Bilimin ilerlemesi ve eczacılık tekniklerinin gelişmesiyle, son yüzyılda bitkilerin tedavi edici değere sahip etken maddelerinin saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Sonraları, sentetik ilaçlarda ciddi yan etkilerin yol açtığı medikal ve ekonomik sorunlar veya sanayileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğinin arttığı ekolojik kirlilikler, tedavileri henüz mümkün olmayan pek çok kronik hastalığın oluşturduğu tehdit, doğal olması ve yan etkilere yol açmadığı düşüncesi gibi bir çok faktöre bağlı olarak bitkilerle tedaviyi popüler hale getirmiştir. Ayrıca günümüzde eczanelerde satılmakta olan ilaçların birçoğu bitkisel kaynaklı ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş türevlerinden oluşmaktadır. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Altan ve ark. 1999, Baytop 1999, Başer 2001, Kandemir ve Beyazoğlu 2002, Ertuğ 2004, Şimşek ve ark. 2004).

Yaşam standardı arttıkça, tüketim tıbbi ve aromatik bitkiler için de artmaktadır. Bu bitkilerin tüketim alanı oldukça geniş olup; ilaç, kozmetik, diş macunu, sabun, parfüm, olup ayrıca baharat ve çay olarak tüketilmektedir (Baytop 1999). Ayrıca, bitkilerin göstermiş oldukları antioksidan, antikarsinojenik, antiallerjenik, antimikrobiyal, antifungal, analjezik etkilerden dolayı da bilim insanlarının ilgisini çekmektedir.

Türkiye'nin Akdeniz, Asya ve Avrupa gibi üç farklı coğrafik alanda yer alması, ülkemizi bitki çeşitliliği ve endemik bitkiler açısından zengin bir ülke haline getirmiştir. Türkiye florasında kayıtlı olan yaklaşık 9.000 tür bulunmaktadır. Bunların ortalama 1.000 kadarı ilaç ve baharat ham maddeleridir ve halk arasında özellikle çay ve çeşni olarak kullanılmaktadır. Türkiye florasına ait türlerin % 30'u aromatik bitkilerdir (Baytop 1999). 1948 ve 1974 Türk kodekslerinde 140 kadar tıbbi bitki kayıtlıdır ancak günümüzde yaklaşık 500 bitki, tıbbi amaçlarda kullanılmaktadır (Başer 1995, Baytop 1999, Baytop 1993, Başer 2006).

Uçucu yağ, katı ya da sıvı, değişik birçok kimyasal bileşiğin birbiri içinde çözünerek homojen bir çözelti oluşturduğu, uçucu özellikte olan kompleks bir karışımdır. Uçucu yağlar kozmetik, parfümeri ve gıda endüstrisinde önemli bir ekonomik değer taşırlar. Kimyasal ve fiziksel özellikler açısından sabit yağlardan oldukça farklıdır (Otte 1994). Temel bileşikleri bitkiler aleminde doğal olarak ve yaygın şekilde bulunan terpenoitlerdir. Bunun yanında daha

az miktarda doymuş alifatik, olefinik, asetilenik ve aromatik hidrokarbonlar ve türevleri de bulunabilir (Guenther 1948).

Son yıllarda, bulaşıcı hastalık etkeni ve hastane enfeksiyonlarına neden olan birçok mikroorganizma türü tedavi amacıyla kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı dirençli hale gelmiştir (Janovska ve ark. 2003, Davis 1994, Hussain ve ark. 2011). Ayrıca, çoğu antifungal ve antiviral ilaçların yüksek zehir etkisinden dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır (Maregesi ve ark. 2008). Tedavi için kullanılan mevcut antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların geliştirdiği direncin artması ve yeni kuşak antibiyotiklerin üretilmesinin yüksek maliyeti ilaç sektörünün yeni antimikrobiyal maddeler keşfedilmesi ve yapılarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (Singh ve ark. 2011). Bitkisel ekstratlar; flavonoid, polifenolik bileşikler, taninler ve terpenler gibi çok sayıda fitokimyasal maddeyi içermektedir. Yapılan çalışmalar, mikroorganizmalara karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktiviteden bu tür bileşiklerin sorumlu olduğunu göstermektedir (Mojab ve ark. 2008). Birçok araştırmacı, bitkilerden elde edilen su ekstratlarının metanol, etanol ve n-hekzan gibi çözücüler kullanılarak elde edilen ekstratlara göre daha düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmektedir (Nazri ve ark. 2011). Organik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstratların daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, elde edilen özütlerin aromatik veya doymuş organik bileşikleri daha yüksek miktarlarda içermesinden kaynaklanmaktadır (Nazri ve ark. 2011). Bazı çalışmalar, bitkilerin tedavi edici etkilerinin tek bir etken maddeden ziyade çok sayıda bileşimin sinerjik etkisinden kaynaklandığını, bu nedenle bitkisel bileşimlerin tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmaların dirençliliğine karşı koyarak daha etkin bir tedavi sağladığını rapor etmektedir (Sree ve ark. 2010, Nazri ve ark. 2011). Bu durum, araştırmacıları bitki özütlerinden elde edilen doğal antimikrobiyal ajanların inhibitör etkiye sahip bileşimlerini araştırmaya yöneltmektedir (Dash ve ark. 2011).

*Cirsium creticum* bitkisi, *Asteraceae* familyasına aittir. Genç ve Özhatay (2006), Çatalca'da yapmış oldukları etnobotanik çalışmasında *C. creticum subsp. creticum* meyvelerinin halk arasında mantar zehirlenmelerine karşı kullanıldığını tespit etmişler ve başka bir çalışmada ise bu bitki kabuklarının soyulup çığ olarak yenildiği ya da yemeğinin yapıldığını bildirmişlerdir (Anonymous 2012).

Çalışmamızda daha önce biyolojik aktivitesi araştırılmamış olan, Trakya bölgesinde yetişen *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv subsp. *creticum* (*Asteraceae*) bitkisinden elde edilen n-hekzan ekstratındaki uçucu bileşiklerin (yağ asitleri, terpen, alkan, alkol, ester, aldehit,

keton, alken, aromatik bileşikler vb.) Gaz Kromatografi Kütle Spektrofotometresi (GC-MS) cihazıyla tayini amaçlanmıştır. Çalışmanın diğer adımında ise, bitkiden elde edilen n-hekzan, eter, etilasetat ve metanol ekstralarında, antifungal ve antimikrobiyal aktivitenin araştırılması gerçekleştirilmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerine Yapılan Çalışmalar

#### 2.1.1. *Asteraceae* Familyasının Özellikleri ve Yayılışı

*Asteraceae* familyası, ağaçsı ve odunsu türleri de kapsayan büyük oranda otsu bitkilerden oluşmakta olan familyadır, ayrıca çok azı çalı ağaç ya da odunsu sarılıcı bitkilerdir. 1.600 cins ve 23.000'den fazla tür içeren *Asteracea* familyası, bitkilerin en büyük ailesindedir ve Antartika hariç dünyanın neredeyse her bölgesinde dağılım göstermekte olan bir familyadır. Özellikle otsu ve otsu-odunsu alanlar ile birlikte dağ vejetasyonlarında yoğun olarak bulunan bu familya, nemli tropik orman bölgelerinde de dar yayılışa sahiptir. Aynı zamanda çok güneş isteyen ve kuraklığa uyum sağlayan bitkilerdir (Bremer 1994, Kadereit ve Jeffrey 2007).

Ülkemizde 136 cins ve 1.195 tür ile en zengin olan familyalardan biri *Asteraceae* familyasıdır. Türkiye'de 446 endemik türe (% 37.3) sahip olan *Asteracea* familyası aynı zamanda en fazla endemik türe sahip olan familyadır (Davis 1965-1985, Güner ve ark. 2000).

#### 2.1.2. *Cirsium* Cinsinin Genel Özellikleri

*Cirsium* adı eskiden tedavi amacıyla damar hastalıkları için kullanılmış olup, anlamı da yunan kökenli "kirsos" yani damar hastalığı anlamına gelmektedir. (Charadze 1963). Ayrıca *Asteraceae* familyasına ait olan *Cirsium creticum* (Lam.) Da'urv. subsp. *creticum*, halk arasında "eşek çalısı" olarak bilinmektedir.

*Cirsium* türü eski çağlardan bu yana birçok taksonun halk arasında değişik amaçlar için yaygın olarak kullanılmış ve tıbbi bir bitki olarak kabul edilmiştir. Ekstraksiyonlar genellikle tohum, kök, gövde ve çiçeklerin kaynatılması ile hazırlanmakta olup, varis, hemoroid, peptik ülser, öksürük ve bronşit gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Loizzo ve ark. 2004, Orhan ve ark. 2007). *Cirsium*'un çiçekli dalları iştah açıcı, kuvvet verici amacıyla çiğ olarak halk arasında tüketilmektedir.

*Cirsium* cinsi bitkilerin boyu yaklaşık 20-100 cm arasındadır ve gövde kısmı dikenli ya da dikensizdir, ancak yaprak kenarları dikenlidir. Yaprak üst yüzeyinde genellikle ufak dikenler mevcuttur ve çiçek kısmının başları tek ya da yoğun olarak bir araya toplanmış olup çiçeğin etrafını çevreleyen çiçek sapından gövdeye bağlandığı yerde bulunan yaprakçıklar çok serili olup uçları dikenlidir. Genellikle bu bitkiler yol kenarlarında, kayalık alanlarda, kültüre

alınmış arazilerde, çam, meşe ve göknar ormanlarının içerisinde bulunmaktadır. Renkleri bazen sarımsı bazen de beyazdan morumsu-kırmızı olarak görünmektedir. Çiçek açtığı aylar Temmuz – Ağustos aylarıdır ve bir ila iki ay arasında çiçekli olarak gözlenmektedir (Seçmen ve ark. 1995, Yıldız ve ark. 2010).

Geleneksel tıp açısından da değerlendirilen bu bitkiye, Trakya bölgesinde yapılan botanik bitki tarama çalışmalarında oldukça fazla rastlanmıştır. Ayrıca yapılan araştırmalarda *Cirsium* familyasına ait *Cirsium creticum* L. (*Asteraceae*) ve *Cirsium italicum* DC. adlı iki alt türün yaygın yetiştiği gözlenmiştir. Diğer taraftan yapılan literatür taramalarında bu alt türlerin biyolojik, kimyasal ve farmakolojik özelliklerine ilişkin ve fitokimyasal aktif bileşenlerinin belirlenmesi üzerine literatürlere rastlanmamıştır.

### 2.1.3. *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. (*Asteraceae*) Bitkisinin Genel Özellikleri

Halk arasında “Eşek çalısı” olarak bilinen *Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (*Asteraceae*) türünün diğer adı “*Cardo Cretese*” dir

Bataklıklar, nemli alanlar ve durgun su kenarlarında 0-1300 metrede yetişen *Cirsium creticum*, çok dikenli iki yıllık odunsu bir tür olup silindirik gövdelidir (Köstekçi 2010).



**Şekil 2.1.** *C. creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (*Asteraceae*) bitkisi

Gövdeleri dar sinuat-kanatlı kısa 3 köşeli topları 1- 10 (14) mm uzunluğunda olup, ince sert dikenlere sahiptir. Gövdesinin ortasında bulunan yapraklar zarımsı, üst yüzde hemen hemen tüysüz olup genellikle dikenlidir. Çatalca yöresinde bu bitki deve dikeni ve yıldız otu

olarak adlandırılmakta ve meyveleri kullanılmaktadır. Meyveleri ezilerek mantar zehirlenmelerine karşı bir çorba kaşığı kadar alınmaktadır (Genç 2003).

Çatalca'da (İstanbul) yapılan etnobotanik çalışmasında, *C. creticum* subsp. *creticum* (eşekçalısı) taksonunun meyvelerinin halk arasında mantar zehirlenmelerine karşı kullanıldığı belirlenmiştir (Genç ve Özhatay (2006)).

#### **2.1.4 *Cirsium* Türlerinde Uçucu Bileşiklerin Tayini İle İlgili Yapılan Çalışmalar**

*Cirsium* türleri Avrupa da *Asteraceae* familyasına ait olarak sınıflandırılır. Bitki flavonoid, fenolik asit, alkaloid, sterol, triterpen, poliasetilen, hidrokarbon, alifatik aldehit ve guanolinler-seskiteren laktonları içerir (Mabry 1970).

Kozyra ve ark. (2015), *Cirsium L.* türünün çiçeklerindeki uçucu yağları, kuru bitki materyallerinden su buharı destilasyonu ile elde etmişlerdir. Uygulanan hidrodamıtma verimi ile *C.heterophyllum*' da % 0.051'lik sarımsı yağ ve *C.eriophorum* ile incelenen diğer *Cirsium* türlerinde % 0.024 uçucu yağ verimi bulmuşlardır. Tanımlanan tüm bileşikler onların kütle spektrumları karşılaştırmasına dayanılarak gerçekleştirilmiş ve kuru materyal verimi olarak elde edilmiştir. İnceledikleri bitkilerin temel bileşenleri uzun zincirli alifatik hidrokarbonlardır. Ayrıca, az miktarda terpenlerde tespit edilmiştir.

Miyazawa ve ark. (2003), *Cirsium L.* Spp.'den eterik yağların fitokimyasal araştırmasını, GC-MS metodunu kullanarak gerçekleştirmiştir. *Cirsium L.* türünden elde edilen eterik yağların bileşenleri ilk kez tanımlanmıştır. Uçucu yağları ayrıca alifatik hidrokarbona sahip uzun karbon yan zinciri içerdiğini tespit etmişlerdir.

Kozyra ve ark. (2015), *Cirsium* türlerinin çiçeklenmesindeki uçucu bileşenlerin kimyasal bileşimini ve değişkenliğini incelmış küçük miktarda terpenler-timol,  $\beta$ -linalol, öjenol, kavrakrol elde etmişlerdir. Doymuş yağ asitleriyle tek sayılı karbon parafinleri de bulmuşlardır. Çalışmalarında *C.pannonicum*, *C.ligulare*, *C.heterophyllum*, *C.acaule*, *C.oleraceum*, *C.dissectum*, *C.decussatum* ve *C.eriophorum* çiçeklerinde doymuş yağ asitlerin kimyasal bileşimindeki farklılıkları gösterip elde edilen bu *Cirsium* türlerinin biyoaktif bileşiklerinin timol ve öjenol gibi zengin kaynaklı olmasıyla ilgili olduğunu da belirtmişlerdir.

Boğa ve ark. (2014), Türkiye'de yetişen endemik olan *Cirsium* türleri, *C.leucopsis* DC. ve *C.sipyleum* O.Schwarz ve *C.eriophorum* (L.) Scop bitkisinin ikincil metabolitlerini, doymuş yağ asitlerini, antioksidan ve antikoliesteraz potansiyellerini araştırmışlardır. Spektroskopik metotlar 13 bilenen bileşiklerin yapılarının açığa kavuşmasında kullanılmıştır (p-hidroksi-benzoik asit, vanilik asit, cis-epoksikoniferil alkol, sirinjün, balanofonin, 1'-O-

metil-balanofonin, apigenin, kaemferol-3-O- $\beta$ -D-glikopiranosid, kaemferol-3- $\alpha$ -L-ramnopiranosid, taraksasterol, taraksasterol asetat,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranosid). Cis-epoksikoniferil alkol ve 1'-0-metil-balanofonin ilk kez *Cirsium* türünden izole edilmiştir.

Nazaruk ve ark.(2012) *C. palustre* ve *C. rivulare* bitkisinin uçucu yağlarının bileşimi ve onların antiproliferatif aktivitelerin, adenokarsinom hücrelerine (MCF-7 ve MDA-MBA-231) karşı incelemiştir. Bitkinin kök, yaprak ve çiçeklerinden su buharı destilasyon ile elde edilen uçucu yağlar, gaz kromatografisi kütle spektroskopisiyle (GC-MS) tanımlanmıştır. Uçucu yağların bileşimi, her bitkinin ilgili kısımlarında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. *C. palustre* (% 95.3) ve *C. rivulare* (% 92.4) bitkisinin kök yağlarında, sırasıyla, 50 ve 39 komponent tanımlanmıştır. Her iki türün yaprak yağlarında, sırasıyla 59 ve 49 bileşik sırasıyla tanımlanmıştır. Ana yapı taşları  $\beta$ -damasnon (sırasıyla % 4.1 ve % 13.4 ) ve  $\beta$ -iyonon (sırasıyla %6.7 ve %5.3)'dur. Kısa zincirli doymuş ve doymamış alifatik alkoller ve aldehitler, bileşenlerin diğer önemli grubunu oluşturmuştur (sırasıyla % 17.7 ve % 9.0). Köklerin uçucu yağları önemli derecede olmayan anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kozyra ve ark. (2009) *Cirsium vulgare* (savi.) Ten. bitkisinin uçucu yağlarının GC/MS analizini ve antimikrobiyal aktivite tayinini araştırmışlardır. Deryng aparatında su buharı destilasyon ile uçucu yağlar elde edilmiştir. Tüm tanımlanan bileşikler, onların kütle spektrumlarında bir karşılaştırmaya dayanılarak mevcut data kaynaklarıyla tanımlanmıştır. Bir çoğu uzun karbon zincirli aldehit ve ketonlardır. Az miktarda terpenlerde ( $\beta$ -linalool,  $\beta$ -siklositrol, eugenol, geraniolun asetat) tayin edilmiştir. Ayrıca 20 mg/mL konsantrasyondaki uçucu yağ, çalışılan bakteri ve maya türüne karşı (gram-pozitif ve gram-negatif) aktivite göstermemiştir.

İki devedikeni türü; *C. creticum* (Lam.)D'Urv. ssp. *Triumfetti* (Lacaita) Werner ve *Carduus nutans* L.'nin bileşimi ve alelopatik etkileri Formisano ve ark.(2007) tarafından incelenmiştir. Bitkilerde tespit edilen, uçucu bileşenler ve miktarları Tablo 2.1'de sunulmaktadır. *Cirsium creticum*'un uçucu yağında 56 madde tanımlanmıştır. Yağlar farklı alelopatik aktivite göstermiştir, *C. creticum Triumfetti*'nin uçucu yağları, *Carduus nutans*'tan daha kuvvetli alelopatik etki göstermiştir.

**Tablo 2.1** *C.creticum* ssp.*Triumfetti* (Cc) ve *Carduus nutans* ' ın (Cn) uçucu yağ bileşenleri

R <sub>i</sub> <sup>a</sup>	R <sub>i</sub> <sup>b</sup>	Bileşen	% Cc	% Cn	R <sub>i</sub> <sup>a</sup>	R <sub>i</sub> <sup>b</sup>	Bileşen	% Cc	% Cn
863		(Z)-3-Heksenol		0.1	1437	1628	Aromadendrene	0.5	
961		Benzaldehit	t		1449	1625	Widdrene	1.4	
979		1-Okten-3-ol		t	1451	1868	(Z)-Geranil aseton	1.8	0.6
1048	1663	Fenilasetaldehit	2.7	2.4	1452	1673	(E)-β-Farnesen	0.4	0.9
1087		Gayakolun		0.1	1455		α-Humulen		0.1
1098	1553	Linalol		1.4	1477		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub>	0.2	
1104	1398	Nonanal	1.5	2.6	1482	1957	(E)-β-İyonon	2.6	
1113		2-Feniletanol		1.0	1486	2354	Dihidroaktinidiyolit	6.0	1.8
1134	1637	4-ketoizoforon	0.3		1492	1741	Valensen	0.1	
1158	1548	(E)-2-Nonenal	0.5	0.7	1500	1500	Pentadekan	0.6	0.3
1183	1856	p-Siyemen-8-ol		1.1	1508	1812	Tridekanal	1.2	0.8
1189	1706	α-Terpinol	1.9		1523		Megastigmatrienon	0.4	
1201	1243	2-Pentil furan	0.3	1.3	1560		(E)-Nerolidol		0.2
1200	1200	Dodekan		0.7	1566	2503	Dodekanoik asit	0.3	2.4
1206	1510	Dekanol	1.6	0.7	1580	2150	Karyofillen oksit		0.6
1208		α-İyonon	0.3	0.4	1590	2512	Benzofenon	2.7	
1235		Geraniol		0.4	1592		2,6-Diizopropilnaftalen	0.9	
1264	2035	4-Etil gayakolun	15.0	1.7	1600	1600	Hekzadekan	0.6	0.2
1276	1465	Eucarvone	0.4		1618	1935	Tetradekanal		0.8
1278	2190	Nonanoik asit	1.9		1648		Kamferenon	0.3	
1290	2471	İndol	0.2	1.2	1743	2348	(E,Z)-Farnesol	1.5	
1295		Undekan-2-on		0.4	1768	2672	Tetradekanoik asit	0.4	0.2
1296		Dihidroedulan I	t	0.6	1778		Fenantren	0.3	
1298	2239	Karvakrol	1.9		1815	2138	Hekzadekanol		0.7
1304	1797	p-Metoksiasetofenon	0.5	0.5	1835	2131	Hekzahidrofarnesil aseton	3.9	7.8
1312	2180	4-vinil gayakol	4.5	5.8	1873	2740	Pentadekanoik asit	0.1	2.2
1313	1827	(E,E)-2,4-Dekadienal	0.3		1925		Hekzadekanoik asit metil ester		t
1323		C <sub>13</sub> H <sub>18</sub>	1.1		1957	2931	Hekzadekanoik asit	10.6	18.6
1343		Dehidroiyonon	1.2		2035	2387	Oktadekanal		3.2
1353	2186	Eugenol	1.7	3.6	2073	2975	Heptadekanoik asit	0.4	
1356		α-Longipinene		0.4	2120		(Z)-9-Oktadesenoik asit	0.8	1.6
1382	1838	(E)-β-Damasnon	7.8	1.2	2122	3157	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienoik asit		0.8
1400		Tetradekan		0.3	2172	3402	Oktadekanoik asit	0.4	0.2
1410	1538	İtalicene	1.7		2300	2300	Trikozan	t	2.1
1413		α-Cedrenos		0.1	2400	2400	Tetrakozan		0.6
1415	1612	Karyofillen		2.2	2500	2500	Pentakozan	1.1	3.8
2600	2600	Hekzakozan	0.3	0.7	2900	2900	Nonakozan	3.1	2.8
2700	2700	Heptakozan	2.4	5.9	3000		Trikontan	0.2	
2800	2800	Oktakozan	0.8	0.8	3100	3100	Hentriakontane	1.1	

R<sub>i</sub>: Alıkonma endeksi, R<sub>i</sub><sup>a</sup> : HP-5MS kolonundaki alıkonma endeksi, R<sub>i</sub><sup>b</sup> : Innowax kolonundaki alıkonma endeksi, t = iz, 0.05'den az

### 2.1.5. *Cirsium* Türlerinde Antifungal/Antimikrobiyal Tayini ile İlgili Yapılan Çalışmalar

*C. rivulare* bitkisinin çiçek ve yapraklarından elde edilen su, metanol ve %70'lik etanol ekstraktları *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterileri ile *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri için yapılan çalışmada, tüm ekstraktların bakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Nazaruk ve Jakoniuk (2005)). Yaprakların su ekstraktlarında ve gram pozitif bakterilere karşı en yüksek aktivite tespit edilmiştir.

5 *Cirsium* türünün (*C. arvense*, *C. oleraceum*, *C. palustre*, *C. rivulare* ve *C. vulgare*) metanol ekstraktlarında, *S. aureus*, *B. subtilis*, ve *P. aeruginosa* mikroorganizmalarının her biri için antimikrobiyal aktivite araştırılmıştır (Borawska ve arkadaşları (2010)). Elde edilen ekstraktlarda minimum inhibisyon (MİK) konsantrasyonları, ekstraktların gram pozitif bakteriler üzerine (1.56–25.0 mg/mL), gram negatif bakterilerden (12.5–50.0 mg/mL) daha yüksek inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir.

*C. arvense* bitkisinin, n-hekzan, kloroform, etilasetat ve n-bütanol ekstraktlarında, *S. aureus* ve *M. luteus* gram pozitif mikroorganizmayla ve *E. coli*, *E. pseudomonas*, *E. aeruginosa*, *Enterobacter* ile *K. pneumoniae* olmak üzere dört gram negatif mikroorganizma üzerinde, antifungal ve antibakteriyel aktivite araştırılmıştır. Bulunan MİK değerleri göz önünde bulundurulduğunda, en aktif ekstrenin kloroform olduğu tespit edilmiştir (Khan ve arkadaşları (2011)).

*C. arvense*, *C. vulgare* ve *C. palustre* bitkileri etanol ile ekstrakte edilmiş ve ekstraktlarda antimikrobiyal aktivite tayini çalışılmıştır. MİK değerleri gram pozitif mikroorganizmaları için hesaplandığında 187.5 ila 365 mg/mL arasında bulunurken; gram negatif mikroorganizmalar (*E. coli* ve *S. typhimurium*) üzerinde de *C. palustre* bitkisinin en iyi aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kenny ve arkadaşları (2014)).

### 2.2. Uçucu Yağlar ve Özellikleri

Uçucu yağlar genellikle renksiz ya da çok açık sarı renkli olan, uçucu ve oda sıcaklığında da sıvı halde olan, bitkilerin meyve, kabuk, yaprak ya da kök kısımlarından elde edilen, kokusu kuvvetli olan doğal ürünlerdir. Kokularının güzel olmasından dolayı da eterik yağ veya esans olarak da adlandırılmaktadır. Sabit yağlardan farklıdır, su ile karışmazlar (Cellat 2011).

Bitkilerin bir çoğunun kendine özgü kokularının olması içermiş oldukları uçucu yağdan kaynaklanmaktadır. Uçucu yağların bir çoğu güzel kokuludur, bu özelliğinden dolayı esans olarak da adlandırılır. Su ile karışmadığından ve suyun yüzeyinde tabaka

oluşturduğundan yağ olarak da isimlendirilmektedir. Sabit yağlarla kıyaslandığında aralarında önemli farklılıklar vardır. Örneğin; sabit yağlar, su buharında sürüklenmemekteyken uçucu yağlar su buharı ile sürüklenmekte, süzgeç kağıdı üzerinde sabit yağlar kalıcı leke bırakırken uçucu yağlar süzgeç kağıdı üzerinde sabit yağlar gibi kalıcı leke bırakmamaktadır. Sabit yağ ve uçucu yağ arasında ki bir diğer önemli farklılık ise uçucu yağların sulu etanolde çözünebilme özelliğidir (Ceylan 1997).

Uçucu yağların kimyasal yapılarının en büyük bölümü terpenlerden meydana gelmektedir. Ayrıca az miktarda aldehit, azot, ester, alkol, fenol ve kükürt içeren bileşiklerde bulunmaktadır. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler tat, koku ve terapötik özellikteki maddelerdir (Linskens ve Jackson 1997).

Uçucu yağların koku ve tat endüstrilerinde önemli bir yeri vardır. Yaygın olarak kozmetik, gıda, ilaç ve temizlik ürünlerinde kullanılmaktadır. İlaç endüstrisindeki kullanımı gittikçe artan; antifungal, antiviral, sedatif, analjezik gibi etkileri de bulunmaktadır. Uçucu yağların ortak özelliği antibiyotik, dezenfekte edici, bağışıklık sistemini güçlendirici etkileridir (Cellat 2011).

Uçucu yağ üretimi gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yapılmaktadır. Ülkemiz uçucu yağ içeren bitkiler bakımından oldukça zengin bir floraya sahip olmasına rağmen, gül dışındaki uçucu yağ bitkilerinin üretim alanları bulunmamaktadır (Tanker 1976, Ceylan 1997).

### **2.3. Uçucu Yağların Sınıflandırılması**

Uçucu yağlar kimyasal bileşimleri, aromatik özellikleri, farmakolojik ve terapötik etkilerine göre sınıflandırılabilir (Ceylan 1997).

#### **2.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerine Göre Sınıflandırılması**

Kimyasal bileşimlerine göre sınıflandırdığımızda uçucu yağları terpenik maddeler, aromatik maddeler, azot ve kükürt taşıyan bileşikler ve düz zincirli hidrokarbonlar olmak üzere 4 grup altında toplayabiliriz (Guenther ve ark. 1967).

##### **2.3.1.1. Terpenler**

Uçucu yağların yaklaşık %90'ını terpenik maddelerden oluşurken, terpenik maddelerde uçucu yağların içinde mono, seski ve diterpen olmak üzere 3 gruba ayrılır. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler, uçucu yağların kendine özgü kokusunu, tadını ve terapötik özelliğini verdiği için, uçucu yağ içeren bitkilerde

incelendiğinde içerdikleri oksijenli bileşikler değerlendirilir. Her ne kadar terpenlerin kokuları varsa da oksijenli bileşiklerle kıyaslandığında sahip oldukları kokunun tümüne olan etkileri oldukça azdır (Boydağ 2004).

Terpenler, izopropen birimleri ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) den oluşmaktadır ve izopropen birimleri iki doymamış bağ içeren ve 5 karbon taşıyan birimlerdir.

**Monoterpenler ( $\text{C}_{10}$ ):** İki izopropen ünitesinden oluşan  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$  molekülüne sahip bileşikler olup yaygın olarak bitki aleminde bulunurlar. Gıda ve parfümeri maddelerinde koku verici olarak kullanılan monoterpenler 3 alt grup altında toplanabilir. Bu 3 alt grup; etken maddesi asiklik olan monoterpen türevleri, monosiklik monoterpen türevleri ve bisiklik olan monoterpen türevleridir.

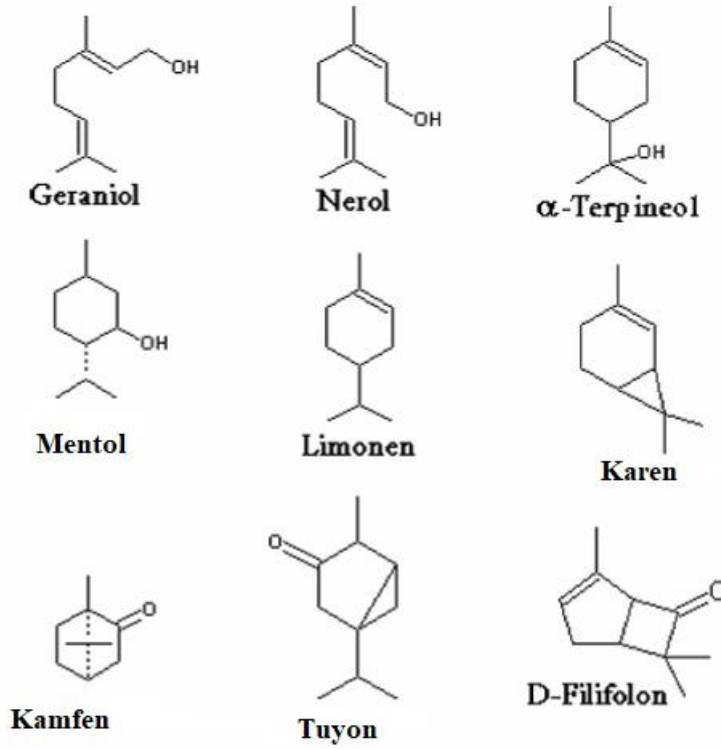
**Tablo 2.2.** Bazı bitkilerde bulunan monoterpenler sınıfları

Asiklik Monoterpen Türevleri	Monosiklik Monoterpen Türevleri	Bisiklik Monoterpen Türevleri
Gül, bergamut, limon safran vb.	Nane, kimyon, defne vb.	Pelin otu, kuş dili, solucan otu vb.

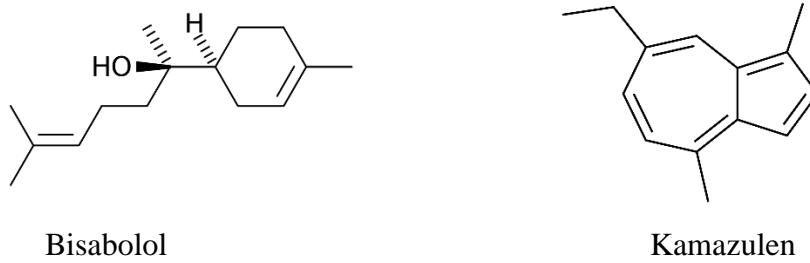
**Seskiterpenler ( $\text{C}_{15}$ ):** 3 izopropen ünitesinden oluşmakta olup,  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  molekülüne sahip olan bu bileşikler terpenoitlerin en geniş sınıfını oluşturmaktadırlar. Özellikle ilaç ve tat bileşimi olarak büyük değeri olan seskiterpenler, asiklik, monosiklik ve trisiklik terpenler olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır. Örnek olarak bisabolol, kamazulen verilebilir (Connolly ve Hill 1991, Devon 1972, Djerassi 1994a, Djerassi 1994b, Fischer 1990) (Şekil 2.3).

**Diterpenler ( $\text{C}_{20}$ ) ve Triterpenler ( $\text{C}_{30}$ ):** Diterpenler daha az uçucu olup, triterpenler ve steroller uçucu olmayan terpenlerdir. (Heath 1981). Terpenik ve aromatik maddelerin oksijenli veya oksijensiz türevlerinden bir çoğu bir uçucu yağda karışım halinde bulunurken, oksijensiz olanlar genellikle kolay uçucu maddelerdir. Terpenlerin oksitlenmesiyle oluşan oksijenli türevler, uçucu yağın kendisine özgü kokusunu, terapötik özelliğini ve tadının özelliğini belirler.





Şekil 2.2 Uçucu yağlar içerisinde bulunan bazı monoterpenlerin kimyasal yapıları



Şekil 2.3 Bisabolol ve kamazulenin kimyasal yapıları

Uçucu yağların yapısında hidrokarbonlar, alkoller, aldehytler, ketonlar, fenol ve fenol eterleri, kinonlar, asitler, esterler, laktonlar, furan türevleri, oksitler ile azot ve kükürt içeren bileşiklerde bulunmaktadır (Guenther, 1948)

### 2.3.2. Uçucu Yağların Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre gruplandırıldığında üçe ayrılmaktadır. Bunlar;

- Çok kokulu ve tadı iyi olanlar (Aromatika),

- Kokulu ve tadı acı olanlar (Aromatika-aroma),
- Kokulu ve tadı keskin olanlar (Aromatika-acria) (Cellat 2011).

### **2.3.3. Farmakolojik ve Terapötik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması**

Terapötik etki ve farmakolojik olarak sınıflandırıldığında bu grupta yer alan uçucu yağlar genellikle tedavi amaçlıdır. Bu grupta yer alan uçucu yağlar alternatif tıbbın önem kazanmasıyla önemleri artmıştır (Ceylan 1997). Farmakolojik etkilerine göre de uçucu yağlar, antiromatizmal, öksürük kesici, idrar söktürücü, iltihap azaltan, dezenfektan vs. gibi gruplandırmaya tabi tutulurlar.

### **2.4.Uçucu Yağların Eldesi**

Uçucu yağlar bitkilerden, ısı ve suya hassasiyetleri, yoğunlukları ve sudaki çözünürlüklerine bağlı olarak farklı yöntemlerle elde edilmektedir (Kulkarni ve ark.1982, Lawrence 1995, Wijesejera 1990).

Doğal bitkisel ürünler göz önüne alındığında, materyali ekstraksiyon öncesi bitkinin seçimi, toplanması, tanımlanması, kuruma ve öğütme gibi bir takım hazırlık basamaklarından geçmektedir (Sarker ve ark. 2006). Genellikle toz hale getirilen kuru materyaller, yaprak vb. organları kullanılan taze bitkiler alkol gibi bir çözücüyle maserasyon uygulanır ve homojenize edilmiş olur (Wijesejera 1991).

Uçucu yağ eldesinde uygulanmakta olan yöntemler, sıkma, ekstraksiyon ve distilasyondur.

#### **2.4.1. Distilasyon Yöntemi**

Distilasyon, kaynama noktası veya uçuculuk farkı olan iki veya daha fazla sıvının bileşenlerine ayırma işlemidir. Uçuculukları birbirinden farklı olan bileşenleri karışım içerisinde bu yöntem ile ayrılmasıdır (Mujtaba 2004).

Uçucu bileşiklerin su buharı ile sürüklenebilme özelliklerinden yararlanılarak distilasyonla elde edilmeleri mümkündür ve uçucu yağların eldesinde kullanılan yöntemler, su distilasyonu, buhar distilasyonu, su-buhar distilasyonu, kuru distilasyon ve hidrodiffüzyondur.

Distilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağlar, az miktarda kaynama noktası yüksek ve suda çözünen bileşikler içermekte ve yüksek oranda kaynama noktası olan düşük bileşiklerdir.

#### **2.4.1.1. Su Distilasyon**

Su distilasyonu, bilinen en eski ve yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntem olmakla birlikte, ısıtma ile bozulmayan, kuru ve taze bitkisel materyale uygulanmakta olan bir metottur. Bu metotta, bitki materyalinin üstünü örtecek kadar su eklenip, ısıtılır ve kaynama sırasında buhar ile uçucu yağ sürüklenir. Bu metotta bitki her zaman su ile direkt temas halindedir. Sürüklenen uçucu yağ soğutucuda kondanse olup toplama kabına gelen uçucu yağ, yoğunluk farkından dolayı genelde suyun üstünde birikmektedir.

Elde edilen uçucu yağ miktarı volumetrik olarak ifade edilmektedir. Bu yöntem kök ya da odun gibi toz halindeki materyallere uygulandığında en iyi sonucu vermektedir (Başer ve ark. 1998).

#### **2.4.1.2. Buhar Distilasyonu**

Bu metot en yaygın olan metotlardan biri olup bitki materyali kazandaki ızgara üzerine yüklenir. Izgara altına yerleştirilmiş delikli buhar halkaları yardımıyla da başka bir yerde üretilmiş doymuş su buharı bitki içerisine püskürtülür. Uçucu yağ hücre zarı içerisinde sulu çözeltiye difüzyonundan sonra ise buharlaşıp yükselen buharla taşınmaktadır. Bu yüzden yağın tamamıyla distile edilebilmesi için buhar içinde belli bir miktarda nemin bulunması gerekmektedir.

Buhar distilasyonu yönteminde ayrıca buharın hızı ve ısı kontrol altında tutulabilir. Sıcaklıkla bozulabilen ve kolayca hidrolize olabilen bileşikleri içeren bitkisel materyallere uygulanabilen, büyük ölçüde en çok tercih edilmekte olan uçucu yağ üretim metodudur (Thapa 1989, Wijesekera 1993, Lawrence 1995, Boydağ 2004).

#### **2.4.1.3. Su-Buhar Distilasyonu**

Materyal, kazanların alt kısmında su bulunan ızgaralar üzerine yerleştirilir ve başka bir kaynaktan üretilen su buharı kazana gönderilerek kaynamanın olması sağlanır. Su buharıyla sürüklenen uçucu yağ ve su toplama kabında birikirken, kazanın alt kısmından da sulu ekstre elde edilmiş olunur. Çok gelişmeyen teknolojilerde ve arazide yapılmakta olan distilasyonlar

da bu metot kullanılmaktadır. Su buhar distilasyonu buhar distilasyonu kadar verimli olmamaktadır (Başer ve ark. 1998).

#### **2.4.1.4. Hidrodifüzyon**

Bitkisel dokulardaki uçucu yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken bir kısmı da iç dokularda bulunduğu için distilasyon sırasında buhar kuru hücre membranına tam olarak nüfuz etmeyebilir. Uçucu yağ eğer yüzeye yakın olmayan bölgelerde ise difüzyondan sonra yüzeye ulaşır, böylece buhar ile sürüklenmiş olur.

Bu yöntemle elde edilmekte olan uçucu yağ miktarı yüksek olmakla birlikte suda çözünen maddelerin ya da sabit yağların uçucu yağa geçmesi nedeniyle endüstriyel kullanımına çok fazla rastlanmamaktadır (Başer ve ark. 1998).

#### **2.4.2. Ekstraksiyon**

Uçucu yağların eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri; organik çözücü ile ekstraksiyon, sabit yağ ile ekstraksiyon ve sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyondur.

##### **2.4.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon**

Uçucu yağ içeren, drog, benzen, heksan ve heptan gibi uygun bir çözücü ile ekste edildiğinde uçucu yağ, sabit yağ, mum ve boya maddeleri organik çözücüye geçmektedir. Organik çözücünün alçak basınçta uçurulmasıyla birlikte elde edilen ürün, Konkret olarak adlandırılmaktadır. Konkret'ten uçucu bileşikleri almak için etanolle tüketilir. Etanollü ekstrenin soğutulmasıyla da içinde çözünmeyen maddeler çöktürülerek ayrılmaktadır (Başer ve ark. 1998).

##### **2.4.2.2. Sabit Yağ ile Ekstraksiyon**

Bu yöntem, uçucu yağ miktarının az olduğu ve diğer distilasyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda kokusuz, renksiz ve yumuşak bir sabit yağ uçucu yağ eldesinde kullanılmakta ve en çok da saf domuz yağında uygulanmaktadır (Başer ve ark. 1998).

##### **2.4.2.3. Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon**

Bu yöntemde çözücü olarak en çok CO<sub>2</sub> kullanılmakta ve işlem sıvılaştırılmış gazların, kritik noktası civarında (73 kg/cm<sup>2</sup> basınç ve 31°C sıcaklıkta), yüksek basınçlı ekstraksiyon kabında drog üzerinden sirkülasyonu ile yapılır. Çözücü gaz, ekstreden basıncın değişmesi

veya buharlaştırılmasıyla uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu metotla elde edilen ürün çözücü artığı taşımamasından dolayı oldukça değerlidir ve sisteminin kurulması maliyetli olduğundan pahalı ürünlerin eldesinde kullanılması tercih edilmektedir (Başer ve ark. 1998).

### **2.4.3. Sıkma**

Narenciye kabukları gibi diğer distilasyon yöntemleri ile bozulan materyallerin preslenmesinde sıkma veya benzeri mekanik yollar gerçekleştirilir. Sıkışmış kabukların su ile yıkanması sonucu ayrılan su-yağ emülsiyonu da bir kaptan toplanır ve bu emülsiyonun santrifüj edilmesiyle de uçucu yağlar elde edilmektedir (Başer ve ark. 1998).

## **2.5. Kromatografi**

Kromatografi bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı-mobil) bir faz yardımıyla sabit (durgun-adsorban) bir faz arasından bu fazlar arasındaki farklı etkileşimlerinden dolayı değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanarak bileşenlerin birbirlerinden ayrılması yöntemidir. Kromatografi esas olarak, durgun faz tarafından kuvvetle tutulan numune bileşenlerinin, hareketli fazın akısıyla çok yavaş hareket etmesi ve fakat durgun faz tarafından zayıfça tutulan numune bileşenlerinin hızlı hareket etmesiyle ayrımın sağlanmasıdır. Böylece numune bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif tayin edilebilirler (Tonbul 2015).

Kromatografi ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine göre ve faz tiplerine göre sınıflandırılmaktadır.

### **1. Ayrılma Mekanizmalarına Göre**

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinité kromatografisi

### **2. Uygulama Biçimine Göre**

- Düzlemsel kromatografi
- Kağıt kromatografisi

- İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
- Gaz kromatografisi (GC)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

### 3. Faz Tiplerine Göre

- Sıvı kromatografisi
- Sıvı-Katı kromatografisi
- Sıvı-Sıvı kromatografisi
- Gaz kromatografisi
- Gaz-Katı kromatografisi
- Gaz-Sıvı kromatografisi

#### 2.5.1. Gaz Kromatografisi

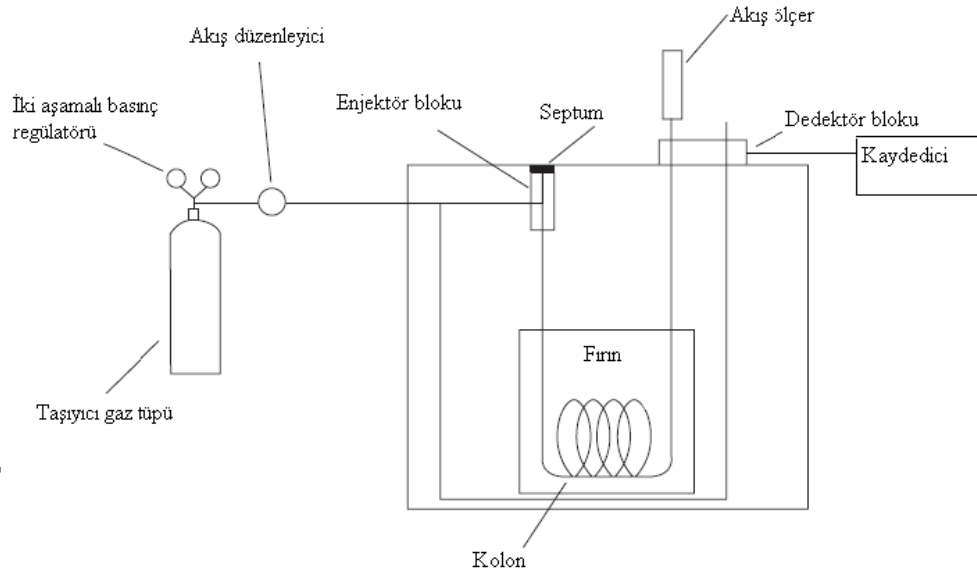
Kromatografik ayırmalarda örnek gaz, sıvı veya süperkritik akışkan olan bir mobil fazda çözülür. Bu mobil faz kendisiyle karışmayan (çözünmeyen, reaksiyon vermeyen), bir kolon içine veya katı yüzey üzerine yerleştirilmiş olan bir sabit fazda harekete zorlanır. Örnek bileşenleri sabit ve mobil fazlarda farklı derecede dağılım gösterirler. Bileşenler sabit faz üzerinde alıkonurlarken mobil faz akışıyla yavaşça hareket ederler. Böylece sabit faz tarafından zayıf tutulan bileşenler daha hızlı hareket ederler. Sonuç olarak hareket hızındaki bu farklılıktan dolayı örnek bileşenleri kalitatif veya kantitatif analiz edilebilecek bantlara ayrılırlar. Yöntemin basit oluşu, çalışma kolaylığı ve zamandan tasarruf sağlaması yönünden klasik ayırma yöntemlerine göre üstünlük sağlamaktadır. Kromatografik yöntemlerle kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkün olmaktadır. Fiziksel bir ayırma yöntemi olan kromatografinin diğer bir avantajı karışımdan hiçbir maddenin kaybolmaması ve yeni bir maddenin kimyasal reaksiyonlarla oluşmamasıdır (Şahin 2016).

Bir maddenin gaz kromatografi cihazıyla analizinin yapılabilmesi için;

- a- Molekül yapısının sıcaklığa dayanıklı olması, sıcaklıkla bozunmaması,
- b- Maddenin buharlaşabilir olması,
- c- Molekül ağırlığının  $< 400$  amu olması,
- d- Gaz fazda stabil olması ve taşıyıcı gazlarla reaksiyona girmemesi,
- e- Analiz edilen diğer maddelerle reaksiyona girmemesi gerekmektedir.

Gaz kromatografi cihazlarının çalışma prensipleri şu şekildedir;

1. Analiz edilecek numunenin uygun numune hazırlama yöntemlerine göre hazırlanarak cam viallere alınması ve cam viallerin cihaz üzerinde belirlenen kısma yerleştirilmesi,
2. Cihazın hangi numuneyi hangi metotta ve hangi hacimde çalışacağını belirten çalışma tablosunun yazılması,
3. Numune vialinden belirlenen miktarda numunenin otoenjektör vasıtasıyla alınması ve enjeksiyon bloğuna gönderilmesi,
4. Enjeksiyon bloğunda sıcaklıkla numunenin buharlaştırılması, gerekirse tercihe göre numunenin tamamının (splitless) veya bir kısmının (split) taşıyıcı gaz yardımıyla kapiler kolona taşınması ve elüsyon işleminin başlaması,
5. Numune bileşenlerinin kolonda tutunmalarına göre ilerleyerek (her bileşen partiyon katsayısı  $K'$ 'ya bağlı olarak farklı hızlarda hareket edecektir) dedektöre ulaşması ve dedektör sinyallerinin kaydediciye iletilerek pik yüksekliği veya pik alanı olarak kaydedilmesi, enjeksiyon başlangıcından dedektör sinyalinin kaydedilmesine kadar geçen zaman o bileşen için tutunma zamanı (retention time,  $t_R$ ) olarak kaydedilmektedir. Gaz kromatografi cihazlarında tutunma zamanlarına göre kalitatif analiz, pik alanları veya yüksekliklerine göre de kantitatif analizler yapılabilmektedir. Şekil de gaz kromatografi cihazının bileşenleri gösterilmiştir (Şahin 2016)



Şekil 2.4 Gaz kromatografi cihazının bölümleri

### 2.5.1.1. Taşıyıcı Gaz

Gaz kromatografisinde mobil faz taşıyıcı gaz olarak adlandırılmaktadır. Taşıyıcı gaz inert olmalıdır. Taşıyıcı gaz olarak argon, azot ve hidrojen de kullanılabilmesine rağmen en

yaygın olarak helyum kullanılmaktadır. Taşıyıcı gaz olarak helyum tercih edilmesinin nedeni hidrojen gibi potansiyel patlama tehlikesinin olmaması ve diğer taşıyıcı gazlara göre hassasiyet düşmesine sebep olmamasıdır. Gaz kromatografi cihazlarında kullanılan bütün gazlar cihaza girmeden önce gaz filtrelerinden (moleküler elek) geçirilmelidir.

Taşıyıcı gaz akış hızı gaz kromatografi cihazlarında sabit akış (constantflow) ve sabit basınç (constantpressure) olmak üzere 2 farklı şekilde ayarlanabilmektedir. Basınç-akış değişikliği kullanıcı tarafından programlanmasına rağmen fırın programındaki sıcaklık değişiklikleri nedeniyle sabit basınç altında akışın devamlı değişiklik göstermesi nedeniyle sabit akış modunda çalışma daha çok tercih edilmektedir (Şahin 2016).

### **2.5.1.2. Numune Girişi**

Gaz kromatografi cihazlarında numune cihaz üzerine monte edilmiş bir otoenjektör vasıtasıyla enjeksiyon bloğuna gönderilir. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı numunedeki en az uçucu bileşenin kaynama noktasının en az 50 °C üzerinde olması ayrıca kolon girişinde yoğunlaşmaya sebep olmamak için metot başlangıç sıcaklığından düşük olması gerekmektedir. Numune enjeksiyon bloğunun içinde sıcaklıkla buharlaşır, taşıyıcı gazla seyreltilir ve kolona girer. Yüksek kolon verimi ve numuneden numuneye taşınmanın engellenmesi açısından kolona giren numune miktarı önemlidir. Numune miktarının fazla olması ve/veya yavaş enjekte edilmesi (manuel enjeksiyonlarda) bant genişlemesine ve ayrılmanın iyi olmamasına sebep olabilir. Çalışılan numunenin konsantrasyonuna göre bir kısmının (split) veya tamamının (splitless) cihaza enjekte edilmesi gerekebilir. Cihaz üzerindeki yazılım vasıtasıyla metotlarda bu tür tercihler analiz başlangıcında yapılabilir (Şahin 2016).

### **2.5.1.3. Kromatografik Kolon**

Gaz kromatografi cihazlarında dolgulu ve kılcal (kapiler) olmak üzere 2 çeşit kolon kullanılmaktadır. Günümüzde daha çok kapiler kolonlar tercih edilmektedir. Kolon yapımında çoğunlukla paslanmaz çelik ve ergitilmiş silis, nadiren de cam ve teflon kullanılır. Kolonlar kolon fırınlarına sığmaları için bobinler halinde sarılır. Kolonların sabit fazı katı veya katı yüzeyine emdirilmiş bir sıvı olabilir. Kullanılan kolon tipine göre gaz kromatografisi gaz-katı kromatografisi(sabit faz katı) ve gaz-sıvı kromatografisi (sabit faz sıvı) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şahin 2016).



**1-Gaz-katı kromatografisi:** Sabit faz olarak silikajel, alümina veya aktif kömür gibi maddelerin kullanıldığı, zayıf adsorbsiyon prensibine dayalı bu yöntemde birbirinden ayrılması zor ve kuyruklu pikler elde edilir. Bu yöntem daha çok küçük moleküllü maddelerin ayrılmasında kullanılır.

**2-Gaz-Sıvı kromatografisi:** Bu yöntemde kolon çapı 0,3-0,5 mm olan kapiler kolonlar kullanılır. Bu kolonlarda gözenekli bir katı faz üzerine emdirilmiş büyük moleküllü özel bir sıvı faz bulunmaktadır. Sabit fazı veya dolgu maddesi özel bir sıvı ile kaplanmış kolonlar SCOT (supportcoatedopentubuler), iç yüzeyi özel bir sıvı ile kaplanmış kolonlar WCOT (wallcoatedopentubuler) olarak adlandırılmaktadır. WCOT kolonlar içleri boş ve açık uçlu kolonlardır. Kolonların iç yüzeyleri büyük moleküllü özel bir sıvı ile kaplıdır. Bu kolonlar bakır, alüminyum, paslanmaz çelik veya camdan yapılabilmektedir (Şahin 2016).

Kaynama noktası geniş bir aralıkta seyreden bileşenler için kolon fırınlarının sıcaklık programlanabilir olması gerekmektedir. Bu durumda ayrılma devam ederken sıcaklık sürekli olarak veya basamaklı olarak değiştirilebilir. Kapiler kolonlarla çalışırken kolon içinde gaz akışı yokken fırına yüksek sıcaklıklar vermemek ve cihazın çalışmadığı durumlarda kolonun belli bir kondüsyonda düşüğe olsa gaz akışı olacak şekilde bekletilmesi tekrarlanabilir sonuçlar almak açısından önemlidir. Bu uygulama aynı zamanda kolon ömrünü de uzatmaktadır. Gaz kromatografi cihazlarında numune miktarı, kolon uzunluğu, çalışılan numuneye uygun kolon dolgu maddesi, sıcaklık programı, taşıyıcı gaz, taşıyıcı gaz akış hızı uygun bir şekilde seçilerek tatmin edici bir ayırma elde etmek mümkündür (Şahin 2016).

#### **2.5.1.4. Sıcaklığın Etkisi ve Kontrolü**

Gaz kromatografisinde amaç numune bileşenlerinin kolon boyunca gaz fazında ilerlemesidir. Kaynama noktası en yüksek olan bileşenin taşıyıcı gaz içinde süratle buharlaşmasına imkan vermek için kolon sıcaklığının yeteri kadar yüksek olması gerekmektedir. Sıcaklık yeteri kadar yüksek değilse numune kolondan geçerken çok yavaş hareket edecek bu da analiz zamanının yükselmesine, piklerin genişlemesine ve hassasiyetin düşmesine sebep olacaktır. Eğer kolon sıcaklığı çok yüksek olursa numune bileşenleri kolonu hızlıca terk edecek ve uygun bir ayrılma sağlanamayacaktır. Kolon sıcaklığını geniş bir aralık içinde ayarlayabilmek ve kontrol edebilmek bu sebeple çok önemlidir. Kaynama noktası geniş bir aralıkta değişen bileşenler için genellikle sıcaklık programlaması (gradient, kademeli) yapılarak piklerin daha iyi ayrılması sağlanabilir. Bu durumda ayrılma sürerken sıcaklık sürekli olarak veya basamaklar halinde arttırılır.

İzotermal çalışmalarda fırın sıcaklığı analiz boyunca sabit tutulmakta ve geç çıkan piklerde yüksek pik genişlemesi görülmektedir. Sıcaklık programı uygulandığında daha kısa süreli analizlerde daha düzgün pikler elde edilebilirken artan kolon kanamasıyla baseline kaymaları görülebilmektedir (Şahin 2016).

#### 2.5.1.5. Gaz Kromatografi Dedektörleri

Dedektör kolonda ayrılan bileşenleri algılayan ve onları elektronik sinyallere dönüştüren elektronik birimdir. İdeal bir dedektör ilgilenilen maddelere karşı yeterince hassas, stabil ve tekrarlanabilirliği iyi olmalıdır. Çalışılacak madde konsantrasyonları için yeterli bir lineer aralıkta çalışabilmelidir. Oda sıcaklığından 400°C ye kadar çalışabilmelidir. Akış hızından bağımsız olarak algı-cevap süresi kısa olmalıdır. Geniş bir aralıkta maddeye karşı hassas olmalı ve örnekten olumsuz etkilenmemelidir. Uygulandıkları numune tiplerine göre gaz kromatografidedektörleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir (Şahin 2016).

**Tablo.2.3.** Gaz kromatografidedektörlerinin uygulandığı numune tipleri(Skoog&Leary 1992)

Dedektör tipi	Uygulanan numuneler
Alev iyonlaşma(FID)	Hidrokarbonlar
Termal iletkenlik(TCD)	Her tip bileşik
Elektron yakalama(ECD)	Halojenli bileşikler
Kütle spektrometre(MS)	Her tür için ayarlanabilir
Termiyonik(NPD)	Azot ve fosfor bileşikleri
Elektrolitik iletkenlik(Hall)	Halojen,kükürt veya azot içeren bileşikler
Fotoiyonlaşma	UV ışınıyla iyonlaşan bileşikler
Fourier dönüşümlü IR(FTIR)	Organik bileşikler

Alev iyonlaşma dedektörü gaz kromatografide en yaygın ve uygulama alanı en geniş dedektörlerdendir. Kolondan gelen karışım hidrojen-hava alevine yönlendirilir. Organik bileşiklerin çoğu bu alevde piroliz edildiğinde elektronlar ve iyonlar üretirler. Oluşan bu elektron ve iyonlar alev boyunca elektrik iletkenliği sağlarlar.

Gaz kromatografisi / kütle spektrometresi (GC/MS), karmaşık organik ve biyokimyasal karışımların analizi için kullanılan güçlü bir sistemdir. Bu uygulamada kromatografik kolondan çıkan bileşikler için ayrı ayrı spektrumlar toplanır. Bu spektrumlar daha sonra islenmek üzere bir bilgisayarda depolanır. Kütle spektrometresi ayrıca uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin analizi için sıvı kromatografi ile de birleştirilmiştir (LC/MS).

Her iki ikili yöntemin de geliştirilmesi sırasında çözülmesi gereken en büyük problem, kromatografi sisteminde taşıyıcı gaz yada sıvı ile büyük ölçüde seyrelmenin olması yani taşıyıcı miktarının numuneye göre çok olmasıdır. Bu nedenle, numuneyi kütle spektrometreye göndermeden önce bu gaz yada sıvıyı uzaklaştırmak için yöntemler gerekir (Şahin 2016).

## **2.6. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite**

Antimikrobiyal madde, mikroorganizmaların üremesini engelleyen ve öldüren, doğal veya sentetik yolla elde edilen kimyasallar olup etkileri üremeyi durdurucu ya da öldürücü olabilmektedir. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1900'lü yıllardan itibaren araştırılmaya başlanmış ve ilaçlara alternatif olarak antimikrobiyal özellik gösteren bitkilerin araştırmacılar tarafından kullanılabilirliği belirtilmiştir (Tekerek 2013). İlaçlara alternatif olarak tıbbi bitkiler kullanılmakta olup, bazı geleneksel bitkiler de antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır.

Antifungal madde vücutta, cilt ve mukozalardaki fungal enfeksiyonlarına karşı etkili olan kimyasal maddeler olup genellikle antibakteriyel maddelere nazaran daha kuvvetli maddelerdir. Bunun nedeni ise mantarların, bakterilerin aksine belli çekirdek yapısına ve zarlı zarsız organellere sahip olmalarından kaynaklanmaktadır (Yalçın 2006).

Son yıllarda enfekte hastalıkların tedavisinde kullanılan ticari antimikrobiyal ilaçların gelişigüzel kullanımından dolayı insandaki patojenik mikroorganizmalar birçok ilaca karşı direnç geliştirmiştir. Bu durum bilim adamlarının çeşitli kaynaklardan yeni antimikrobiyal öz bulmalarını zorunlu kılmıştır (Karaman ve ark. 2003). Bugün enfekte hastalıklarla savaşta önemli bir kaynak olmaya devam eden antimikrobiyal aktiviteye sahip bitkiler hastalıkların tedavisinde modern ilaçlara bile meydan okuyabilecek özelliktedir (Yi ve ark. 2007).

Gerek aromatik gerekse tıbbi bitkilerin çeşitli yöntemlerle elde edilen özütlerinin antibakteriyel etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Bakterilerde gelişen antibiyotik dirençliliğinin önlenmesinde ilaçlara alternatif olarak bitkilerin ve bitkisel ürünlerin, bazı geleneksel antimikrobiyal olarak kullanılmaları önerilmektedir (Toroğlu 2006). İn vitro

ortamda yapılmış olan pek çok çalışmada da çeşitli bitkilerden elde edilmiş özütlerin antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Esen 2008).

Antimikrobiyal ve antifungal aktivite belirlenmesinde birçok metot kullanılmakta olup, çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi, *C. creticum* bitkisinden elde edilen 4 ekstrede (n-hekzan, metanol, etilasetat ve dietileter ekstraları) antimikrobiyal ve antifungal aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır.

## **2.6.1. Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

### **2.6.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri**

Antimikrobiyal aktivite mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitenin varlığının ve derecesinin belirlenmesiyle tayin edilir (Hacıoğlu 2005).

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan testler difüzyon ve dilüsyon yöntemleri olmak üzere iki şekilde incelenmektedir.

- Dilüsyon Yöntemi
- Difüzyon Yöntemi

#### **2.6.1.1.1. Dilüsyon yöntemi**

Bir organizmanın antibiyotiklere olan duyarlılığını tayin etmek için dilüsyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, antibiyotiklerin sıvı veya katı (agarda dilüsyon) besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmiştir. Daha sonra her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek olan bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda eklenmiştir. Deney serileri uygun sıcaklık (35-37 °C'de) ve sürede (bakterinin üremesi için yaklaşık 16-20 saat) bekletildikten sonra, sonuçlar ile bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı (minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK)) belirlenmektedir. Üremenin varlığı ya da yokluğu; antimikrobiyal maddenin kullanılan organizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olmasıyla tespit edilmektedir. Antimikrobiyal madde konsantrasyonu inhibitor konsantrasyonunun altındaysa, tüplerde süspansiyon görünüşleri bulanık olmaktadır. Antimikrobiyal madde konsantrasyonu eğer inhibitör konsantrasyonuna eşit veya yüksek ise, tüplerde süspansiyon görünüşleri berraktır (Öztürk 2009). Bir mikroorganizmanın gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) olarak adlandırılmaktadır (Bektaş 2011).

Dilüsyon yöntemi broth dilüsyon ve agar dilüsyon metodu olmak üzere iki farklı şekilde yapılmaktadır.

#### **2.6.1.1.1 Broth Dilüsyon Yöntemi**

Bu yöntem makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olmak üzere iki şekilde yapılmakta olup, her iki yöntemin prensibi de aynıdır. Mikrodilüsyon yönteminde daha az miktarlarda çalışıldığı için makrodilüsyon yöntemine göre daha ekonomiktir. Mikrodilüsyon yönteminde steril plastikten yapılmış konik veya yuvarlak tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanılırken, makrodilüsyon yönteminde 13x100 lük steril test tüpler kullanılmaktadır. Hazırlanan farklı konsantrasyondaki uçucu yağ ya da diğer antimikrobiyal madde dilüsyonlarının, belirli konsantrasyondaki mikroorganizmaya karşı etkileri incelenmektedir. Kullanılan mikroorganizmaya karşı uçucu yağın etkili konsantrasyonlarıyla; MİK ve MBK değerleri üremenin olup olmadığına göre belirlenmektedir (İşcan ve ark. 2002, Çelik E ve Çelik G 2007).

#### **2.6.1.1.2 Agar Dilüsyon Yöntemi**

Bu yöntemde uçucu yağların farklı çözücüler kullanılarak belli sıcaklıkta ve henüz katılaşmamış agarda çözündürülmesi ile farklı konsantrasyonları hazırlanmaktadır. Petri kutularına dökümden ve agarın katılaşmasından sonra farklı miktarlarda inokulum (1-100 µL), nokta ya da sürme ekim yöntemleriyle agar yüzeyine ekilmektedir. Bu yöntemde farklı ekim yöntemleri kullanılmasına rağmen, elde edilen MİK sonuçları hemen hemen aynıdır (Farag ve ark. 1989, Prudent ve ark. 1995, Pintore ve ark. 2002).

#### **2.6.1.1.2. Difüzyon Yöntemi**

Difüzyon yöntemi teknik olarak basit yöntemdir. Analiz yapılırken, analizin sonucunu etkileyecek aşağıdaki detaylara dikkat edilmelidir;

- Besiyeri saf hazırlanmalı.
- Kullanılan agarın tipi, konsantrasyonu ve petri kutusundaki kalınlığı aynı olmalı.
- Standart ve çalışılacak diğer suşların sıvı besiyerindeki süspansiyonunun bulanıklığı/konsantrasyonu standart olmalı.
- Diskler/kuyucuklar mikroorganizma ekiminden sonraki 15 dk içinde yerleştirilmeli/açılmalı.
- Petri kutuları hemen inkübe edilmelidir (Ötük 1992).

#### **2.6.1.1.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi**

Disk difüzyon yöntemi uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntem hem ucuz hem de uygulaması basittir. Yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirildiği için Kirby- Bauer adıyla da adlandırılmaktadır. Yöntemin temeli; kağıt disklere emdirilen antimikrobiyal maddenin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olmasını esas almaktadır. Bu yüzden, agarlı besiyeri üzerine, çalışılacak uygun dilüsyondaki mikroorganizma kültüründen ekim yapıp agarın bakteri süspansiyonunu emilmesi sağlanmakta, sonrasında da antimikrobiyal madde emdirilmiş steril diskler yerleştirilmektedir. Uygun sıcaklık ve inkübasyon süresi sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmesiyle yağın çalışılan mikroorganizma üzerine antimikrobiyal etkisi değerlendirilmektedir (Adıgüzel ve ark. 2005, Benli ve Yiğit 2005). Ayrıca, uçucu yağın bakteri hücre duvarına vereceği zararlanma ve hücre içerik kaybı elektron mikroskopuyla tespit edilmektedir (Burt 2004).

Bu metot, uçucu yağların antimikrobiyal etkinliğinin tespit edilmesinde uygun bir metot olsa da elde edilen sonuçların yayımlanmış verilerle karşılaştırılması için uygun bir metot değildir. Çünkü, inhibisyon zonunun çapı; diskteki antimikrobiyal maddenin miktarı ve difüzyon yeteneği, petri kutularındaki agarın kalınlığı gibi etmenlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Deans ve ark. 1993, Dorman ve Deans 2000).

#### **2.6.1.1.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi**

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi çok sayıda uçucu yağ ve/veya bakteri izolatının antimikrobiyal aktivitesinin tespitinde kullanılan yöntemdir (Deans ve ark. 1993, Dorman and Deans 2000). Bu yöntemin tekniğinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir kuyucukla test organizmasının bulunduğu uygun bir besiyeri kullanılmakta olup, besiyerin üzerine belirli çapta açılan kuyulara homojen olarak çözülmüş olan uçucu yağ karışımı eklenmektedir (Turhan 2015). Kullanılan maddenin yapısal özelliği difüze olma yüzdesini ya da süresini etkilediği için deney sonuçlarını da etkileyebilmektedir. İnkübasyon süresinin sonunda, kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında belirgin bir şekilde üremenin olmadığı inhibisyon zonları meydana gelmektedir. Oluşan bu inhibisyon zonlarının çapları ölçülüp değerlendirilir. Kuyucuklara eklenen maddelerin azalan veya artan konsantrasyonlarıyla, aktivite sonucu oluşan inhibisyon zonu çapları da doğru orantılı olarak azalmakta veya artmaktadır (Dorman ve Deans 2000).

### **2.6.1.2. Antifungal Aktivite Tayin Yöntemleri**

Antifungal aktivite tayini için kullanılan yöntemler; dilüsyon yöntemi, difüzyon yöntemi ve E test olmak üzere 3 başlık altında incelenmektedir.

#### **2.6.1.2.1. Dilüsyon Yöntemi**

Bu dilüsyon yöntemi; tüp dilüsyon ve agar dilüsyon olmak üzere iki bölümde incelenmektedir. Tüp dilüsyon testi, besiyeri miktarına ve yerine bağlı olarak ikiye ayrılmaktadır. Sıvı besiyerinde, sulandırma yöntemlerinin tüpte uygulanmasına makrodilüsyon, mikrotitrasyon plakları üzerinde uygulanması da mikrodilüsyon olarak adlandırılmaktadır (Eren 2010, Yalçın 2014).

Tüp dilüsyon yöntemiyle, antimikrobiyal maddelerin minimal inhibitör konsantrasyonu belirlenmektedir. Agar dilüsyon yönteminde, patojen eklenmiş agarlı petri kutusuna istenilen şekilde eklenen antimikrobiyal maddelerin besiyerinde diffüze olması ve diffüze olduğu alanda patojenin gelişimini engelleyip engellemediğinin belirlenmesi temel alınmaktadır (Dündar 2011).

Agar dilüsyon yönteminde, her bir patojen suşuna ait kolonilerin görülmediği en düşük antimikrobiyal maddenin konsantrasyonu, o antimikrobiyal maddenin minimum inhibitör konsantrasyonu değeri olarak kabul edilmektedir (Altun 2010).

#### **2.6.1.2.2. Difüzyon Yöntemi**

Bu yöntem disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauner) ve çukur agar difüzyon yöntemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Yalçın 2014). Disk difüzyon yöntemi, antifungal aktivitenin ölçüsü olan minimum inhibisyon konsantrasyonu yerine inhibisyon alanının ölçüldüğü metottur (Eren 2010). Bu yöntemde 6 mm çapındaki boş steril Whatman kağıtlarından yapılmış disklere, hazırlanan antimikrobiyal maddeden emdirilerek agar yüzeyine yerleştirilmesi esas alınırken, çukur agar difüzyon yönteminde antimikrobiyal maddenin agarda açılan çukurlara yerleştirilmesi esas alınır (Şimşek 2013).

#### **2.6.1.2.3. E Test Yöntemi**

Bu yöntem ticari olarak kullanılan, kantitatif antifungal duyarlılığı belirlemeye yarayan bir metottur (Direkel 2010). E test yönteminde, antifungallerin emdirildiği plastik şeritin, test edilecek mikroorganizmanın yayıldığı plağın yüzeyine yerleştirilir.

Antifungallerin besiyerine difüze edilmesiyle agar yüzeyinde mikroorganizma üremesini baskılaması sonucu oluşan zonun okunur ve minimum inhibüsyon konsantrasyon değeri belirlenir (Er 2011).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dietileter (%99.5) (Teknik)  
n-Hekzan Pure Grade (İzomerleri Karışımı) (Teknik)  
Metanol (Sigma Aldrich-24229)  
Etilasetat (Merck-1.00864.250.0)  
Mueller Hinton Broth Besiyeri (Merck-1.10293.0500)  
Sabouraud Dekstroz Agar Besiyeri (BD Difco-210950)  
RPMI-1640 (Sigma-R7509-500ML)  
MOPS (Sigma-M3183-500G)

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Terazi  
Etüv  
Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometresi  
Mc Farland Cihazı

**Evaporatör:** Çözücüyü ekstraksiyon sonrasında uçurmak için; B-491 su banyosu, R-210 rotavapor, V-700 vakum pompası ve V-855 vakum kontrol paneline sahip Buchi markalı bir cihaz kullanılmıştır.

**Densitometre:** Bakteri süspansiyonlarının yoğunluğunu bakmak için Biosan marka  $565 \pm 15$  nm dalga boyunda 0.1 McFarland hassasiyetinde 0.3-15 McFarland arasında ölçüm alabilen cihaz kullanılmıştır.

#### 3.3. Kullanılan Belirteçler ve Çözeltiler

**Mueller Hinton Broth (MHB) Hazırlanışı:** 21 gram toz besiyer distile su çözülüp, hacmi 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta steril işlemi gerçekleştirilmiştir.

**Nurient Agar Hazırlanışı:** 20 gram toz besiyer distile su ile çözülüp, hacmi 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika 1 atmosfer basınçta steril işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. Deneysel Bölüm

#### 3.4.1. Bitkinin Toplanması

*C. creticum* bitkisinin yetiştiği yerler Trakya bölgesinde yapılan arazi çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir. Yapılan arazi çalışması sonucunda, belirlenen bölgelerden *C. creticum* bitkisi Temmuz 2017 tarihinde toplanmıştır.

Bitkinin tanımlanma işlemi, Namık Kemal Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalında yapılmış olup, bitkiye Herbarium numarası verilmiştir.

*Cirsium creticum* (Lam.) d'Urv. subsp. *creticum* (Asteraceae) bitkisinin herbanyum numarası; NGBB 7230'dur.

#### 3.4.2. Bitkinin Ekstraksiyonu

*C. creticum* bitkisi toplandıktan sonra gölgede kurutulup toz haline getirilip, küçük kısımlara ayrılmıştır. Bitkinin kuru ağırlığı 583.746 gramdır. Oda koşullarında, büyük cam kavanozların içerisinde, her seferinde dört gün bekletilip, toplam dört kez maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon yapılmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi, artan polarite sırasıyla n-hekzan, dietileter, etilasetat, metanol çözücülerini kullanarak gerçekleştirilmiş ve çözücülerin de evaporatörde uçurulmasıyla ham ekstraktlar sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Cam kavanozlarda bekletilen *Cirsium creticum* bitkisi

*C. creticum* n-hekzan ekstresi: 11.241 g

*C. creticum* dietileter ekstresi: 4.035 g

*C. creticum* etilasetat ekstresi: 3.467 g

*C. creticum* metanol ekstresi: 41.155 g

### **3.4.3. *C. creticum* Bitkisinin n-Hekzan Ekstresinde GC-MS Yöntemiyle Uçucu Bileşik Tayini**

Kromatografik analiz; kütle seçici bir dedektör ile kombine edilmiş bir Hewlett-Packard HP 6890 serisi GC / MS cihazında gerçekleştirilmiştir. HP-5MS (%5 fenil metil siloksan, 30m x 250 um x 0.25 um) kapiler kolon kullanılmıştır. Helyum, 5 µL enjeksiyon hacmi ile 1.0 mL / dakika akış hızında taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Numuneler, enjeksiyondan sonra başlangıçta 180°C' de tutulan kolona verilmiş, daha sonra sıcaklık 1 dakika tutma süresi olan 80°C / dakika bir ısıtma rampası ile 250°C' ye yükseltilmiştir. Sıcaklık daha sonra 10 dakika boyunca 20°C / dakika ısıtma rampası ile 300°C' ye yükseltilmiştir. Enjeksiyon bölme modunda (bölme oranı: 10:1 ) gerçekleştirilmiştir. Arayüz ve enjektör sıcaklıkları sırasıyla 250°C ve 280°C' dir. Çalışma süresi 49 dakika olarak kaydedilmiştir. MS tarama aralığı, elektron etkisi (EI) iyonlaşması (70 eV) ve 250°C 'lik bir iyon kaynağı sıcaklığı kullanılarak m / z 20-440' dir. Bileşenlerin kütle spektrumlarının Wiley 9 ve NIST kütüphaneleri ile karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrılan bileşiklerin göreceli yüzdesi bilgisayarlı integratör tarafından, Toplam İyon Kromatografisinden hesaplanmıştır. Retensiyon indeksleri (RI) kapsamlı bir şekilde, aynı kromatografik şartlar altında, bir dizi n-alkan (C<sub>6</sub>-C<sub>22</sub>) serisi kullanılarak belirlenmiştir. GC/ MS analizinde, *C. Creticum* 'un n-hekzan ekstraktlarında, toplam 40 biyoaktif fitokimyasal bileşik tespit edilmiştir.

### **3.4.4. *C. creticum* Bitkisinin Ham Ekstrelerinde Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Tayini**

Bitkilerden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve antifungal etkilerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

#### **3.4.4.1 Antimikrobiyal Aktivite Tayini**

*C. creticum*, antimikrobiyal aktivite tayini için;

0.952 gram n-hekzan ekstresi alınarak, 500 µL n-hekzan + 500 µL distile suda;

0.915 gram dietileter ekstresi alınarak, 500 µL dietileter + 500 µL distile suda;

1.013 gram etilasetat ekstresi alınarak, 500 µL etilasetat + 500 µL distile suda;

1.025 gram metanol ekstresi alınarak, 500 µL metanol + 500 µL distile suda çözünerek hazırlanmıştır.

*C. creticum* ekstresi yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Aşağıda belirtilen bakteriler antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için kullanılmıştır:

*Staphylococcus aureus* (ATCC 43300)

*Bacillus subtilis* (NRRL NRS-744)

*Escherichia coli* (ATCC 35218)

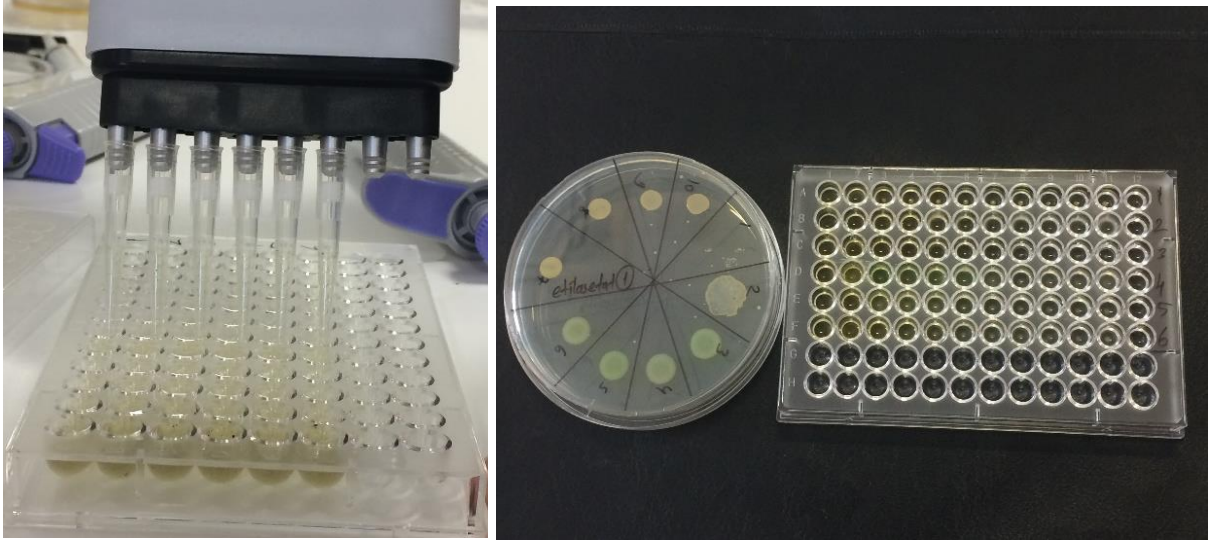
*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

*Proteus mirabilis* (ATCC 12453)

*Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)

İçerisinde Nutrient Agar bulunan petrilere; bakteri stok kültürleri canlandırılması için ekilmiş olup, 37°C de 16-18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyondan sonra, Mueller Hinton Broth (MHB) bulunan tüplerin içerisine besiyeri üzerinde gelişen koloniler eklenmiş ve 0.5 Mc Farlanda göre, yaklaşık olarak  $10^8$  CFU/mL yoğunlukta olan bakteriyel süspansiyonların bulanıklığı Densitometre (Biosan) ile ayarlanmıştır.

Steril U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikroplaklar bu test için kullanılmıştır. Yatay sıranın sonundaki kuyucuklardan biri sterilite kontrol kuyucuğu olarak, diğeri ise üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiş olup, sterilite kontrolü olan kuyucuğa 200 µL MHB, üreme kontrol kuyucuğuna ise 100 µL MHB ve 100 µL mikroorganizma süspansiyonundan ilave edilmiştir. Öncelikli olarak ekstrakt dilüsyonlarının yapılması için hazırlanan MHB besiyerinden mikroplağın her bir kuyucuğuna 100' er µL dağıtılmış, ilk kuyucuğa konulan 100 µL ekstrenin 10. kuyucuğa kadar dilüsyonu yapılmıştır. Ekstrenin son konsantrasyonu 250-0.4882 mg/mL aralığındadır. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, bakteri süspansiyonlarından 100' er µL alıp hazırlanan mikroplaklara eklenmesi ve  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ' de 16-20 saatlik inkübasyon yapılmasıyla belirlenmiştir. *S. aureus* bakterisi için Penisilin G, diğer bakteriler için Gentamisin antibiyotiği kontrol için kullanılmıştır (CLSI M07-A9, 2012) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mikroplak ve ekimlerin yapılışı

#### 3.4.4.2. Antifungal Aktivite Tayini

*C. creticum*, antimikrobiyal aktivite tayini için;

1.015 gram n-hekzan ekstresi alınıp, 500 µL n-hekzan + 500 µL distile suda;

0.940 gram dietileter ekstresi alınıp, 500 µL dietileter + 500 µL distile suda;

0.341 gram etilasetat ekstresi alınıp, 500 µL etilasetat + 500 µL distile suda;

1.023 gram metanol ekstresi alınıp, 500 µL metanol + 500 µL distile suda çözünerek hazırlanmıştır.

*C. creticum* ekstresi yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmış olup, antifungal aktivitelerinin tespit edilmesi için;

*Candida glabrata* (ATCC 90030)

*Candida albicans* (ATCC 90028)

*Candida krusei* (ATCC 6258)

*Candida parapsilosis* (ATCC 22019) mayaları,

*Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305)

*Penicillium chrysogenum* (ATCC 48271) küfleri test izolatları olarak kullanılmıştır.

RPMI 1640-L glutaminli (Gibco®) besiyeri olarak kullanılmış, tampon madde olarak 34.53 gr/L MOPS eklenip, pH: 7' ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri filtrasyon yöntemiyle sterilize edilmiş olup, kullanılmıncaya kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir. Mayaların

antifungal duyarlılığı belirlenirken, maya süspansiyonlarının hazırlanması için 24 saatlik Sabouraud Dextrose Agar (SDA)' da geliştirilmiş izolatların 5 mL steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonları hazırlanıp, bulanıkları 0.5 McFarland'a göre ayarlanmıştır. Bu işlemle mililitresinde  $1-5 \times 10^6$  hücre içermekte olan stok maya süspansiyonları elde edilmiştir. Stok maya süspansiyonu; RPMI 1640 besiyeri ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilerek, testte kullanılacak olan  $1-5 \times 10^3$  hücre/mL'lik son konsantrasyon elde edilmiştir.

Steril U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikropalaklar bu test için kullanılmış olup, yatay sıranın sonundaki kuyucuklardan biri üreme kontrol kuyucuğu , diğeri ise sterilite kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Sterilite kontrolü için belirlenen kuyucuğa 200 µL RPMI, üreme için belirlenen kontrol kuyucuğuna da 100 µL RPMI ve 100 µL mikroorganizma süspansiyonundan eklenmiştir. İlk olarak ekstrakt dilüsyonlarının yapılması için hazırlanan RPMI 1640 besiyerinden mikroplağın her bir kuyucuğuna 100' er µL eklenmiş, ilk kuyucuğa eklenen 100 µL ekstrenin 10. kuyucuğa kadar dilüsyonu yapılmıştır. Ekstrelerin son konsantrasyonu 250-0,4882 mg/mL aralığındadır. 100'er µL maya süspansiyonları hazırlanan mikropalalara eklenmiş ve 35°C' de 48 saatlik inkübasyondan sonra MİK değerleri tespit edilmiştir. CLSI M27-S3 önerileri doğrultusunda, flukonazol (FLU) antifungalinin dilüsyonları (0.0625-64 µg/mL) kontrol için hazırlanmıştır (CLSI M27-S3, 2008).

Küflerin antifungal duyarlılık testinde; SDA'da üremekte olan 7 günlük küf kolonilerinin üzerine 1 mL steril serum fizyolojik eklenmiştir. Daha sonra, koloniler öze ile kazınıp, pastör pipeti ile steril tüpe transfer edilmiştir. 3-5 dakika ağır partiküllerin çökmesi için beklenmiştir, üstte kalan süspansiyon yeni bir steril tüpe aktararak, 15 saniye vortekslenmiştir. Konidyal süspansiyonların yoğunlukları Thoma Lamında sporlar sayılarak  $1-5 \times 10^6$  olacak şekilde ayarlanıp, süspansiyonların yoğunluğunun  $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  CFU/mL olabilmesi için RPMI 1640 ile 1/ 50 oranında dilüe edilmiştir. Ekstrelerin dilüsyonları yapılan mikropalak kuyucuklarına süspansiyonlardan 100' er µL eklenmiş, MİK değerleri 35°C' de 48 saatlik inkübasyondan sonra tespit edilmiştir.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *C. creticum*'un Antimikrobiyal ve Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları

#### 4.1.1. *C. creticum*'un Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları

*C.creticum* ham ekstralarının miktarları ve çalışmada uygulanan dilüsyon miktarları aşağıda gösterilmiştir.

Antimikrobiyal analizinde kullanılan bitki ekstralarının miktarları aşağıdaki gibidir;

*C.creticum* hekzan: 0.952 g

*C.creticum* dietileter: 0.915 g

*C.creticum* etilasetat: 1.013 g

*C.creticum* metanol: 1.025 g

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 250 mg/mL; 2.Kuyucuk:125 mg/mL; 3.Kuyucuk: 65.2 mg/mL; 4.Kuyucuk: 31.25 mg/mL; 5.Kuyucuk: 1.625 mg/ mL; 6.Kuyucuk: 7.8125 mg/mL; 7.Kuyucuk: 3.9062 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1.9531 mg/mL; 9.Kuyucuk: 0.9765 mg/mL; 10.Kuyucuk: 0.4882 mg/mL; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol.

Penisilin için: 1.Kuyucuk: 3.4 mg/mL; 2.Kuyucuk: 1.7 mg/ mL; 3.Kuyucuk: 0.85 mg/ mL; 4. Kuyucuk: 0.425 mg/ mL; 5.Kuyucuk: 0.2125 mg/mL; 6. Kuyucuk: 0.10625 mg/mL.

Gentamisin için: 1.Kuyucuk: 32 mg/mL; 2.Kuyucuk: 16 mg/mL; 3. Kuyucuk: 8 mg/mL; 4.Kuyucuk: 4 mg/ mL; 5. Kuyucuk: 2 mg/mL; 6. Kuyucuk 1 mg/mL.

**Tablo 4.1.** *C. Creticum*'un ham ekstrelerinde antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bakteri	Ekstreler					
	Etilasetat MİK (mg/mL)	Dietileter MİK (mg/mL)	Metanol MİK (mg/mL)	Hekzan MİK (mg/mL)	Penisilin MİK (mg/mL)	Gentamisin MİK (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	125 mg/mL	125 mg/mL	125 mg/mL	125 mg/mL	3.4 mg/mL	32 mg/mL
<i>B. subtilis</i>	125 mg/mL	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	31.25 mg/mL	1.7 mg/mL	16 mg/mL
<i>E. coli</i>	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	31.25 mg/mL	31.25 mg/mL	0.85 mg/mL	8 mg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	125 mg/mL	125 mg/mL	31.25 mg/mL	31.25 mg/mL	0.425 mg/mL	4 mg/mL
<i>P. mirabilis</i>	125 mg/mL	125 mg/mL	31.25 mg/mL	62.5 mg/mL	0.2125 mg/mL	2 mg/mL
<i>S. typhimurium</i>	125 mg/mL	125 mg/mL	31.25 mg/mL	125 mg/mL	0.10625 mg/mL	1 mg/mL

Kontrol de *S. Aureus* bakterisi için Penisilin, diğer bakteriler için Gentamisin antibiyotiği kullanılmıştır.

#### 4.1.2. *C.creticum*'un Antifungal Aktivite Tayini Sonuçları

Antifungal çalışmasında uygulanan dilüsyon değerleri ve ekstre miktarları aşağıda verilmiştir.

Antifungal analizinde kullanılan bitki ekstrelerinin miktarları aşağıdaki gibidir;

*C.creticum* hekzan: 1.015 g

*C.creticum* dietileter: 0.94 g

*C.creticum* etilasetat: 0.341 g

*C.creticum* metanol: 1.023 g

Dilüsyonlar: 1.Kuyucuk: 250 mg/mL; 2.Kuyucuk: 125 mg/mL; 3.Kuyucuk: 65.2 mg/mL ; 4.Kuyucuk: 31.25 mg/mL; 5.Kuyucuk: 15.625 mg/mL; 6.Kuyucuk: 7.8125 mg/mL; 7.Kuyucuk: 3.9062 mg/mL; 8.Kuyucuk: 1.9531 mg/mL ; 9.Kuyucuk: 0.9765 mg/mL ; 10.Kuyucuk: 0.4882 mg/mL ; 11.Kuyucuk: Pozitif Kontrol; 12.Kuyucuk: Negatif Kontrol



**Tablo 4.2.** *C. Creticum*'un ham ekstralarında antifungal aktivite sonuçları

Bakteri	Ekstreler			
	Etilasetat MİK (mg/mL)	Dietileter MİK (mg/mL)	Metanol MİK (mg/mL)	Hekzan MİK (mg/mL)
<i>C. albicans</i>	-(*)	-	7.8125 mg/mL	125 mg/mL
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	7.8125 mg/mL	125 mg/mL
<i>C. glabrata</i>	250 mg/mL	-	15.625 mg/mL	62.5 mg/mL
<i>C. krusei</i>	250 mg/mL	250 mg/mL	15.625 mg/mL	62.5 mg/mL
<i>A. fumigatus</i>	250 mg/mL	-	7.8125 mg/mL	1.9531 mg/mL
<i>P. chrysogenum</i>	250 mg/mL	-	62.5 mg/mL	0.9765 mg/mL

\*(-) Antifungal etki gözlenmedi.

Kontrol için FLU (Flukonazol) antifungalının dilüsyonları 0.0625-64 µg/mL hazırlanıp, *C. krusei* için, MİK değeri 16 /mL olarak belirlenmiştir.

#### 4.2. *C. creticum* Bitkisinin n-Hekzan Ekstresindeki Uçucu Bileşik Tayini Sonuçları

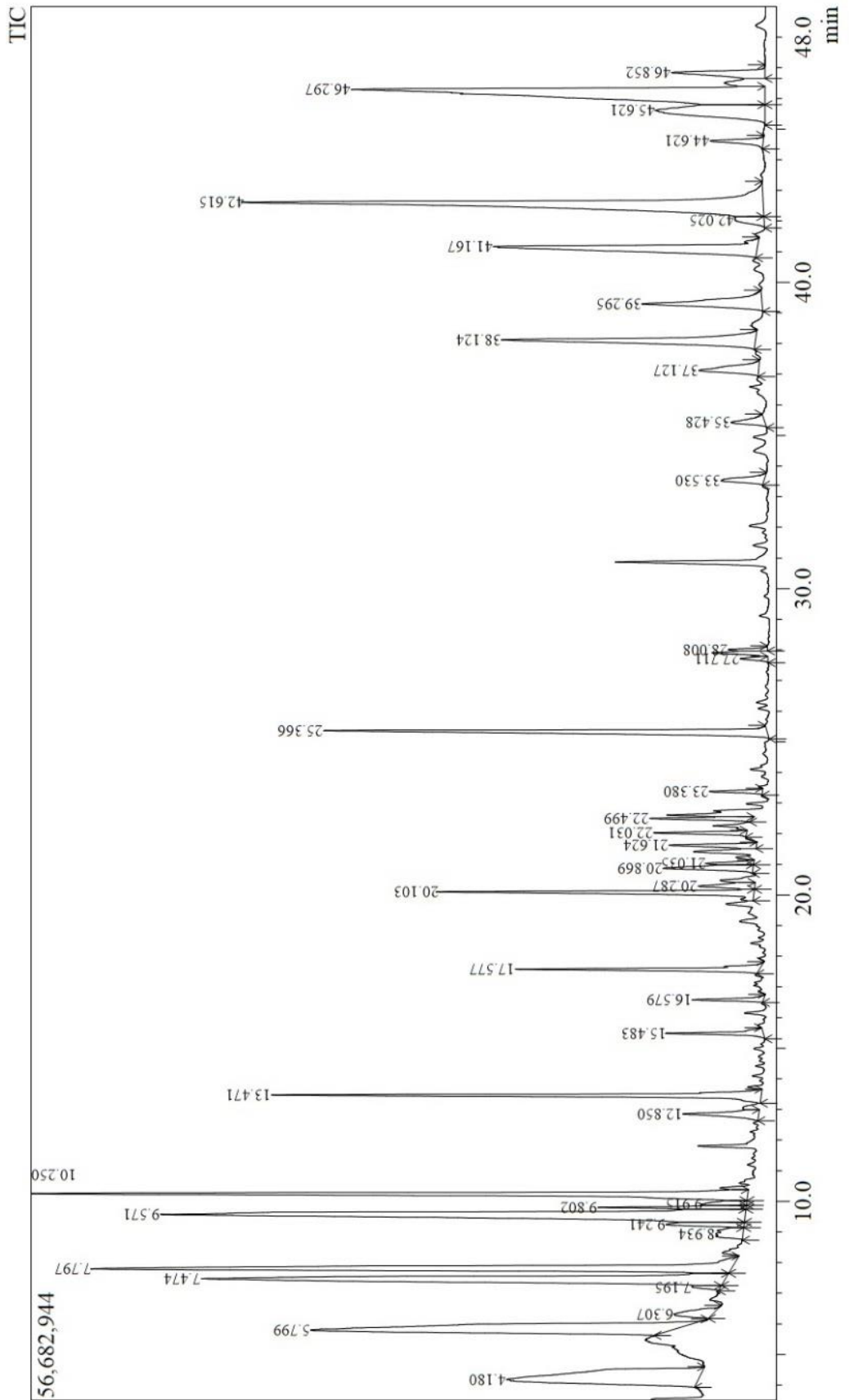
*C. creticum* bitkisinin, n-hekzan ekstresinde GC-MS cihazı kullanılarak 40 bileşik tanımlanmıştır.

Genel olarak, *C. creticum*'un n-hekzan ekstresinde temel bileşenler, terpenoidler (% 33.26), hidrokarbonlar (% 41.11; alkenler % 22.94 ve alkanlar % 18.17), esterler (% 11.94) ve yağ asitleridir (Tablo 4.4). *C. creticum*'daki terpenoidler arasında, en fazla miktarda bulunan terpenoid, globulol'dür (% 9.29). Bununla birlikte, *C. creticum*'daki diğer terpenoidler; lup-20(29)-en-3-il-asetat (% 9.27), norolean-12-en (% 4.1), olean-12-en (% 3.47) tunbergol (2.9 %) ve lupeol'dür (1.99 %) (Tablo 4.3).

En bol bulunan hidrokarbonlar, 1-dokesen (%7.57), 1-nonadeken (%7.2), siklotetrakosan (% 6.07), 1-hekzadeken (% 5.81) ve tetratetrakontan'dır (% 4.0) (Tablo 4.3). *C. creticum* yağı içerisinde, temel yağ asidi ve yağ asit esteri olarak, Palmitik asit (Heksadekanoik asit) (%7.54) ve Linoleik asit metil ester (% 8.83) tanımlanmıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.1).

**Tablo 4.3.** *C. creticum*'un n-hekzan ekstresinin uçucu bileşik kompozisyonu (%)

No	RI	Bileşikler	Yüzde Miktarı (%)	No	RI	Bileşikler	Yüzde Miktarı (%)
1	873	1-Hekzadeken	5.81	21	1338	Vinil dekanoat	0.32
2	920	1-Nonadeken	7.2	22	1355	5-(1-metilpropil)-Nonan	0.67
3	931	6,10,14-trimetil-2-Pentadekanon	0.65	23	1367	10-Nonadekanon	0.6
4	949	Palmitoleik asit, metilester	0.24	24	1380	9-Trikosen	0.68
5	963	Palmitik asit	7.54	25	1465	1,2-Sikloheksandikarboksilik asit, didesil ester	0.34
6	971	1-Dokosen	7.57	26	1467	Tetratetrakontan	4.00
7	1005	1-Heksakosanol (seril alkol)	0.61	27	1541	Hekzanoik asit, 2-propenil ester (Allil kaproat)	0.22
8	1009	Fitol	0.75	28	1550	Heneikosan	0.23
9	1020	Metil Linoleat	8.83	29	1736	2-propenil nonanoat	0.58
10	1027	Stearik Asit	0.85	30	1803	Stigmasterol	0.45
11	1027	Tetrahidro geraniol	0.43	31	1867	$\gamma$ -Sitosterol	0.98
12	1038	Siklo tetrakosan	6.07	32	1901	Olean-12-en	3.47
13	111	Oleik asit	0.86	33	1950	Lupeol	1.99
14	1127	Etil Siklododekan	3.50	34	2037	Norolean-12-en	4.10
15	1181	Oktakosan	0.69	35	2073	Veridiflorol	0.52
16	1213	Di-n-oktilftalat	0.47	36	1892	Lup-20(29)-en-3-il-asetat	9.27
17	1241	1-Trikosen	1.68	37	2168	Neofitadien	0.54
18	1312	Tetrakosan	2.44	38	1969	Tunbergol	2.90
19	1317	5-bütül-nonan	0.57	39	2245	Globulol	9.29
20	1333	Nonadekan	0.94	40	1995	2-ter-bütül-4,6-bis(3,5-diter-bütül-4-hidroksibenzil) fenol	1.17



Şekil 4.1. *C. creticum* n-hekzan ekstresinin GC-MS kromatogramı

**Tablo 4.4.** *C. creticum* bitkisinin n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin sınıf dağılımı

<b>Uçucu Bileşikler</b>	<b><i>C. creticum</i></b>
Terpenoidler	33.26
Hidrokarbonlar (alkanlar ve alkenler)	41.11
Esterler	11.94
Yağ asitleri	9.25
Fenolik Bileşikler	1.17
Karbonil Bileşikler (aldehit-keton)	1.25
Alkoller	0.61
Sterol	1.43
<b>Toplam (%)</b>	<b>100.02</b>

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Trakya bölgesinde yetişen *C.creticum* (Lam.) d'Urv subsp. *creticum* (*Asteraceae*) bitkisinden elde edilen n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin tayini, Gaz kromatografi kütle spektrofotometri (GC-MS) cihazıyla gerçekleştirilmiş ve bitkiden elde edilen 4 ekstrede (n-hekzan, eter, etilasetat ve metanol), antifungal ve antimikrobiyal aktivite araştırılması yapılmıştır.

*C. creticum* bitkisinin ekstrelerinde antimikrobiyal ve antifungal aktivite, mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre; en yüksek inhibisyon etkisi, dietileter ekstresinde *E.coli* mikroorganizmasına (MİK değeri 31.25 mg/mL) karşı, metanol ekstresinde *B.subtilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *P.mirabilis* ve *S.typhimurium* mikroorganizmalarına (her bir mikroorganizmada MİK değeri 31.25 mg/mL) karşı, hekzan ekstresinde ise *B.subtilis* (MİK değeri 31.25 mg/mL), *E. Coli* (MİK değeri 31.25 mg/mL) ve *P. aeruginosa* (MİK değeri 31.25 mg/mL) mikroorganizmalarına karşı bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar, antifungal aktivite açısından değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon etkisinin hekzan ekstresinde *P. chrysogenum* mikroorganizmasına (MİK = 0.9765 mg/mL) ve *A.fumigatus* mikroorganizmasına (MİK=1.9531 mg/mL) karşı olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, metanol ekstresinin *C.albicans* (MİK=7.8125 mg/mL) ve *C.parapsilosis* (MİK=7.8125 mg/mL) mikroorganizmalarına karşı en yüksek inhibisyon gösterdiği de tespit edilmiştir. Aktivite sonuçlarına genel olarak bakıldığında, *C.creticum*'un metanol ekstresinin, diğer ekstrele göre, antifungal ve antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek bulunmuştur.

*C.creticum* bitkisinden elde edilen n-hekzan ekstresindeki uçucu bileşiklerin kompozisyonuna bakıldığında (Tablo 4.3), temel bileşenler olarak terpenler ( % 33.26) ve hidrokarbonlar (% 41.11) görülmektedir.

*C.creticum*'un hekzan ekstresindeki temel terpenoid bileşiği, globulol (% 9.29) olarak tayin edilmiştir (Tablo 4.3). Tan ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada, globulolün çeşitli fungal türlere ve bakterilere karşı antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

*C.creticum*'un hekzan ekstresindeki diğer terpenoid bileşikleri, lup-20 (29)-en-3-il-asetat (% 9.27), norol-12-en (% 4.1), olean-12-en (% 3.47), thunbergol (% 2.9) ve lupeol (% 40

1.99)'dür. (Tablo 4.3). Literatürde, lupelol ve lup-20 (29)-en-3-il-asetatın antikanser, antiprotozal, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve kemopreventif özellikleri bildirilmiştir (Gallo ve Sarachine 2009).

*C.creticum*'un hekzan ekstresindeki temel hidrokarbonlar, 1-dokosen (% 7.57), 1-nonadesen (% 7.2), siklotetrakosan (% 6.07), 1-heksadesen (% 5.81) ve tetratetrakontan (% 4.0) olarak tayin edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda 1-nonadesen'in *candida albicans*'a karşı antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Smaoui ve ark. (2012); El-Sakhawy ve ark. 1998). Ayrıca, Jing ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada ise; *Gymura segetum* yaprak ekstresinden elde edilen, 1-heksadesen ve siklotetrakosan bileşiklerinin güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği vurgulanmıştır.

Sonuç olarak, *C.creticum* n-hekzan ekstresinin GC-MS analizi, ekstredeki farklı kimyasal yapıya sahip çeşitli farmasötik olarak önemli kimyasal bileşiklerin varlığını göstermiştir. Bu tez çalışmasıyla, *C.creticum*'un n-hekzan ekstresinin uçucu bileşiklerinin tayini ile bitkinin antifungal ve antibakteriyal aktiviteleri ilk defa literatüre sunulmuştur. Yapılan bu çalışma, Türkiye'de yetişen *Cirsium* türlerinin, kemotaksonomik bakımından değerlendirilmesine katkı sağladığı gibi bu türlerdeki biyoaktif bileşenlerin araştırılmasıyla bilimsel birikimede katkı sağlamış bulunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adıgüzel A, Güllüce M, Sengül M, Ögütçü H, Sahin F, Karaman Ş (2005). Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. Turk J. Biol. 29, 155-160.
- Akın M (1996). Konya’da Doğal Olarak Yetişen Bazı Bitkilerde Uçucu Yağ Miktarları ve Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri, 15-18.
- Altan, Y, Uğurlu E, Sevinç Ö (1999). Akçakertik Florası Manisa (Demirci) 1. International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehrami Karaçam. Kütahya.
- Altun F (2010). Van ve Yöresinde Sığır Sütlerinden İzole Edilen Bazı Kontagiyöz ve Çevre Patojenlerinin Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Disk Difüzyon ve Agar Dilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 30-31.
- Anonymous (2012). National Committee for Clinical Lab. Standards, Approved Standard M02-11. NCCLS, Villanova, PA.
- Başer K (1995). Recent Advances on the Umbelliferae Essential Oils of Turkey, Proceedings of the 8th International Symposium on Natural Product Chemistry, 18-22 January, Karachi, Pakistan, 271-289.
- Başer K, Gülbaba A, Azcan N, Kara M, Kırimer N, Kürkçüoğlu M, Özek T, Özkurt N (1998). Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Okaliptüs (*Eucalyptus*) Türlerinin Uçucu Yağ Verim ve Bileşimlerinin ve Üretim Teknolojilerinin Belirlenmesi, Orman Bakanlığı Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü, 11, 17-20.
- Başer H (2001). Phytochemical Diversity in the flora of Turkey”, Plants of the Balkan Peninsula: into the Next Millenium, Proceeding of the 2nd Balkan Botanical Congress İstanbul, Türkiye, 517-528.
- Başer K (2006). Aromatic Plants as a Source of Botanicals, Acta Horticulturae, 720, 27-33.
- Baytop A (1993). Farmasötik Botanik Uygulamaları, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul 198-199.
- Baytop T (1999). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 4-10.
- Bektaş E (2011). *Cotinus coggygia* (Scop.) Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, 29.
- Benli M, Yigit N (2005). Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyel Aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 03(08):1-8.
- Boğa M, Yılmaz PK, Cebe DB, Fatima M, Siddiqui BS, Kolak U, Naturforsch C (2014). Chemical Constituents and Biological Activities of *Cirsium leucopsis*, *C.sipyleum*, and *C.eriophorum*. (9-10):381-90.
- Borawska MH, Czechowska SK, Markiewicz R, Socha K, Nazaruk J, Pałka J, Isidorov VA (2010). Enhancement of antibacterial effects of extracts from *Cirsium* species using sodium picolinate and estimation of their toxicity. Natural Product Research, 24(6): 554-561.

- Boydağ İ (2004). *Origanium Onites* L. (Kekik) Yağ Altı Suyunun Uçucu Bileşikleri. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı Doktora Tezi, 17-30.
- Burt S (2004). Essential Oils, Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Bremer K (1994). *Asteraceae: Cladistics & Classification*. Timber Press, 752, Oregon.
- Cellat K (2011). Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Ekstrakte Edilmesi ve İçeriklerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, 3-15.
- Ceylan A (1997). Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri) Cilt II, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No: 481, İzmir, Türkiye.
- Charadze AL (1963). *Cirsium* Mill. – In: Bobrov EG & Cherepanov SK (Eds.), *Flora of the USSR*. 28: 63-270. Izdatel'stvo Akaddemii Nauk SSSR, Moscow, Leningrad. Translated from Russian in 1976 by Israel Program for Scientific Translation, Jerussalem.
- Connolly J, Hill R (1991). *Dictionary of Terpenoids, Mono and Sesquiterpenoids*, London, 1, 333-337.
- Çelik E ve Çelik G (2007). Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyel Özellikleri Ortab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 05(2):1-6.
- Dash B, Sultana S, Sultana N (2011). Antibacterial Activities of Methanol and Acetone Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*)” *Life Sciences and Medicine Research*, 27:1-8.
- Davis, P (1994). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. University Press, Cilt 1-9, Edinburg.
- Davis PH (Ed.) (1965-1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol.1-9, Edinb. Un. Press, Edinburgh.
- Deans SG, Simpson E, Noble RC, MacPherson A, Penzes L (1993). Natural Antioxidants From *Thymus Vulgaris* (thyme) Volatile Oil. The Beneficial Effects upon Mammalian Lipid Metabolism. *Acta Horticulturae* 332, 177– 182.
- Devon T, Scott K (1972). *Handbook of Naturally Occurring Compounds, Terpenes*, New York, 2, 87-138.
- Direkel Ş (2010). Klinik Örneklerde Küf Mantarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 49-50.
- Djerassi C (1994a) *Dictionary of Natural Products, Type of Compound Index-Species Index*, Chapman & Hall Chemical Database, London, Vol. 7.
- Djerassi C (1994b). *Dictionary of Natural Products, Type of Compound Index-Species Index*, Chapman & Hall Chemical Database, London, Vol. 3, 2632-26.
- Dorman HD, Deans SG (2000). Antimicrobial Agents from Plants, Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.



- Dündar Ö (2011). Belirli Fungus Türlerinin Bazı Bakteri Türleri Üzerinde Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2-3.
- El Sakhawy F, El Tantawy M, Ross S, El Sohly M (1998). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Murraya Exotica* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 59-62.
- Esen M (2008). *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O.Kuntze Bitki Ekstraktının Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 24.
- Er B (2011). Flukonazolun *Candida* Cinsi Mayalar Üzerine Etkisinin Disk Difüzyon Yöntemi ile Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 28-29.
- Eren SE (2010). 1-Aril-2-Morfolinometil-2-Propen-1-On Yapısındaki Bileşiklerin Sentezi ve Antifungal Etkilerinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 31-32
- Ertuğ F (2004). Bodrum Yöresinde Halk Tıbbında Yararlanılan Bitkiler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler Kitabı. 76-93.
- Farag, RS, Daw ZY, Hewedi, FM, El Baroty GSA (1989). Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *Journal of Food Protection* 52 (9), 665– 667.
- Fischer N, Jeffrey D, James L, Leovigildo Q, Marias A (1990). Stimulation of Witchweed Germination by Sesquiterpene Lactones: Astructureactivity Study, *Phytochemistry*, 29, 8, 2479-2483.
- Formisano C, Rigabo D, Senatore F, Feo V, Bruno M, Rosselli S (2007). Composition and allelopathic effect of essential oils of two thistles: *Cirsium creticum* (Lam.)D’Urv. Ssp. *Triumfetti* (Lacaita) Werner and *Carduus nutans* L.
- Gallo M and Sarachine M (2009). *Biological Activities of Lupeol*, *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(Special issue), 46-66.
- Genç G (2003). Çatalca Yöresinde Etnobotanik Bir Araştırma Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye; 14-29.
- Genç G, Özhatay N (2006). An Ethnobotanical Study in Çatalca (European Part of İstanbul) II. *Turkish J Pharm Sci*, 3: 73-89.
- Guenther E (1948). *The Essential Oils*. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., Malabar, Florida. Vol 1-6, 53-60.
- Guenther E, Gilbertson G, Koenig R (1967). *Essential Oils and Related Products*. *Anal. Chem.* 39-48R.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC (Ed.) (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol.11 (supplement 2): 161-163, Edinb. Un. Press, Edinburgh.
- Gür K (1987). *Toprak Biyolojisi Ders Kitabı*. Selçuk Üniv. Ziraat Fak. Ders Kitapları Yayın No.11, Konya, Türkiye.
- Hacıoğlu Ö (2005). *Achillea* (Anthemideae) Cinsi Filipendulinae ve Santolinoidea Seksiyonlarına Ait Yedi Türün Uçucu Yağ Kompozisyonları ve Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 80.

- Heath H (1981). Source Book of Flavors, The Avi Publishing Company Inc., Westport Connecticut, U.S.A, 23-30.
- Hussain T, Arshad M, Khan S, Satar H, Qureshi M (2011). In Vitro Screening of Methanol Plant Extracts for Their Antibacterial Activity.43(1), 531-538.
- İşcan G, Demirci F, Kırimer N, Kürkçüoğlu M, Baser K, Kıvanç M (2002). Bazı Umbelliferae Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyel Etkileri. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler :355-366. ISBN 975-94077-2-8.
- James M (1973). Modern Food Microbiology Van Nostrand Reinhold. Antimicrobial Properties of Garlic. Pharmazie 25:266-270
- Janovska D, Kubikova K, Kokoska L (2003). Screening for Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Species of Traditional Chinese Medicine. Czech Journal of Food Sciences. 21, 107-110.
- Kadereit JW ve Jeffrey C (2007). Flowering Plants. Eudicots: Asterales. In: Kubitzki K. (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants, vol.8, Springer, Berlin.
- Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Öğütçü H, Şengül M, Adıgüzel A (2003). Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*; 85 , 231–235
- Kandemir A, Beyzaoğlu O (2002). Köse Dağlarının (Gümüşhane) Tıbbi ve Ekonomik Bitkileri.Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 6 (3): 148-157.
- Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP (2014). Investigating the potential of under-utilised plants from the *Asteraceae* family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161: 79-86.
- Khan A, Amin A, Khan MA, Ali I (2011). In vitro screening of *Cirsium arvense* for potential antibacterial and activities. *Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 24(4): 519-522.
- Knobloch K, Weis N, Weigand H (1986). Mechanism of Antimicrobial Activity of Essential Oils. *Planta Med.* 52:556
- Kozyra R, Los R, Mardarowicz M, Glowniak K, Malm A, Szlapak A (2009). GC/MC Analysis of the Essential Oil Isolated From the Herb of *Cirsium Vulgare* (Savi.) Ten and Its Antimicrobial Activity. Vol XXII, N 1, 21, 2009.
- Kozyra M, Mardarowicz M, ve Kochmanska J (2015). Chemical composition and variability of the volatile components from inflorescences of *Cirsium* species. Vol.29, No.20, 1942-1944.
- Köstekçi S (2010). Türkiye’de Yayılış Gösteren *Cirsium* Mill. Sect. *Cirsium* Türleri Üzerinde Karşılaştırmalı Morfolojik Araştırmalar. Y. Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, Türkiye.
- Kulkarni T, Narasimha M, Atal C (1982). Essential Oil Production by Distillation, Cultivation and Utilization of Aromatic Plants, Council of Scientific and Industrial Research, Jammu, Tawi, 683-698.
- Jing L, Hooi Kheng B, Pazillah I, Amirin S, Mohd Z (2012). Antimicrobial Activity of *Gynura Segetum*'s Leaf Extracts and Its Active Fractions. *International Journal of General Traditional Medicine*, 2, 1-5.

- Lawrence B (1995). The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plant Products in a Manual on the Essential Oils and Aroma Chemicals Industries K.Tuley de Silva (Eds.), Unido. Vienna.
- Linskens H, Jackson J (1997). Modern Methods of Plant Analysis, Vol. 19: Plant Volatile Analysis, Springer, Germany.
- Loizzo R, Statti G, Tundis R, Conforti F, Ando S, Menichini F (2004). Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of *Cirsium Tenoreanum*, *Fitoterapia*, 75, 577-580.
- Maregesi S, Pieters L, Ngassapa O, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, Berghe D, Vlietinck A (2008). Screening of Some Tanzanian Medicinal Plants from Bunda District for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activities, *J. Ethnopharmacol.* 119:58-66.
- Maruzzella J (1962). The Germicidal Properties of Perfume Oils and Perfumery Chemicals *Am.Perfum.*77:67.
- Miyazawa M, Yamafuji C, Tabata J ve Ishikawa Y (2003). Oviposition-Stimulatory Activity Against *Ostrinia Zealis* by Essential Oil of Root Part From *Cirsium Japonicum* DC.
- Mojab F, Poursaeed M, Mehrgan H, Pakdaman S (2008). Antibacterial Activity of *Thymus Daenensis* Methanolic Extract'', *Pak. J. Pharm. Sci.*, 21:210-213.
- Mujtaba M (2004). Batch Distillation Design and Operation, *Serios on Chemical Engineering, Vol.3*, Imperial College Press, London 4-10.
- Nazaruk J, Jakoniuk P (2005). Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. Flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 208–212.
- Nazaruk J, Karna E, Kalemba D (2012). The Chemical Composition of the Essential Oils of *Cirsium palustre* and *C.rivulare* and their Antiproliferative Effect. *Natural Product Communications, Volume 7, Baskı 2*
- Nazri M, Ahmat N, Adnan A, Syed S, Ruzaina (2011). In Vitro Antibacterial and Radical Scavenging Activities of Malaysian Table Salad, *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5728-5735.
- Orhan D, Ergun F, Yesilada, E, Tsuchiya K, Takaishi Y, Kawazoe K (2007). Antioxidant Activity of Two Flavonol Glycosides from *Cirsium hypoleucum* DC. Through Bioassay-Guided Fractionation. *Türkiye J Turkish J Pharmaceut Sci* 4:1 14.
- Otte S (1994). Essential Oils-Rediscovered Remedies, *Dragoco Report, Flavoring Information Service.* 3, 91-110.
- Ötük G (1992). Antibiyogramların Değerlendirilmesi. *Antibiyotikler*, s. 11-17.
- Öztürk H (2009). *Jurinea Consanguinea* 'nın Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi. *Trakya Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, Edirne*, 34.
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R, Casanova J (2002). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus Officinalis* L. Oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 15– 19.
- Pişkin Ç (2007). *Lamiaceae Familyasına Mensup Bazı Baharat Bitkilerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya 18-21.
- Principles of Instrumental Analysis, Skoog/Leary, Forth Edition, 1992.
- Prudent D, Perineau F, Bessiere JM, Michel GM, Baccou J.C (1995). Analysis of the Essential Oil of Wild Oregano from Martinique (*Coleus Aromaticus* Benth.) Evaluation of its

- Bacterioatatic and Fungistatic Properties. Journal of Essential Oil Research 7, 165–173.
- Sarker S, Latif D, A Gray (2006). Natural Products Isolation, 2.Baskı, Humana Press Inc., New Jersey, 27-46 ve 47-76.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar Seri No:116, İzmir.
- Singh B, Dutt N, Kumar D, Singh S, Mahajan R (2011). Taxonomy, Ethnobotany and Antimicrobial Activity of Croton Bonplandianum, Euphorbia Hirta and Phyllanthus Fraternus, Journal of Advances in Developmental Research, 2:21-29.
- Smaoui S, Mathieu F, Elleuch L, Coppel Y, Merlina G, Karray-Rebai I, Mellouli L (2012). Taxonomy, Purification and Chemical Characterization of Four Bioactive Compounds From New Streptomyces sp. TN256 Strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 793-804.
- Sree S, Yasodamma K, Paramageetham N (2010). Phytochemical Screening and In Vitro Antibacterial Activity of The Methanolic Leaf Extract: Sebastiania chamaelea Müell. Arg. The Bioscan, 5:173-175.
- Şahin M (2016). GC/FID Cihazı ile Kantitatif MDMA Analizi Metot Validasyonu, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi Analitik Kimya Anabilimdalı, 6-9.
- Şimşek i, Aytekin F, Yeşilada E, Yıldırım V (2004). Anadolu’da Halk Arasında Bitkilerin Kullanış Amaçları Üzerinde Etnobotanik Bir Çalışma, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31.
- Şimşek İ(2013). Kilis Yöresinde Yetişen Bazı Tıbbi Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 20-21.
- Tan M, Zhou L, Huang Y, Hao X, and Wang J (2008). Antimicrobial Activity of Globulol Isolated from the Fruits of *Eucalyptus globulus Labill*, Natural Product Research, 22, 569.
- Tanker M, Tanker N (1976). Farmakognozi Cilt II, Reman Matbaası, İstanbul.
- Tekerlek P (2013). Bazı bryofit türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde, 75.
- Thapa B (1989). Extraction of Essential Oil, National Workshop on Chemical Investigation and Processing of Aromatic Plants, Nepal. 71-81.
- Tonbul S (2015). İnce Tabaka Kromatografi. Yakın Doğu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Bitirme Tezi, 5-6.
- Toroğlu S, Dığrak M, Çenet M (2006). Baharat Olarak Tüketilen Laurus Nobilis Linn ve Zingiber Officinale Roscoe Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri Ve Antibiyotiklere In-Vitro Etkilerinin Belirlenmesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Mühendislik Dergisi, 9(1).
- Turhan D (2015). Bazı Esansiyel Yağların *Staphylococcus Aureus* ve *Escherichia Coli* Üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 16-17.
- Wijesejera R (1990). Practical manual on the Essential Oils Industry, Organization (UNIDO), Vienna, Austria.

- Wijesekera R (1991). The Medicinal Plant Industry. CRC Press LLC, Amerika, 210.
- Wijesekera B (1993). Practical Manual on the Essential Oils Industry Agrotechnology, Processing Quality Assesment. Unido, 100-121.
- Yalçın E (2006). Antifungal Bir Ajan Olan Terbinafin'in Deriden Geçiş Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 64.
- Yalçın M (2014). İdrar Yolu Enfeksiyonlarına Neden Olan *E.coli* İzolatlarına Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktiviteleri. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 19-40.
- Yi O, Jovel E, Towers G, Wahbe T, Cho D, (2007). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Native *Rosa sp.* from British Columbia, Canada” Int. Jour of Food Sciences and Nut; 58, 178-189.
- Yıldız B, Şahin A, Dirmenci T, Arabacı T, Çelenk S, Kelch D (2010). Türkiye’de Yetişen *Cirsium* Mill. (*Asteraceae*) Türleri Üzerinde Taksonomik, Moleküler, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar. TBAG-106T167 numaralı TÜBİTAK projesi, Balıkesir.

## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. Sultangazi Mehmetçik İlköğretim Okulu'nda ilköğretimini tamamladı. Orta öğretimini Yabancı Dil Ağırlıklı Refhan Tümer Lisesinde tamamlayarak 2007 yılında mezun oldu. 2012 yılında lisans eğitimi Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu.

Ocak 2013 yılında Bilim İlaç'ta Kalite Kontrol Laboratuvarında Kalite Kontrol Analisti olarak işe başladı, Ağustos 2013 de Ruhsatlandırma Uzmanı olarak çalışmaya devam etti.

Mayıs 2018 den bu yana Neutec İlaç'ta Ruhsatlandırma Lideri olarak çalışmaktadır. Yüksek Lisansını Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Organik Kimya Anabilim Dalı'nda tamamladı.