



**BAZI BİTKİ ÖZÜTLERİNİN
ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mediha Nur EVREN

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muazzez G. ESER

2022

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BAZI BİTKİ ÖZÜTLERİNİN
ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mediha Nur EVREN

ORCID: 0000-0001-7710-5773

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK
İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muazzez GÜRGAN ESER

ŞUBAT-2022

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

BAZI BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mediha Nur EVREN

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muazzez GÜRGAN ESER

Bu çalışmada lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinden farklı çözücülerde elde edilen özütlerin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkileri ölçüldü. Bu bitkilerin doğal olarak kurutulmuş halleri aktardan temin edilerek soxhlet ekstraksiyonu ile ve etanol, saf su, hekzan çözücülerini kullanılarak ekstrakte edildi. Agar kuyu difüzyon yöntemi ile 3 tekrarlı olacak şekilde antibiyogram tekniği uygulandı. Referans antibiyotikle karşılaştırıldığında yeşil çay, sarı kantaron, defne yaprağı, zeytin yaprağı, hatmi özütlerinin bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edildi. Yeşil çay için en etkili çözünün saf su, diğer bitkiler için ise etanol olduğu, hekzanın bu bitkiler için Soxhlet ekstraksiyonunda uygun bir çözücü olmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel etki, Bitki özütleri, Soxhlet, Agar kuyu difüzyonu, Antibiyogram

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL OF SOME PLANT EXTRACTS INVESTIGATION OF EFFECTS

Mediha Nur EVREN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

Co-Supervisor: Assist.Prof.Dr. Muazzez GÜRGAN ESER

In this study, the antibacterial activities of the extracts of lavender (*Lavandula officinalis*), epicalyx (*Althaea officinalis*), St. John's wort (*Hypericum perforatum*), daphne (*Laurus nobilis*), green tea (*Camellia sinensis*), blackberry (*Rubus fruticosus*), olive leaf (*Olea europaea*) and parsley (*Petroselinum crispum*) obtained by different solvents were tested on *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis*. The naturally dried plants were obtained from herbalist shops and their extracts were obtained using ethanol, distilled water, and hexane using Soxhlet extraction. Antibigram technique was applied with agar well diffusion method in triplicates. Green tea, St. John's wort, daphne leaf, olive leaf and epicalyx extracts were determined to have inhibition effect on bacteria when compared with the reference antibiotic. The most effective solvent for green tea was distilled water and ethanol was the best for the other plants; while hexane was not an appropriate solvent for the Soxhlet extraction.

Keywords: Antibacterial effect, Plant extracts, Soxhlet, Agar well diffusion, Antibigram.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	9
1.1 Literatür Özeti	9
1.1.1 Genel Tanımlar	9
1.1.1.1 Destilasyon (Damıtma)	9
1.1.1.2 Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu	10
1.1.1.3 Katı -sıvı Ekstraksiyonu ve Soxhlet Ekstraksiyonu.....	12
1.1.1.3.1 Katı-sıvı ekstraksiyonu	12
1.1.1.3.2 Soxhlet ekstraksiyonu	16
1.1.1.4 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE)	19
1.1.2 Antibakteriyel Etki Çalışmalarında Kullanılan Metotlar	20
1.1.2.1 Antimikrobiyal Aktivite Tayin Metotları.....	20
1.1.2.1.1 Dilüsyon yöntemi:.....	21
1.1.2.1.2 Difüzyon Yöntemi:	21
1.1.2.2 Antibakteriyel Etki Çalışmalarında Kullanılan Agar Difüzyon Metotları.....	22
1.1.2.2.1 Agar Disk Difüzyon Metodu:	22
1.1.2.2.2 Agar Kuyu Difüzyon Metodu:	22
1.1.3 Tıbbi Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanımı	23
1.1.4 Bitkisel Ekstarktların Yağ Asiti İçerikleri	25
1.1.5 Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri.....	26
1.1.5.1 Enterococcus faecalis.....	26
1.1.5.2 Escherichia coli	27
1.1.5.3 Pseudomonas aeruginosa	27
1.1.5.4 Staphylococcus aureus	29
1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	30
2. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	33

3.1 Etanol ile Ekstraksiyon	33
3.2 Saf Su ile Ekstraksiyon	36
3.3 Hekzan ile Ekstraksiyon	40
4. TARTIŞMA	44
4.1 Sarı Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>).....	44
4.2 Lavanta (<i>Lavandula officinalis</i>).....	44
4.3 Defne (<i>Laurus nobilis</i>).....	45
4.4 Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>).....	46
4.5 Yeşil Çay (<i>Camellia sinensis</i>).....	46
4.6 Zeytin Yaprağı (<i>Olea europaea</i>).....	47
4.7 Böğürtlen (<i>Rubus fruticosus</i>)	47
4.8 Hatmi (<i>Althaea officinalis</i>).....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
6. KAYNAKLAR	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Etanol ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü (mm).....	33
Çizelge 3.2. Saf su ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü(mm)	36
Çizelge 3.3. Hekzan ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü (mm)	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Soxhlet düzeneği (Karakaş ve Güvenilir, 2003)	13
Şekil 1. 2. Soxhlet Düzeneği	14
Şekil 1. 3. Döner Buharlaştırıcı	15
Şekil 1. 4. Petriye yerleştirilmiş disk ve engelleme zonu (Altundağ ve Aslım, 2005).....	22
Şekil 1. 5. Agar üstüne kuyu açma ve engelleme zonu (Altundağ ve Aslım, 2005).	23
Şekil 3. 1. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. coli</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	34
Şekil 3. 2. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi.....	34
Şekil 3. 3. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>S. aureus</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	35
Şekil 3. 4. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. faecalis</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	35
Şekil 3. 5. Etanol ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği	36
Şekil 3. 6. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. coli</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	37
Şekil 3. 7. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	38
Şekil 3. 8. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>S. aureus</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	38
Şekil 3. 9. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. faecalis</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	39
Şekil 3. 10. Saf su ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği	39
Şekil 3. 11. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. coli</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	41
Şekil 3. 12. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>P. aeruginosa</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	42
Şekil 3. 13. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>S. aureus</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	42
Şekil 3. 14. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin <i>E. faecalis</i> bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi	43
Şekil 3. 15. Hekzan ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği.....	43

SİMGELER DİZİNİ

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
Mm	Milimetre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece



KISALTMALAR DİZİNİ

CFU	Koloni Oluşturan Birim
GC	Gaz Kromatografisi
GC-ECD	Gaz Kromatografi-Elektron Yakalama Dedektörü
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
pH	Power Hidrojen (Asitlik-Bazlık değeri)
SPE	Katı faz Ekstraksiyonu



1. GİRİŞ

Medyatik platformlarda ve dijital ortamlarda, yazılı ve görsel olarak basında tıbbi bitkiler, koku tedavisi, doğal bileşikler, organik tarım gibi terimlerle son yıllarda sıkça karşımıza çıkmaktadır. Aromatik ve tıbbi bitkilerin dolaylı olarak veya doğrudan kullanımı son yıllarda artmış, çalışılmamış bitkiler üzerindeki merak duygusunu ön plana çıkartmıştır (Kutlular, 2007).

Bitkileri doğrudan kullanmak yerine özütlerini veya özütlerden elde edilmiş olan materyalleri kullanmak daha basit ve güvenlidir. Bu şekilde, istenmeyen bileşenler uzaklaştırılarak, istenen bileşenler çok miktarda ve saf olarak elde edilmiştir. Özütleri elde etmede kullanılan yöntemler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

1. Destilasyon,
2. Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu
3. Katı-sıvı Ekstraksiyonu ve Soxhlet ekstraksiyonu,
4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE)

Yukarıdaki yöntemlerle elde edilen özütler, antiseptik, antioksidatif ve antimikrobiyal etkilere sahiptir. Kozmetik sektöründe ve tedavi amaçlı olarak kullanılabilirler (İzgü, 1973).

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Genel Tanımlar

1.1.1.1 Destilasyon (Damıtma)

Organik bileşikleri, saflaştırma ve ayırma yöntemleri arasında en önemli yöntemlerden biri destilasyondur. Sabit basınç altında kaynayan sıvı karışımın buharının soğutucudan geçirilerek yoğunlaştırılmasıyla yapılan işleme “destilasyon” veya “damıtma” denir (Sarıkaya, 1997). Bitki uçucu yağlarının kaynama noktası bildiğimiz üzere suyun kaynama noktasından daha yüksektir. Ama iki fazlı sıvı karışımların kaynama noktası, her bir sıvıya ait kaynama noktasından daha küçük derecede olabilmektedir. Bu sayede bitki uçucu yağları destilasyon işlemi ile yapısı bozulmadan destile edilebilmektedir (İzgü, 1973).

Su ile destilasyon (Basit damıtma);

Su sıvısı ile birlikteyken ısı nedeniyle bozulmaya uğramayan bitkilerin uçucu yağları, basit damıtma yöntemi ile elde edilebilmektedir. Bu yöntemle bitkilerden hoş kokulu suda elde edilebilir.

Bitki uçucu yağlarının birçoğunun kaynama derecesi suyun kaynama derecesine göre yüksektir. Fakat uçucu yağların su buharının kısmi basıncının etkisiyle sürüklenmesinden faydalanarak, uçucu yağların normal kaynama noktalarının altındaki sıcaklık değerlerinde de buharlaştırılabildikleri bilinmektedir (Guenther, 1972).

Su buharı ile destilasyon;

Doymuş yapıda, yüksek ısıda ısıtılmış buhar ile ısıtılan bitkisel materyallerle yapılan bir metottur. Suyun buhar destilasyonun da kendi kaynama derecesinde bozuluma uğramakta olan maddeler sıcaklığın düşük derecelerinde, yapıları etkilenmeden destile edilmektedirler. Açık hava veya daha yüksek basınçlarda su buharı destilasyonu uygulanabilmektedir.

Su buharı ile destilasyon süresince, maddelerin bir kısmının dayanıklılıklarını sürdürebildikleri görülmekte, ama bir kısmının ise ısı etkisiyle hidroliz oldukları görülmektedir. Hidroliz olayını en düşük alt seviyede tutmak veya hidrolizi önlemek için hücrelerin zarlarındaki su için buharın difüzyon hızını ayarlamak, damıtma işlemini olabildiğince hızlı yapmak gerekmektedir (Tanker ve Tanker, 1990).

1.1.1.2 Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu

Bu yöntemi, bir çözücü yardımıyla homojen bir karışımdaki maddelerden istenilen içeriğin ayrılması işlemi olarak tanımlayabiliriz. Çözeltilen ayrılmasını istediğimiz maddenin, çözelti ile etkileşmeden, ama maddeyi çözebilen bir organik çözücü ile soğurarak ayırma işlemine dayanmaktadır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi; organik ve su fazlarında çözünebilecek bileşiklerin su ile olan fazlarından organik yapıdaki fazlara aktarılması olayı ile gerçekleştirilmektedir. Genel olarak organik çözücülerin içinde organik madde suya göre daha iyi çözünmektedir. Bu durumdan faydalanılarak su ile çözünen organik madde, organik yapıdaki çözücülere aktarılır. Bu karışım ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildikten sonra ayırma hunisine alınmalı ve içindeki organik çözücüğü ayrıştırarak uzaklaştırılmalıdır (Rousseau, Wiley ve Sons, 1987).

Sıvı-sıvı Ekstraksiyonu Yönteminin Prensibi;

Bu ekstraksiyon yönteminde de herhangi bir sıvı veya katı yapıdaki madde bileşimi içinde bulunabilen ögelerin ya da ögelerden birinin spesifik yapıdaki çözücünden faydalanarak soğurularak ayrıştırılması prensibi kullanılmaktadır. Bu yöneme “çekme” adı da verilmektedir (Rousseau vd., 1987).

Bu yöntem kullanılırken organik çözücülerden yararlanır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu yönteminde faydalanılan en ideal çözücüler şu şekilde sıralayabiliriz; kloroform (CH_3Cl), Di etil eter ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-O-C}_2\text{H}_5$), etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), benzen (C_6H_6), karbon tetra klorür (CCl_4)’dür. Di etil eter($\text{C}_2\text{H}_5\text{-O-C}_2\text{H}_5$), kuvvetli çözücü özelliği ve kaynama noktasının düşük olması nedeniyle, bu çözücüler içinde en fazla tercih edilen olmaktadır (Tahri, Yamani, Legssyer ve Aziz, 2000).

Bu tez çalışmasında çözücü olarak saf su, hekzan ve etanol çözücülerini kullanılmıştır.

Sıvı-sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Araç Gereçler;

Bu yöntemde çeşitli çözücüler ve ayırma hunisi kullanılmaktadır. Ayırma hunisi, öz kütlesi birbirinden farklı sıvıların oluşturduğu emülsiyonları ayırmak için de kullanılmaktadır. Ayırma hunisinin musluk kısımları cam veya teflon, kapakları da cam veya plastik malzemeden seçilebilir (Riehemann, Behnke ve Schulze, 1999).

Yöntemin Yapılışı aşağıdaki gibidir;

Kullanılan ayırma hunisi, oval ya da yuvarlak şekilde olabilir. Büyüklüğünün karışımın toplam hacminin iki katı olması gerekmektedir.

İstenilen bir “A” bileşiğinin su ile çözülmüş çözeltisi var olan. “A” bileşiğini sudan ayırma işlemini gerçekleştirirken;

- Öncelikle ayırma hunisine çözeltimiz, alınmalıdır.
- Sonra "A" bileşenini çözen, suyla karışmayacak çözücümüz ayırma hunisine eklenir.
- Ayırma hunisinin kapağı kapatılmadan ayırma hunisi yavaşça çevrilmeli ve böylece ön karışma sağlanmalıdır. Hunin çalkalanması aşamasında gaz oluşabilmektedir.

- Ayırma hunisinin mutlaka çıkmayacak şekilde kapağı kapatılmalı ve kapak tutularak kuvvetlice çalkalanmalıdır.
- Bu işlem sırasında musluk, içeride oluşan gazın çıkması için arada bir mutlaka açılmalıdır.
- Sonraki aşamada, ayırma düzeneğine ayırma hunisi yerleştirilmelidir. Böylece fazlar birbirinden kolaylıkla ayrılabilir. İşlem sırasında; su ile çözülmüş çözeltilerin içine eklenen eter, benzen gibi organik yapıdaki çözücü suya göre ağır değilse sulu faz altta kalmaktadır. Fakat kloroform, karbon tetra klorür gibi organik çözücüler sudan ağırsa sulu faz üstte yer almaktadır.
- Oluşan fazları ayrı kaplara alma işlemi, ayırma hunisinin musluğu açılarak gerçekleştirilir.

Birbirinden ayrımı belirgin şekilde açık olan fazları ayırınca, su ile organik fazların hangisi altta, hangisinin üstte kaldığına dikkat edilmelidir. Fazlarda karışıklıklar, öncelikle birbirine yakın hacimde fazlar alındığında veya inorganik ve organik maddelerin, organik ve su fazın öz kütlelerinin değiştirildiğinde gerçekleşebilir. Emin olunamadığı durumlarda mutlaka pastör pipet kullanılmalı ve birkaç damla su, pastör pipet den ayırma hunisine eklenmeli, fazların hangi yöne gittiği dikkatlice gözlemlenmelidir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yönteminde, kullanılan çözücünün tümünü bir kerede kullanmak akıllıca değildir. Mutlaka aynı miktar çözücüyu bölerek işlemi birden fazla yapmak verimi artırmakta, böylece istenilen bileşenin tamamına yakın kısmının ayrılması gerçekleştirmektedir (Riehemann vd., 1999).

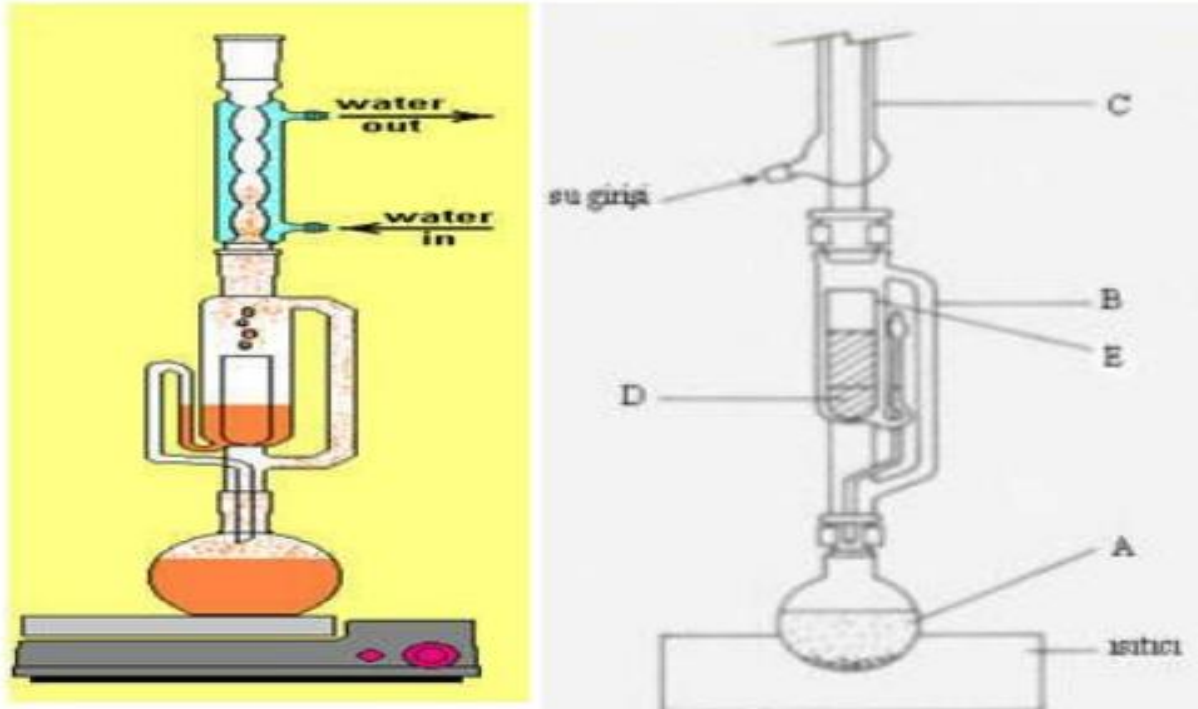
1.1.1.3 Katı -sıvı Ekstraksiyonu ve Soxhlet Ekstraksiyonu

1.1.1.3.1 Katı-sıvı ekstraksiyonu

Bileşen miktarı fazla olan katıların bileşenlerine ait kısımlarının solvent ile çözülmesiyle ayrılmasına “Katı-sıvı ekstraksiyonu” denmektedir. Bu yöntem ise, katı içindeki maddelerden birinin, bu maddeyi çözebilen bir solventten faydalanarak ayrılması temeline dayanmaktadır. Bu işlemde, ayrılan madde ve solventten oluşan sıvılaştırılmış yapı, sıvı olmayan maddenin ayrılarak solventin çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılmasına ve kalıntı olarak ayrılması istenen maddenin kalması olayı ile gerçekleşmektedir (Karakas ve Güvenilir, 2003).

Katı-Sıvı Ekstraksiyonda Kullanılan Malzemeler;

Katı-sıvı ekstraksiyonunda, soxhlet cihazı ve bu cihazın bulunduğu yapıda kullanılan araç-gereçler de yer alır. Şekil 1. 1'de fark edildiği üzere ısıtıcı, organik çözücüyü içeren dibi düz yapıda bir cam balon (A), uçucu yağ veya özütü çıkacak numunenin bulunduğu kartuş (D) bulunmaktadır. Bu kartuş da soxhlet cihazı (B, E) bulunur, bu yapıya takılmış bir geri soğutucu (C) ve yoğunlaştırıcıya bağlı olan su hortumları bulunmaktadır. Özütü çıkarılacak olan madde (D) kartuşu içine, (A) cam balonuna uygun çözücü konulur ve ısıtma işlemi gerçekleştirilir. (B) kısmından geçen çözücü buharları ise (C) soğutucusunda yoğunlaşmakta ve kartuşun (D) içindeki madde üzerine damlamaktadır. Burada bulunan çözücümüz kartuşun içindeki maddeyi çözerek (E) sifonumuzdan (A) cam balonumuza tekrar geri dönmektedir. Bu işlemde kullanılmakta olan çözücünün kaynama noktasının düşük değerinde olması nedeniyle karışımdan almak istediğimiz madde (A) balonunda birikmekte ve çözücünün hareketi sürmektedir (Şekil 1.1). İşlem tamamlandıktan sonra cam balon içinde yer alan çözücü buharlaştırılır ve geriye çözümlenerek ayrılması istenen madde kalmaktadır (Karakaş ve Güvenilir, 2003).



Şekil 1. 1. Soxhlet düzeneği (Karakaş ve Güvenilir, 2003)

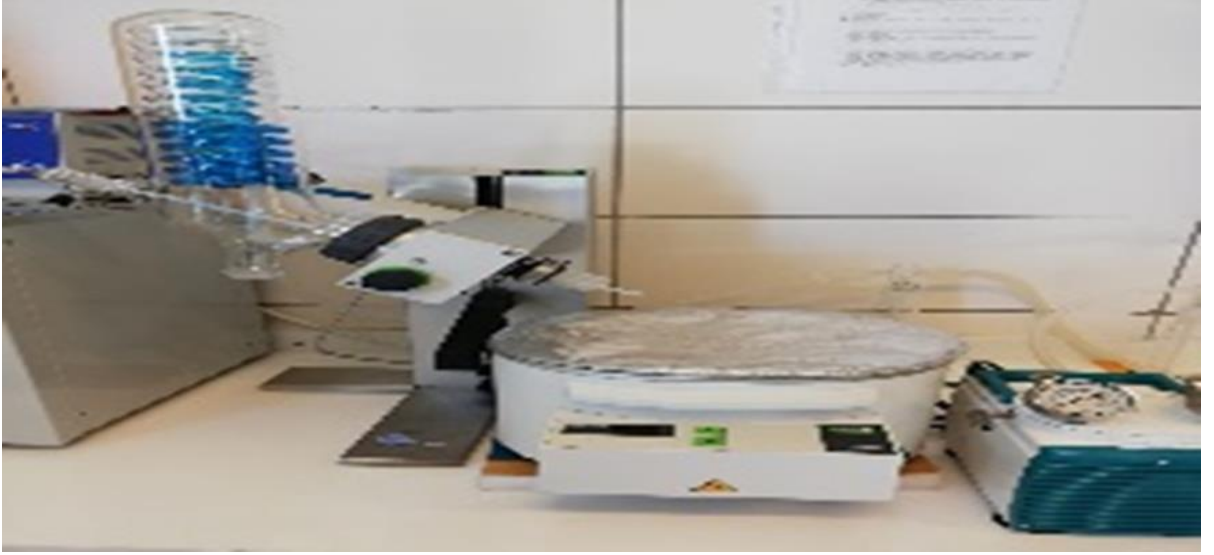
Katı-Sıvı Ekstraksiyonu Yönteminin Yapılışı;

Laboratuvarlarda katı-sıvı ekstraksiyonu işlemi sıkça uygulanmaktadır. Uçucu yağ ve diğer yağ eldesinde, katı-sıvı ekstraksiyonu yöntemi örnek olarak verilebilir. Bu işlem de soxhlet düzeneği kullanılmaktadır. Soxhlet düzeneği; cam balon, ısıtıcı, soğutucu ve ekstraktörden (250 ml) oluşmaktadır. Isıtıcı en alt kısımda bulunur. Isıtıcı, elektrikli veya su banyosu şeklinde olabilir.

Isıtıcının üzerinde, dibi şilifli yuvarlak şekilde olan 250 ml'lik cam balon bulunmaktadır. Cam balon üzerinde ekstraktör ve ekstraktörün üstünde de soğutucu bulunmaktadır. Bu parçalar, hava sızdırmayacak şekildedir, ayrıca şiliflidir. Cam balon haricinde soxhlet düzeneğinin bütün parçalarını bir destek çubuğuna bağlayarak kurulumu sağlanmaktadır. İşlemin başlangıcında örnek özel kartuşa konulmalı ve ekstraksiyon bölmesine yerleştirilmelidir. Cam balonun içine çözücü eklenmeli ve ısıtıcı yardımıyla çözücünün buharlaşması sağlanmalıdır. Buharlaşan çözücü, ekstraksiyon kolundan geçerek soğutucuya ulaşmaktadır. Soğutucuda yoğunlaşan çözücü, damla hâlinde örneğin olduğu kısmın üzerine inmektedir. Soxhlet ekstraktörü, çözücü ile dolunca sifon yapılarak cam balona boşalmaktadır. Böylece kartuşun içinde bulunan örnek maddeyi çözmekte ve beraberinde cam balona gitmektedir. İşlem birkaç kez tekrarlanarak gerekli sifonu yaptıktan sonra karışım cam balondan alınmalıdır. Düşük basınç altında, döner buharlaştırıcıda, çözücü buharlaştırılarak, katı maddeden ekstraksiyon ile elde edilen özüt ise cam balonun içinde kalmış olacaktır (Karakaş ve Güvenilir, 2003).



Şekil 1. 2. Soxhlet Düzeneği



Şekil 1. 3. Döner Buharlaştırıcı

Soxhlet ekstraksiyonunun uygulama alanlarını incelediğimizde; ısırgan bitkisinin ekstraktının eldesi ile romatizmal hastalıklara etkilerini araştıran bir çalışma, Almanya’da 1999 yılı içinde Riehemann vd. tarafınca yapılmıştır. Yaptıkları bu çalışmada ısırgan bitkisinin yaprakları etanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen özütün romatizmal artritleri önleyici etkisinin olduğu görülmüştür (Riehemann vd., 1999).

Isırgan bitkisi ekstraktının natriüretik, hipotensive ve diüretik etkisinin incelenmesi amacıyla Fas’da yapılan çalışmada çözücü olarak su kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, ısırgan bitkisinden elde edilen sulu ekstraktın yüksek tansiyonu düşürücü etkisinin olduğu görülmüştür. Ayrıca elde edilen ısırgan bitkisinin ekstraktının yüksek dozlarda kullanımının ise ölümcül etkiye sahip olduğu da tespit edilmiştir (Tahri vd., 2000).

Sevda Karakaş Mayıs 2003’deki yüksek lisans tezinde (Isırgan Otu Toprak Altı ve Toprak Üstü Kısımlarından Isırgan Otu Ekstraktının Eldesi ve Özelliklerinin İncelenmesi) bu bitkiden elde edilen ekstraktın elde edilmesini ve bu bitkinin ekstraktlarının bileşenlerinin tanımlanmasını, bu bitkiye ait toprak üstü ve toprak altı kısımlarının farklı çözücülerle olan etkileşimini araştırmıştır. Bu tezde elde edilen veriler, ısırgan bitkisinin taze-kuru yaprakları, kök ve tohumları kullanılarak elde edilmiştir. Etanol, metanol, etil asetat ve hekzan çözücüleri kullanılmış ve bunların içindeki en iyi çözücü tespit edilmiştir. Bu bitkinin ekstraktı oluşturulurken, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu olmak üzere üç farklı yöntem ile çalışılmıştır. Çalışılan bu yöntemlerin sonucu oluşan ekstraktlarla

metil esterler hazırlanmış, GC (Gaz Kromatografisi) kullanılarak yağ asitlerinin bileşim yapıları incelenerek, soxhlet ekstraksiyonun, katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyonunun birlikte kullanıldığı yönteme göre daha yüksek verim elde edildiği gözlemlenmiştir. Katı-sıvı ekstraksiyonunun yararlandığı tek metot da Soxhlet ekstraksiyonu sonuçlarına benzer yakınlıkta sonuç vermiştir. Sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyonu işleminde, ekstraksiyon için zaman ilk önce otuz dakika tutulmuştur. Soxhlet ekstraksiyon işlemi ile sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyon işlemlerindeki yöntemleri karşılaştırsak, verimin beklenen oranda yüksek olmamasının nedeninin ekstraksiyon süresinin düşürülmüş olmasından kaynaklandığı görülmektedir. İşlemlere devam ederek ekstraksiyon süresi on iki saat ve yirmi dört saat olarak değiştirilerek sürenin etkisine bakılmıştır. Sonuçta on iki ve yirmi dört saatlik ekstraktların metil esterleri hazırlanmış, gaz kromatografi işleminin yapılmasıyla sonuç da değişiklik tespit edilememiştir. Sonra etil asetat ile çalışılmıştır. Etanol, metanol, hekzan ve etil asetat çözücüleri ekstraktların elde edilmesinde kullanılarak ilgili sonuçlar karşılaştırılıp değerlendirildiğinde, endüstrilerde kullanılmış ısırgan bitkisi ekstraktlarındaki yağ asidi bileşim yapılarına benzer sonuçlarına da etil asetat ve hekzan çözücüleri ile ulaşıldığı tespit edilmiştir (Karakaş ve Güvenilir, 2003).

1.1.1.3.2 Soxhlet ekstraksiyonu

Çeşitli işlemlerde kullanılan bu metot, yarı yarıya katı veya katı örnekler için uygulanmaktadır. Geniş bir kullanım alanı olan eski yöntemlerden biri olduğu bilinmektedir. Solvent şişesi, orta çemberdeki bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansörden (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden oluşan bir yöntemdir. İşlem yapılacak örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesine yerleştirilir. Çözücü, ekstraksiyon bölmesinin altındaki çözücü şişesinin içine konulur. Kaynama noktasının üzerinde çözücü ısıtılır. Kaynamakta olan çözücünün buharları yoğunlaşarak kondansatöre doğru hareket eder ve örneğin üzerine damlama gerçekleşir. İşlem sırasında çözücü yoğunlaşarak örneği ıslatmakta ve çözücünün seviyesi sifonun tepesine ulaşmakta ve çözücü tüm örnek bölmesini doldurmakta ve çözücü şişesine geri damlamaya başlamaktadır. Bu işlemde sıcak çözücü, birden fazla işlem tekrarlanarak örnek içinde devir etmektedir. Ekstraksiyona uğramış analitler, çözücüye ait şişenin içinde kalabilmekte, yalnızca temiz yapıdaki çözücü buharlaşma sürecinde olduğundan, her devirde yeni çözücü kullanılmaktadır. Ekstraksiyon zamanını ve devir sayısını raporlamak sonucu daha iyi bir karşılaştırmak için önem arz etmektedir. Genelde tipik ekstraksiyon süresi altı saatten yirmi dört saate kadar olmalıdır. Ayrıca fazla çözücü hacimlerinin (100-500 mL) bilinmesi gerekmektedir. Genellikle ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücüler, saf organik

çözücüler saf organik çözücüler veya bu organik çözücülerin karışımlarından oluşmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonu, organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda temel olarak kullanılan bir yöntemdir. Mutlaka bileşiklerin, çözücünün kaynama noktasındaki sıcaklıkta kararlı olmaları gerekmektedir. Soxhlet cihazı çok düşük maliyetle bir cihazdır. Bu cihaz, eşzamanlı ekstraksiyona izin vermektedir. Soxhlet cihazının kullanılması sırasında örnek bölmesinin temizliğinden kaynaklanan problemler görülebilir. Soxhlet cihazı kullanım öncesinde, temiz bir çözücü ile ekstrakte edilerek cihaz temizlenmelidir. Soxhlet ekstraksiyon cihazı, çok iyi avantajlara sahiptir. Sürekli olarak taze çözücü ile bitki örneği temas içinde olup, matriksten içeriğin uzaklaştırılmasını sağlar. Damıtma balonuna ısı uygulandığında, ekstraksiyon kavitesine ulaşılır ve sisteme ait sıcaklık oda sıcaklığına göre daha yüksek sıcaklıkta gerçekleşir. Böylece sistemimiz bu sıcaklıkta değişim geçirmeden kalabilmektedir. Sonuçta, özütleme işlemi sonrası filtrasyon işlemine ihtiyaç kalmamakta ve örneğimizden üretilmiş maddenin miktarını, birden fazla ekstraksiyonu art arda yapılarak arttırılabilme imkânı bulmuş olunur. Bu yöntem, düşük maliyetli, basit araç gereç kullanımı ve çaba gerektirmeyen basit bir metot olması nedeniyle önemlidir. Günümüzde kullanılan süperkritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi alternatiflerine göre daha fazla kütlede örnek ekstrakte elde edilmesi açısından fark yaratmaktadır (Diagne, Foster ve Khan, 2002; de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Soxhlet Ekstraksiyon Uygulamaları;

Soxhlet ekstraksiyonu besin analizlerinde ve çevresel analizlerde de kullanılmıştır. Falandysz, Wyrzykowska, Warzocha, Barska, Garbacik-Wesolowska ve Szefer, 2004'de balıklarda bulunan poliklorlu bifenilleri bu işlemle analiz etmişlerdir. Balıklara ait kas dokuları alınarak homojenize edilmiş, petri kaplarında dondurularak liyofilize edilmiş ve hekzan ile Soxhlet cihazının gelişmiş bir versiyonu analiz için kullanılmıştır. Analiz işlemi, elektron yakalama-gaz kromatografisi detektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Falandysz vd, 2004).

Diagne vd. 2002'de, Soxhlet ekstraksiyon metoduyla fasulyeler kullanarak organofosforlu bir kimyasal olan insektisit aracılığı ile fenitrotiyon kalıntılarını ekstrakte edebilmişlerdir. On gram örneğe, yirmi dört saat boyunca 200 mL diklormetan ile çözücünün kaynama noktasında işlem uygulanmıştır. İşleme devam edilerek çözücü uçurulmuş, zenginleştirilmiş örnek HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve GC-ECD ile analiz işlemine tabi tutulmuştur (Diagne vd., 2002).

Soxhlet Ekstraksiyonunun Avantaj ve Dezavantajları;

Diğer katı örnek hazırlama yöntemleriyle soxhlet ekstraksiyon yöntemini karşılaştırsak bu yöntemin fark edilir dezavantajı, sonuç almak için uzun süreyi gerektirmesi ve miktarda fazla organik çözücü kullanımı gerektirmesidir. Ayrıca bu yöntemde, fazla miktardaki çözücünün zararsız hale getirilmesi pahalı ve çevresel problemlere neden olabilmektedir. Genellikle örnekler (numuneler) çözücünün kaynama sıcaklığında uzun zaman alan ekstraksiyon işlemine tabi tutulur. Ayrıca, ısı yönünden kararsız olan bileşenlerin, geçen zamana göre zarar görmesi de söz konusudur. Genellikle bilinen soxhlet cihazı, süreci hızlandıran çalkalama işlemini yapmamaktadır. Ama bu işlemde, fazla miktarda çözücü kullanılmakta olup, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma işleminin yapılması gerekmektedir. Otomasyonu zor olan soxhlet cihazıyla bu yöntem de işlem sırasında çözücü seçiciliğini kısıtlamaktadır (de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998; de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Soxhlet ekstraktörlerinin benzer prensiplere sahip olan modern yöntemleri de günümüzde yer almaktadır. Bunlar; ses dalgaları destekli soxhlet ekstraksiyon, mikrodalga destekli soxhlet ekstraksiyon, otomatikleştirilmiş soxhlet ekstraksiyon, basınçlı soxhlet ekstraksiyonudur. Bu ekstraksiyon yönteminin uzun yıllardır kullanılması bu yöntemin güvenilirliğini ve avantajını ispatlamıştır.

Avantajları aşağıdaki şekilde maddeleştirip, kısaca açıklayabiliriz;

1. Basınçlı Soxhlet ekstraksiyon işleminde, numunenin konulduğu kartuş kısmına uygulanan basıncın artırılmasıyla, çözücünün katı numuneye etki etmesi daha da kullanılabilir olmasını sağlamıştır. Ve numunenin ekstraksiyonunda kullanılan çözücü hacmi azalmış, ekstraksiyon süresi de kısalmıştır.

2. Otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyon işleminde kullanılmış başka özelliklere sahip ticari amaçlı ekstraktörlerin ortak yönü: birkaç numunenin eş zamanlı ekstraksiyonuna olanak sağlamış olup, aynı zamanda ekstraksiyon süresini kısaltıp, çözücü hacmini azaltmış olmalarıdır. Bu cihazların en önemli kusuru yüksek maliyetli olmasıdır.

3. Ultrasonik enerji ve mikrodalga ile ekstraksiyonun desteklenmesi, Soxhlet ekstraksiyonunun eksiklerinin giderilmesinde iyi bir alternatif olmuştur (de Castro ve Priego-Capote, 2010).

1.1.1.4 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE)

Ekstraksiyon yöntemlerinde diğer yöntemlerdeki gibi enerji tasarrufu, kapasite kullanım oranı ve maliyetin azaltılması gibi problemler ile verim artışı, işlemin hızlı yapılması, kaliteli ürün gibi faktörler önem arz etmektedir. Solvent ekstraksiyonunda maliyeti fazla olan organik solvent kullanılması, ekstrakt içinde solvent kalması, işlem zamanının uzun sürede gerçekleşmesi ve bu süre de bozunma riskinin artması sebebiyle bilim insanlarını farklı yöntemlere yönelmiş ve son yıllarda zehirli etki oluşturmayan, yüksek fayda sağlayan, çevreci özellikleri sebebiyle süperkritik akışkanlar daha da önem kazanmıştır (Çolak ve Tülek 2003; Kaya ve Ergönül, 2015). SAE, oksidasyonu ve bozunma işlemi olmadan gerçekleştiği için ekstrakte olan ürünlerin; özellik, koku ve saflık derecesi bakımından diğer metotlarla elde edilen ürünlere göre kalitesinin yüksek nitelikli olduğu görülmüştür. Bu faktör, bu yöntemi diğer yöntemlere göre üstün kılmakta ve tercih edilmesine neden olmaktadır (Başer, 2010). SAE metodunun temel prensibi, akışkan formda süperkritik çözücülerin kullanılmasıdır. Süper kritik akışkan; bir maddenin sahip olduğu basınç ve kritik sıcaklık değerinin üzerine getirilmesi ile oluşmaktadır. Süper kritik akışkan durumdaki madde, gaz veya sıvı değildir. Süper kritik akışkan durumdaki madde, düşük basınç ve yüksek sıcaklıkta akışkanın öz kütlesi düşük olacağından gaz gibi davranacakken yüksek basınç ve düşük sıcaklıkta akışkanın öz kütlesi artacak ve sıvı gibi davranış göstermeye başlayacaktır (Başer, 2010).

Süper kritik akışkan durumdaki madde, süperkritik koşullarda hem gazın hem de sıvının özelliğini taşır. Ayrıca bu madde, sıvılar gibi çözme ve yüksek öz kütle gücüne sahiptir. Gazlar gibi sıfır yüzey gerilimine ve düşük viskoziteye sahiptir (Büyüktünel, 2012). Bu maddenin yayılma gücünün yüksek, viskozitesinin düşük olması katılarda tepkimelerde istenilen derişime ve kolay difüzyona ulaşılmasına olanak vermektedir. Süper kritik akışkan durumdaki maddenin viskozitesinin (akışkanlığının) düşük olması nedeniyle işlem sırasında pompalama için gerekli olan enerji tasarrufu oluşmaktadır (Çolak ve Tülek, 2003). Süperkritik akışkanın, sıvı ve gazın özelliklerini taşıması nedeniyle ekstraksiyon esnasında maddelerin seçici olarak ekstrakte edilmesine olanak sağlar (Başer, 2010; Kaya ve Ergönül, 2015). Süperkritik akışkanlar, biyokimyasal ürünler için hekzan, propilen, propan, amonyak, etan, etilen, karbondioksit, nitrozooksit, klortriflormetan, triflormetan gibi maddelerdir (Çolak ve Tülek, 2003; Başer, 2010). Bazı süper kritik akışkanların amonyak gibi zehirli olması nedeniyle gıdalarda kullanımı kısıtlandırılmıştır. Patlayıcı özelliğe sahip olan propan gibi akışkanların çoğu biyolojik uygulaması CO₂ kullanımı ile sınırlanmıştır (Çolak ve Tülek, 2003). Endüstride gıdalardan zararlı maddelerin arındırılması, terpenleri alınmış narenciye yağı elde edilmesi, kahveden

kafein elde edilmesi gibi pek çok alanda süperkritik CO₂ ekstraksiyonu kullanımı yaygındır (Başer, 2010). Kaya ve Ergönül (2015), nandeden uçucu yağ eldesinde soxhelet ekstraksiyonu (SE), su destilasyonu (SD) ve SAE tekniklerini verim açısından karşılaştırarak, verimi SE yönteminde %8,17, su destilasyonu yönteminde %3,19 (w/w), SAE de ise %3,57 olarak tespit etmişlerdir.

Ekstraksiyon yöntemi, kimyanın alt dallarında uygulanması öncelikle tercih edilen metottur. Ekstraksiyon yöntemi genelde, katı karışımlardaki maddelerin ayrılması veya çözücülerde çözülmüş halde bulunan maddelerin ayrılması için kullanılmaktadır. Solvent ekstraksiyonu, özellikle oksijenli bileşiklerin ve bitki uçucu yağlarının elde edilmesinde kullanılan en etkili tekniklerden biridir. Bu ekstraksiyon yöntemi, zenginleştirmenin yapıldığı işlemlerde de kullanılmaktadır. Genelde zenginleştirme işleminde SPE kullanılmaktadır. Daha az organik çözücüye ihtiyaç duyulması, ucuz, hızlı ve basit olması nedeniyle Katı faz ekstraksiyonu metodu daha çok tercih edilmektedir. Çevre kirliliği açısından katı faz ekstraksiyonu; İyon değiştirme ve çözücü ekstraksiyonu yöntemlerine göre daha az miktarda organik solvent ihtiyacı nedeniyle, daha az risk oluşturmaktadır (Çolak ve Tülek, 2003).

1.1.2 Antibakteriyel Etki Çalışmalarında Kullanılan Metotlar

1.1.2.1 Antimikrobiyal Aktivite Tayin Metotları

Bakteriler üzerinde antibakteriyel maddeler: hücre duvarı ve protein sentezinin inhibisyonunda, bakteri hücresinin sitoplazma zarının yapısının ve fonksiyonunun bozulmasında, nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulmasında, kimyasal yapılardaki benzerlikleri ile metabolizmasının bozulmasında kullanılır (Akyüz, 2007).

Antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar çok değişik şekilde duyarlılık göstermektedirler. Bu duyarlılık, mikroorganizmaların türüne ve antibiyotiklerin yapısına göre değişim göstermektedir. Bu nedenle koruma amaçlı ve sağaltım için kullanılan antimikrobiyal ilaçların, özel hastalık etkenlerine karşı statik ve/veya sidal etkilerinin iyi tespit edilmesi gereklidir. Ayrıca ilaç seçilimin de yeterli zaman ve doz ayarlanarak, planlı bir şekilde kullanılması gerekir. Mutlaka süreç takip edilmelidir. Bazen enfeksiyonlardan birincil etken yerine ikincil mikroorganizmalar izole edilmelidir. Bu şartlarda, hastalığın temel etkenine karşı değil de ikincil ajan hassasiyetine göre seçilmiş antibiyotiklerin kullanımı tercih edilmekte ve

genelde bir yarar sağlanmamaktadır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı hassasiyetinin tespitinde başlıca dilüsyon ve difüzyon yöntemi kullanılabilir (Akyüz, 2007).

1.1.2.1.1 Dilüsyon yöntemi:

Bu yöntemle organizmaların antibiyotiklere karşı hassasiyetini belirlemek için çalışılır. Yöntemde, antibiyotikler sıvı ya da katı (agarda dilüsyon) besi yerlerinde bir seri yapıda seyreltilir ve seyreltme ortamlarına, hassasiyeti tespit edilecek bakterinin belirli sayıda hücre bulunduran süspansiyonundan eşit madde ilavesi yapılır. Deneylein serilerinde, 35-37°C' gibi uygun sıcaklıkta, 16-20 saat gibi uygun zaman sürecinde bakterilerin üremesi için beklenerek, bakterilerin üremesini engelleyen en az antibiyotik miktarı MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değeri tespit edilebilmektedir. Bir bakterinin gelişimini en az düzeyde durduracak konsantrasyona "Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)" denir. Antimikrobiyal özellikteki maddelerin kullanılan organizmada hangi konsantrasyon da etkili olabileceği üreme olayının yokluğuna ya da varlığına göre tespit edilmektedir. Süspansiyonun tüplerin içinde bulanık görölmesinin sebebi; Antimikrobiyal özellikteki madde konsantrasyonunun, inhibitör konsantrasyonunun altında olmasıdır. Antimikrobiyal özellikteki madde konsantrasyonu, inhibitörün konsantrasyonundan yüksek ya da eşit ise tüplerdeki süspansiyon berrak görölmeaktadır (İşcan, 2002).

1.1.2.1.2 Difüzyon Yöntemi:

Difüzyon yöntemi, difüzyonun olduğu mesafe kadar test mikroorganizmaları inhibe olmakta ve test materyalinin agarda difüzyon olması temeline dayanmaktadır. Disk difüzyon ve çukur agar difüzyon yöntemleri olarak isimlendirilen iki alt grubu bulunmaktadır. Yöntemler arasındaki tek fark; çukur agar testin değeriendirilen madde agar üstünde açılan standart çukurlara yerleştirilirken, disk difüzyonda emdirilen kâğıt disk ile beraber agar üstüne yerleştirilmesidir. Genelde kâğıt disklere antibiyotikler belirli konsantrasyonlarda emdirilmekte ve bu işlem sonucunda oluşan malzemeler antibiyotik kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde Kirby-Bauer yöntemi de denilmektedir. Bu yöntemde; antimikrobiyal ajanların belirli bir miktardaki kâğıt diskleri test mikroorganizması kullanılarak hazırlanmış standart süspansiyonların yayılarak bulunduğu agar plak yüzeyinde yerleştirilmektedir. Bu işlemin sonucunda diskte bulunan antimikrobiyal özellikteki madde besiyeri içine yayılmakta, bakteriyi etkilediği düzeyde üreme olayını engellemektedir. Bu işlemle birlikte, diskin etrafında bakterilerin üreme gerçekleştirmediği yuvarlak zon içeren alanın oluştuğu görölmeaktadır.

Difüzyon yönteminde değerlendirme, disk etrafında meydana gelen üremenin olmadığı alanının çapının milimetre (mm) olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir (İşcan, 2002).

1.1.2.2 Antibakteriyel Etki Çalışmalarında Kullanılan Agar Difüzyon Metotları

1.1.2.2.1 Agar Disk Difüzyon Metodu:

Bu yöntem, uçucu yağlarda antibakteriyel etki çalışmaları sürecinde tercih edilen yöntemlerdendir. Bu yöntemde 5-6 mm'lik filtre disklerle uçucu yağa ait belirli konsantrasyonlar (0.5, 1, 2, 5, 10, 20 mg/ml vb.) emdirilir ve bakteriyle inokule olan petri kaplarının üstüne yerleştirilir. Bakterilerin türlerine göre değişse de genelde belirli bir süre inkübasyon olayından sonra meydana gelen inhibisyona ait zon milimetre (mm) olarak ölçülür (Şekil 2.1). Etki gösterdiği en düşük konsantrasyon miktarı (MİK) da mg/ml olarak hesaplanmaktadır (Azaz, İrttem, Kürkcüoğlu ve Can Başaer, 2004).



Şekil 1. 4. Petriye yerleştirilmiş disk ve engelleme zonu (Altundağ ve Aslım, 2005).

1.1.2.2.2 Agar Kuyu Difüzyon Metodu:

Bakterilere karşı kullanılan çalışmalarda en çok tercih edilen yöntemdir. Bu işlemde ekstraktlar tartılarak, ml de 10 mg dimethyl sulphoxide içeren PBS (phosphate buffered saline pH değeri 7.0-7.2)'de eritilir ve 0.45 µm'lik membran filtre kullanılmasıyla birlikte sterilizasyon işlemi yapılır. 10⁶ cfu/ml yoğunlukta hazırlanmış bakterinin stok solüsyonuyla inoküleli agarı oluşturulur. Oluşan agar üzerinde 7-8 mm çapında kuyular açılır (Şekil 1.5), uçucu yağa ait stok solüsyondan 50-100 µl damlatılır. İnkübasyon işlemi gerçekleştirilince inhibisyona ait zon (Şekil 1.5) ölçülür ve milimetre olarak değerlendirilir (Bektaş, Daferera, Sökmen, Polissiou ve Sökmen, 2004).



Şekil 1. 5. Agar üstüne kuyu açma ve engelleme zonu (Altundağ ve Aslım, 2005).

1.1.3 Tıbbi Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanımı

Medeniyetimizin çok eski tarihine dayanan tıbbi bitkilerle tedavi yöntemleri geçmiş de birçok süreçte kayıt altına alınmış olup, büyüyen bir kullanım alanı ile gelişimini sürdürmektedir. Antik çağlardan beri bitkisel tedavi için kullanılmış bitkilerin sayısı, sürekli olarak artış halindedir. Kullanılan bitkisel drog miktarının, Mezopotamya uygarlığı döneminde 250 (İki yüz elli) civarında olduğu bilinmektedir. Eski Yunanlılar döneminde ise 600 (Altı yüz) civarında tıbbi kaynaklı bitki tanınmaktadır. Arap-Fars uygarlığı zamanında tıbbi bitki sayısının 4.000 (Dört bin) civarında olduğu görülmüştür. Bilinen tıbbi bitki miktarı, 19. yüzyılın başlarında 13.000 (On üç bin) sayısına ulaşmıştır (Tan, 1992).

Tıbbi açıdan önemli bitkiler, dünyadaki ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de yüzyıllardır yerel toplum içinde hastalıklar açısından tedavi sürecinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıbbi olarak bitki çeşitliliği bakımından Türkiye, önemli ve çeşitçe yoğun floraya sahip bir ülke konumundadır. Türkiye açısından flora zenginliğinin nedeni; üç fitocoğrafik bölge için kesişen bölgede yer alması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya floraları arasında köprü oluşturması, sayıca çok miktarda cins ve seksiyonun köken ve farklılaşım merkezleri açısından Anadolu’da bulunmasıdır. Ayrıca fitocoğrafik ve ekolojik farklılaşma nedeniyle tür endemizminin çok yüksek olması da bu sürece katkı sağlamıştır (Tan, 1992).

Yapay (sentetik) kökenli maddelerin son yıllarda üretilmesi nedeniyle organizmalarda yan etkiler daha fazla görülmekte, antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı organizmalar özellikle direnç gösterebilmekte, natürel bitki kaynakları ve bu içerikleri taşıyan tıbbi tedavide kullanılan bitkiler bu yüzden çok önemli hale gelmektedir (Nakipoğlu ve Otan, 1992).

Sağlık problemlerini, gelişen ülkelerdeki insanların %80'ni geleneksel tıbbi bitkileri kullanarak çözmeye çalışmaktadır. Dünyadaki insanların %80'ni ise gelişmekte olan ülkeler de yaşamaktadır ve dünya toplam insan nüfusunun %64'ü tıbbi bitkileri tedavi için kullanmayı seçmektedir. Dünyada reçetelerle satılan ilaçların tahminen %25'i gelişmiş ülkelerde, bitkisel orijinli kimyasallardan meydana gelmektedir (Principe, 1991).

Alkolitler, hastalık tedavilerinde kullanılmakta olan bitkiler için öncelikli biyolojik kökenli aktif maddelerinden biridir. Alkolitler, organik azot içeren bileşiklerden olup, bazik ve çok fazla yakıcı özelliktedirler. Suyun içinde erimemekte ve değişik asitler ile tuz oluşturmaktadırlar. Tadı acı ve bazı türevleri ise zehirli özelliktedir. Bunun için bu maddelerin bileşimi çok önemlidir. Fakat bitkiler için asıl tedavi eden bileşikler, içeriğindeki glikozitlerin kaynatılması ile ve bölünmesi ile oluşan aglikonlardan kaynaklanmaktadır. Aglikonlar, suda çözünemeyen, sindirimi güç olan bileşiklerdir. Ayrıca Aglikonlar, glikozitlerin yapısında yer alan şeker ile aktivite olmaktadır. Yapılarında buldukları bitkilere göre, bölündükleri glikozitler açısından farklı özellikler oluşturmaktadırlar. Ayrıca her bir aglikogan türevi çeşitli ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Genelde bitkilerin tedavi özelliği olmaları bir maddeye değil maddelerin karmaşık karışımlarına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Çeşitli besin maddelerine değişik koku ve tat vermek için kullanılmakta olan soğan, hardal ve farklı kekik türleri, sarımsak gibi birçok kokulu, baharatlı bitkilerin antimikrobiyal aktivitede olabilecekleri tespit edilmiştir (Beuchat, 1976; Zaika ve Kissenger, 1981; Aureli, 1992; Pandit, 1994; Sivropoulou, 1996; Marino, 1999; Tassou, 2000).

Günümüzde tıbbi kaynaklı bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır. Bu çalışmaların nedenleri şunlardır;

1. Yetersiz seviyede kimya bilimi bilgisi ve uygulamasına sahip olan, gelişen ülkelerin, ülkelerindeki bitkileri kullanarak, pahalı olmayan ve kolay tedavi imkânı sağlamak istemesi,
2. Tedavi de kullanılan yeni yapay bileşiklere ait bazı çeşitlerin tıbbi açıdan tehlike oluşturacak yan etkilerinin olması.
3. Kullanılan ilaçların ilkel kaynaklı maddeleri, bitki kaynaklı drogların, yapay olanlarından daha kolay ve ucuz maliyette olması,
4. Bitki kaynaklı drogların, birkaç etkiye birden sahip olmaları nedeniyle üstünlüklerinin olması, yapay bileşikler ise genellikle tek etkiye sahiptir.

Bitkilerin ekstraktlarını kullanmak her açıdan daha etkili, basit ve güvenlidir. Günümüzde bu bitkilerden, arzu edilmeyen bileşenler uzaklaştırılabilmekte, istenen bileşenler daha çok ve saf miktarlarda elde edilmektedir. Süper kritik CO₂ ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu, çözücü ekstraksiyonu ve buhar distilasyonu, bitkisel ekstraktları elde etmede kullanılan yöntemlerdir. Kozmetik ve tedavi amacıyla, bu yöntemler yoluyla elde edilen ekstraktlar; antimikrobiyal, antioksidatif ve antiseptik özellikler taşımaktadırlar. Öncelikle soxhlet ekstraksiyonu en yüksek verimi elde etme açısından daha ön plana çıkmaktadır. Papatya, adaçayı, kekik, nane, kuşburnu ve ısırgan bitkisinin ekstraktları, süper kritik CO₂ ekstraksiyonu, çözücü ekstraksiyonu ve buhar distilasyonu yöntemleri ile elde edilmiştir. Ama en fazla verimliliğinin soxhlet ekstraksiyon yönteminde sağladığı görülmüştür. Bitki kaynaklı ekstraktları hazırlama işleminde; bitkilerin yaprakları, kökleri ve tohumları gibi çeşitli bölgeleri kullanılmış ve bu ekstraktların özelliklerinin birbirinden farklılık gösterdiği görülmüştür. Ekstraksiyon işleminde; yapraklar ve köklerden elde edilen ekstraktlar bitkilerin tohumlarından elde edilen ekstraktların yağ asidi içeriklerinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Karakas ve Güvenilir, 2003).

1.1.4 Bitkisel Ekstraktların Yağ Asidi İçerikleri

Yağ asitlerinin içeriği, bitki kaynaklı ekstraktların özellikleri açısından anlaşılmasında önemlidir. Ayrıca yağ asitleri, bilinen endüstriyel bileşenlerdendir; tıpta, kozmetikte, tekstil sektöründe ve gıda endüstrisinde çok fazla kullanılır. En fazla bilinen yağ asitleri; bitkisel ekstraktlarda bulunan linoleik ve linolenik asitlerdir. Linolenik asit, özel hastalıklara karşı etkili, en önemli yağ asidi çeşididir. Deri hastalıklarında, egzama ve adet ağrılarında, Linolenik asit kullanılmaktadır. Sinir sistemi için kullanılan prostoglandin ve kan dolaşımında ATP kaynağı, hormon ve metabolizma düzenleyicisi olmasından, mide özusunun fazlaca üretilmesini engellemesinden dolayı Linoleik asit, çok önem arz etmektedir (Rafajlovska, 2001; Mukhopadhyay, 2000; Dey, 1997).

Yaprak ve kök ekstraktlarına göre yağ asidi içeriği açısından, bitki tohumlarından elde edilen ekstraktlar daha çok miktardadır. Kuşburnu tohumundan elde edilen ekstraktın içeriğinde %55 linoleik asit (C18:2); %25 linolenik asit (C18:3) ve %15'inde ise Oleik asit (C18:0) yağ asitleri bulunmaktadır.

İlaç yapımında bileşen, proseslerde yardımcı madde ve aktif ilaçların yapımında yağ asitleri tıpta kullanılmaktadır. Oleik asit, etil oleat, stearik asit, sorbitan monooleat, sodyum

stearat, sorbitan monostearat, sorbitan trioleat, gliseril monostearat tıpta kullanılan başlıca yağ asitlerindendir. İlaç sektöründe kullanılanlar, çeşitli virüslerin ve antibiyotiklerin üretiminde tam başarı gösterememiştir. Ama bunlar, antibiyotiklerin ve çeşitli virüslerin aktivitelerini arttırmaktadır. Penisilinin üretimini sürecinde köpük oluşumunu düşürmekte olan oleik asit, antibiyotiklerin verimliliğini artırmaktadır (Pattison, 1968).

Yağ asitleri ilaç yapımında kullanılırken; dağıtıcı, çözme işleminde yardımcı ve kararlı olmayı sağlayıcı olarak görev almaktadırlar. Polioksietilen sorbitan monooleat, antiseptikler, vitamin, steroid hormon gibi maddeler suda çözünmeyen yapılar için çözünme işlemine yardımcı olabilmektedirler. Stearik ve Oleik asitlerin monogliseritleri suda dağıtıcı özellikte yer alır. Bakterisit, germisit, fungusit ve nematoksik ajanlar gibi uygulamalar için aktif ajan olarak yağ asitlerinin görevleri vardır. İnsan derisindeki bakterilerin azalmasında; Palmitik, stearik ve Laurik asit, gibi yağ asitlerine ait neomisin tuzlarının Gram (+) ve Gram (-) organizmalara ait inhibisyonda, tercih edilmektedirler (Pattison, 1968).

1.1.5 Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri

1.1.5.1 *Enterococcus faecalis*

Hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan bakterilerden biri de *E. faecalis*'tir. Bu bakteri insan bağırsağında normalde komensal olarak yaşayan bir bakteri olmakla beraber yaşamı tehdit eden hastane kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra, endokardit, bakteriyemi idrar yolları enfeksiyonları ve yara enfeksiyonu gibi enfeksiyonlara da sebep olmaktadır.

E. faecalis, Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olmakla enterokoklarla mücadele için önlem alınması gerektiğini göstermiştir (Giridhara Upadhyaya, Ravikumar ve Umopathy, 2009).

Enterokoklar; tek, çift veya zincir şeklinde olan sporsuz, katalaz ve oksidaz negatif, fakültatif anaerobik, gram pozitif koklardır. Enterokokların üremeleri; 10- 45°C', %5-10 NaCl'lü ortamında, pH 4-9.6 ara değerlerinde gerçekleşir. Bu nedenle başka Gram (+) kokların içinden ayrılmaktadırlar (Foulquie Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou, De Vuyst, 2006).

Enterokoklar, insanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *E. faecalis*, insanlara ait enterokok kaynaklı enfeksiyonları açısından %80-90 oranında neden teşkil etmekte, diğer %10-20 enfeksiyonlara ise *Enterococcus faecium* bakterisi sebep olmaktadır. Fermente süt ve

et ürünlerinin olgunlaştırılması aşamasında *E. faecium* laktik asit bakterileri ile beraber kültür olarak kullanılabilmektedir (Güçkan, Elmas, Tigel ve Yüksel, 2012).

1.1.5.2 *Escherichia coli*

E. coli; 1.0-1.5 µm eninde, uçları yuvarlak, dümdüz yapıda olan çomakçık şeklinde, 2-6 µm boyunda ve Gram (-) bakterilerdendir. Hareketleri çok hızlı değildirler, hareketsiz olarak da görülebilirler. Sporları yoktur. Ayrıca fakültatif anaerob bakterilerdir. Bu bakterilerin, uygun pH değerleri 7-7.2 ve uygun üreyebilme ısıları 37 °C' olarak gerçekleşir. Ayrıca, sıcaklığa dayanıksızdırlar, 55 °C'ye 60 dakika ve 60 °C' sıcaklığa ancak yirmi dakika dayanabilmektedirler. İnsanların ve sıcakkanlı canlıların kalın bağırsaklarında bulunmaktadır. Esasen normal bağırsak florasında yer alırlar. Bağırsak florasında, dengeli bir halde kalırlarsa enfeksiyon oluşturmazlar. Fakat bazen bağırsak kanalının dışına çıkarak diğer dokulara geçiş sağlayarak enfeksiyonlara neden olurlar (Bektaş vd., 2004). *E. coli*, gıda kökenli hastalıklarda en büyük etken olarak rol oynamaktadır. Bu hastalıklardan bazıları, sinüzit, kalp zarı iltihabı, akciğer iltihabı, kemik iliği iltihabı, prostat iltihabı, beyin iltihabıdır (Başustaoğlu, 2002).

1.1.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer almaktadırlar. Doğada, bu bakteriler suda ve toprakta yoğun olarak bulunmaktadır. Bazı türleri ise bitki, insan ve hayvan patojenidir. *Pseudomonadaceae* familyasında, bu cinsin türlerinden bazıları oksidaz (-) bazıları, oksidaz (+)'tirler. Fermantasyon yapmamakta ve glikozu ise oksidasyon yoluyla parçalayabilen bakterilerdir. *Pseudomonadaceae* familyası türlerinin tamamı, oksijenli ortamda yaşayan, polar flagellasıyla hareket edebilen, Gram (-), katalaz (+), çubuk şeklindeki, polar flagellasını kullanarak hareketini sağlayan bakterilerdir. Bu bakteriler, besinler açısından önemlidirler. Bazıları lipolitik ve proteolitik faaliyet gösterir. Oksijenli ortamda yaşamaları sebebiyle besinlerin üzerinde çabuk gelişerek, okside olan ürünler ve mukoz kıvamda madde meydana getirirler. Kendilerinin gelişimleri açısından ihtiyaç olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri üretebilme yeteneğine sahiptirler. Mezofil, psikrotrof ve psikrofil türleri bulunmaktadır. Soğuk ortamda bulunan süt, yumurta, et ve deniz ürünlerinin temel bozulma nedenidirler. Radyasyon ve ısıyla kısa sürede inhibe olabilmeleri özelliği gösterirler. Ortamda oksijen bulunmadığında ve 42 °C'nin üzerinde üreme yetenekleri yoktur. Kurumaya karşı dirençleri zayıftırlar. Bazen besinler üzerinde *Pseudomonas nigrificans* siyahımsı, *Pseudomonas fluoresans* yeşil, diğer

Pseudomonas türleri ise kahverengimsi renk pigmenti oluşturmaktadır. Bu cinsin üyeleri birçok antibiyotiğe karşı dirençlidirler, fakat birkaç bakterinin ancak yaşayabildiği ortamlara rağmen canlı yapılarını sürdürebilmektedirler. Bu sebeple klinik değerlendirmelere göre bu bakteriler önem arz etmektedirler (Ayhan, 2000).

Sütün içine bulaşan *Pseudomonas*'ların süt içinde hızlıca üreyerek, çeşitli mayalanma olaylarına, yapısal bozulmalara sebep olacağını ve bu işlemin sonucunda süt de renk, koku, yapı ve kıvamda birçok değişikliğe uğramakta olabileceği değişik kaynaklar da yazmaktadır. Süt içindeki *Pseudomonas*'lar sütte tazeliği bozarken birçok enfeksiyona sebep olmaktadır. Örneğin; fırsatçılık özelliğindeki patojen, *P. aeruginosa*, sütte çok fazla tüketim gösteren 0-3 yaş grubu çocuklar için, kullanılan kaplarda temizliğe itina gösterilmezse, ortama yayılarak hastalık ve salgına neden olabilmektedir (Özan,1996).

Ortamin müsait olduğu besiyerlerinde uygun olan 30-37 °C' de ve hafif alkali olan ortamlarda, *P. aeruginosa* gelişir. *P. aeruginosa*'nın önemli özelliği; 41 °C'de ve arka arkaya 3 pasajda 42 °C'de üreyebilmesidir. Bu özellik *P. aeruginosa* için, *P. fluorescens* mikroorganizmasından ayırt edici bir özelliğini teşkil etmektedir. Oksijenli solunum yapan özelliği de vardır. Ama denitrifikasyon özelliği sebebiyle de oksijensiz ortamda üreyen türleriyle de karşılaşmaktadır. Sıvı besi yerindeki yüzeyde zar oluşturmak için homojen ve fazla sayıda üreme görülmekte ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti dikkat çekmektedir. Uzun zaman bekleme süresinde olan kültür ortamları sonuçta alkali hale gelebileceğinden bu canlılar, litik ferment maddelerle erimekte, sıvı gıda alanını berraklaştırmaktadır. *P. aeruginosa*, pepton içeren suyun içinde de üremektedir.

Katı besiyerlerinde *P. aeruginosa*, üç tip koloni oluşturur. Tip bir; koloni, mat yüzeyli, 2-3 mm (milimetre) çapında, ortası kabarık, yassı, beyazımsı renkli, yuvarlak, karşıdan bakılınca fluoresans özelliğine sahip, besi yerinin bütün ortamına dağılmış olan yeşil-mavi boya maddeleri dikkat çeken koloniler şeklinde gözükmektedir. Bu dağınık tipteki koloniler genellikle klinik örneklerinden izole edilmektedirler. Genelde natürel kaynaklar kullanılarak ayrılmış tip iki koloni, kabarık, daha küçük, konveks yapılı ve düzensiz koliform tipteki kolonilerle benzer yapıdadırlar. Ayrıca, Tip üç kolonileri ise *P. aeruginosa* 'ya ait bazı örneklerinin hücre dışı alginat salgılar yapıda olması sebebiyle, görünümü mukoid olan, R kolonilerdendir. Bu bakteri kültürlerinde triptofan 2-aminoasetofenon üretimi nedeniyle hemen fark edilen bir meyve kokusu görülmektedir. Ayrıca petri kabının kapağını açtığımızda trimetilamine ait koku ve üzüm kokusu hissedilmektedir (Aydın, 2001).

1.1.5.4 *Staphylococcus aureus*

Günümüzde barsak rahatsızlıklarının sebebinin, bazılarının enfeksiyon mu, yoksa intoksikasyon mu olduğu tartışmaları bakteriler için halen devam etmektedir. Besinlerin üstünde uygun şartlarda olduklarında, üreyen, toksik ve üretilen toksinin besin yoluyla vücudumuza girmesiyle intoksikasyona sebep verdiği kesinlikle biliniyor olan iki tane tür bulunmaktadır. Birincisi *Clostridium botulinum*, ikinci ise *S. aureus* bakterileridir.

S. aureus, *Micrococcaceae* familyasındaki *Staphylococcus* cinsine ait ve üyesi olup, insanlarda menenjit, septisemi ve iltihaplı yaralara sebep olmaktadır. Ayrıca *S. aureus*, eklem romatizması hastalığına da sebep olmaktadır. *S. aureus* suşlarının geneli doku toksini dışında yüksek toksisiteli ve barsaklarda etkili olan enterotoksinleri meydana getirmektedir.

Hareketsiz ve sporsuz kok formundaki *S. aureus*, Gram (+) ve katalaz (+) özelliktedir. Mezofil karakterde ve fakültatif oksijensiz ortamda gelişim gösterir.

S. aureus suşları uygun ortamda 30-37 °C' uygun sıcaklıkta gelişmektedirler. *S. aureus*, gelişme sınırları 6-46 °C sıcaklık dereceleri arasındadır. Zehirli madde meydana getirmeleri için gerekli en düşük ve en yüksek sıcaklık dereceleri 10-48 °C' arasındadır. Uygun değer olarak 7.0-7.5 pH 'ı seçerken, *S. aureus* 4.0-9.3 pH sınırları içinde gelişimini sürdürmektedir. Gıdalar içindeki *S. aureus*, toksin oluşturabilmesi için en düşük pH isteği, vejetatif gelişebilme isteklerinin biraz daha üzerinde yer alır (pH 4.9-5.1). Aynı durum, (As) su aktivitesi değerlerinde de fark edilmektedir. *S. aureus*, Minimum su aktivitesi değeri; anaerob gelişim göstermek için As= 0,90, aerob gelişim göstermek için As= 0.83-0,86 olarak belirlenmiştir. Zehirli madde oluşturabilmek için ise daha yüksek su aktivitesi değerlerini talep ederler. *S. aureus* suşları altın sarısı boya maddesi oluşturan kolonileri ile tanımlanırlar. Ama *S. aureus* 'un, besinlerden ve hayvanlardan ayrıştırılan suşlarının çoğunun bu özelliği göstermediği fark edilmiştir. Yüksek tuz yoğunluğuna mukavemeti olan *S. aureus* bakterileri %10 tuz içeren ortamlarda rahatlıkla gelişirler, %20 tuz içeren ortamlarda tolerans gösterebilen suşlar yer almaktadır. Tuz haricinde; sodyum azid, tellurit, cıva klorür gibi kimyasallar ve neomisin, polimiksin gibi bilinen antibiyotiklere direnç gösterirler.

Doğal olarak *S. aureus*, boğaz boşluğunu örten mukoz dokuda ve en fazla burun da yer alır, birçok alana yayılırlar. Derilerde, kollarda, ellerde ve yüzümüzde bulunabilirler. Hayvan ve İnsanların dışkılarında, sivilcelerinde çibanlarda, apselerde de çok fazla miktarlarda

bulunabilirler. Ortamın baskın florası *S. aureus*, boğaz kültürlerinde de yer alır ve bu ortamdan ayrıştırılan suşlarının %20'sinin enterotoksinlere ait olduğu belirlenmiştir (Halkman, 2019).

1.2 Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışmasında kullanılan lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*), maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin natürel olarak kurutulmuş halleri üç farklı çözücü kullanılarak Soxhlet ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilen özütlerinin dört tür bakteri (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*) üzerindeki antibakteriyel etkisi denenmiştir. Bu bitkiler alternatif tıpta da kullanılan bitkilerdir.

Literatürde bu tür bilgilerin derlendiği kapsamlı çalışmalara pek rastlanmamaktadır. Çalıştığımız konuda elde edilen bilgiler, vardığımız sonuçlar ve öneriler dikkate alındığında kullandığımız bitkilerin, ekstraksiyon yöntemi ile çeşitli verimlilikte ekstrakte edilen özütlerin farmakoloji ve kozmetik alanlarda doğal ürünlerin yapımında kullanılabilirlikleri öngörülmüştür.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Ekstraksiyon işleminde kullanılan tüm çözücülerin ve %0,9 NaCl 'nın markası Sigma Aldrich olup, herhangi bir saflaştırma işlemine gerek duyulmaksızın kullanılmıştır. Müller Hinton agar Himedia markasıdır.

Kullanılan cihazlar:

Etüv Elektro-mag M5040 BP

Soxhlet cihazı Elektro-mag (50 °C- 500 °C)

Manyetik karıştırıcı ARE/Velp Scientifica

Döner buharlaştırıcı Buchi rotavapor R-3

Vortex v-1 plus biosan

Bu çalışmada; lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*), maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin doğal olarak kurutulmuş halleri Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesinde bulunan çeşitli aktarlardan temin edildi. Bitki örnekleri öğütücüden geçirildikten sonra ekstraksiyon işlemine hazır hale getirildi.

Bitki özütleri hazırlanırken kurutulmuş ve toz haline getirilmiş örneklerin saf su, hekzan ve etanol çözücülerini ile ekstraksiyonu yapıldı. Soxhlet ekstraksiyon yöntemi uygulandı. Deneyler, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya ve Biyoloji Bölümlerinin Laboratuvarında 3 kez kontrollü olarak gerçekleştirildi.

Yirmişer gram öğütülmüş bitki örnekleri 250 mL etanol, hekzan, saf su çözücülerini ile oda koşullarında soxhlet ekstraksiyon cihazında 6 ile 8 saat ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen çözeltiler döner buharlaştırıcıdan geçirildi. Özütler kullanıma hazır hale getirildi.

Çalışmada 2 adet Gram negatif ve 2 adet Gram pozitif bakteri olmak üzere; *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212) suşlarına ait bakteriler kullanılmıştır. Bu bakteriler Tekirdağ ili Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir. Bakteriler deney öncesinde %5 koyun kanı içeren kanlı agara ekilip aktif hale getirildi. Her bir bakteri steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) içerisine, kanlı agarda çoğaltılmış bakteri kolonilerinden eklenerek 0,5 McFarland yoğunluğuna getirilen süspansiyonlardan steril pamuklu çubuk

yardımıyla agarın üzerine ekildi. Yirmi dört saatlik 37°C'deki inkübasyondan sonra bakteriler yoğunluğu 0,5 Mc Farland standardına göre hazırlanıp deneylere hazır hale getirildi (Gürgün ve Halkman, 1990). Bakteri ekimleri yapıldıktan sonra steril mikro pipet uçları ile 9 mm'lik kuyular açıldı. Özütler hazırlanan kuyulara 100 µl olacak şekilde damlatıldı. Hazırlanan örnekler Yirmi dört saat 37 °C'de inkübasyondan sonra antimikrobiyal etki zon çapına göre kontrol grubu olarak referans seçilen gentamisin antibiyotiği ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Deneyler 3 tekrarlı şekilde yapıp veriler kaydedildi.



3. ARAŞTIRMA BULGULARI

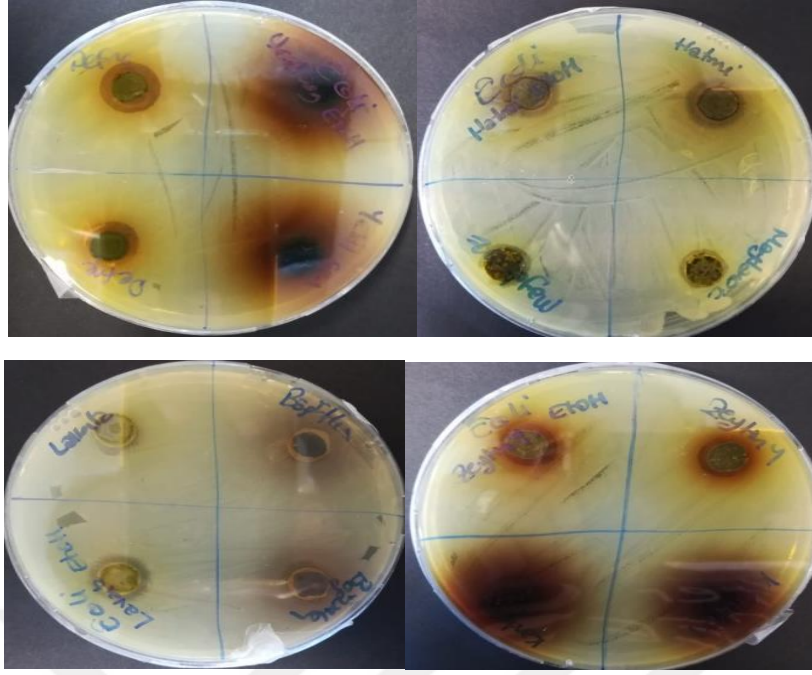
3.1 Etanol ile Ekstraksiyon

Lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin etanol ile ekstraksiyonunda yeterli miktarda özütleri elde edilmiştir ve bu özütlerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkileri denenmiştir. Ekstraksiyon uygulanarak özütü elde edilen bitkilerin bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür. Etanol ile Ekstraksiyonda özütleri çıkarılan bitkilerin bakteriler üzerindeki etkileri zon ölçümleri her bir bakteri için çizelge 3. 1’de ve şekil 3.5’te gösterilmiştir.

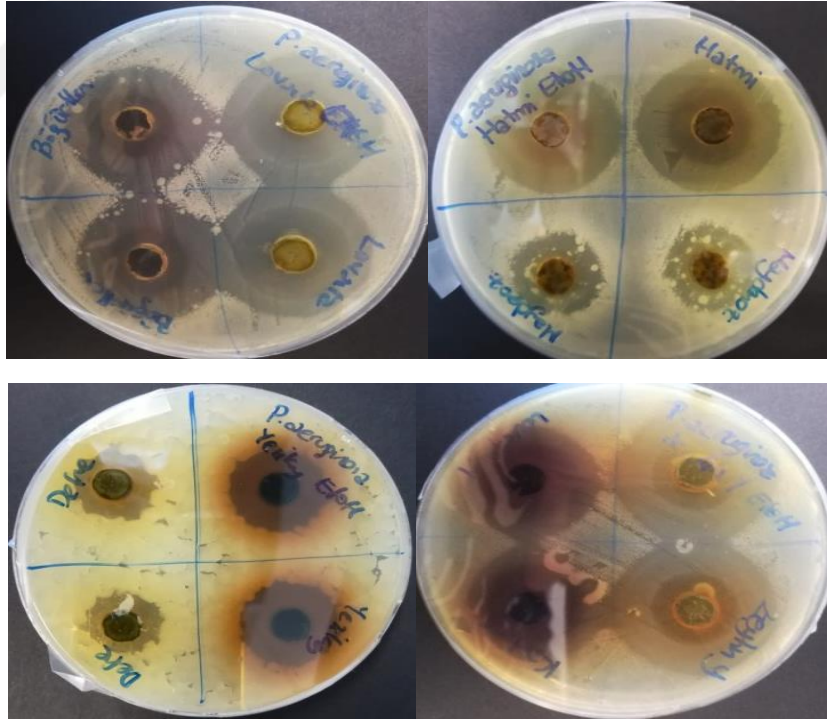
Çizelge 3.1. Etanol ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü (mm)

ÖZÜT ELDE EDİLEN BİTKİLER	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Lavanta	11,5±2.12	16,5±0,5	18,5±0,5	24±0,5
Hatmi	12,5±0.71	15±1	19,5±0,5	17±0,5
Sarı kantaron	13±1.41	18,5±0,5	20±0,5	20±0,5
Defne	12,5±0.71	15,5±0,5	19±1	-
Yeşil çay	-	21±0,5	25,5±0,5	15,5±0,5
Zeytin yaprağı	10,5±0,5	17,5±0,5	19,5±0,5	17±1
Maydanoz	11±1.41	-	9,5±0,5	-
Böğürtlen	-	13±0,5	15,5±0,5	24±4
Gentamisin ¹	17	20	20	19

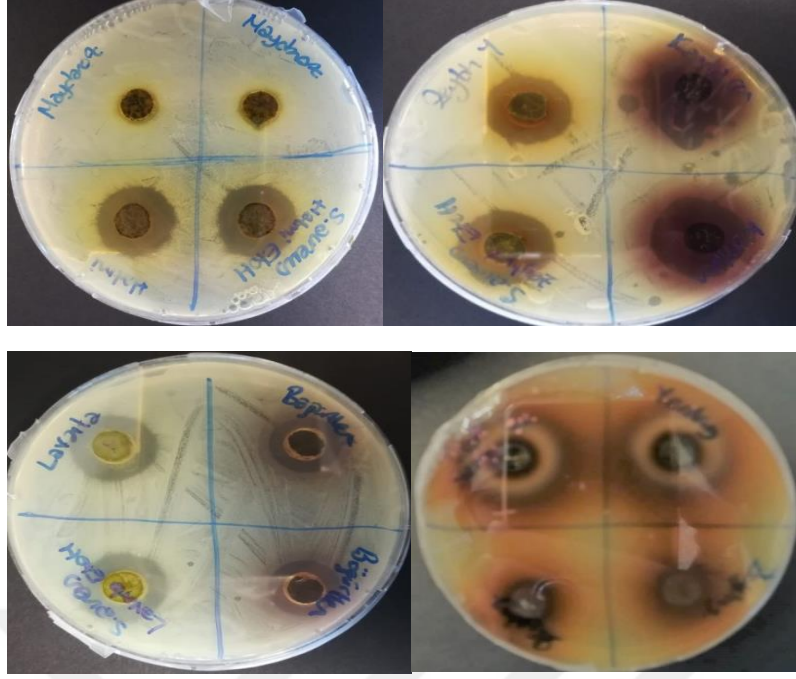
¹Açıklama: Antibiyotik (Referans değer olarak çizelgede kullanılmıştır)



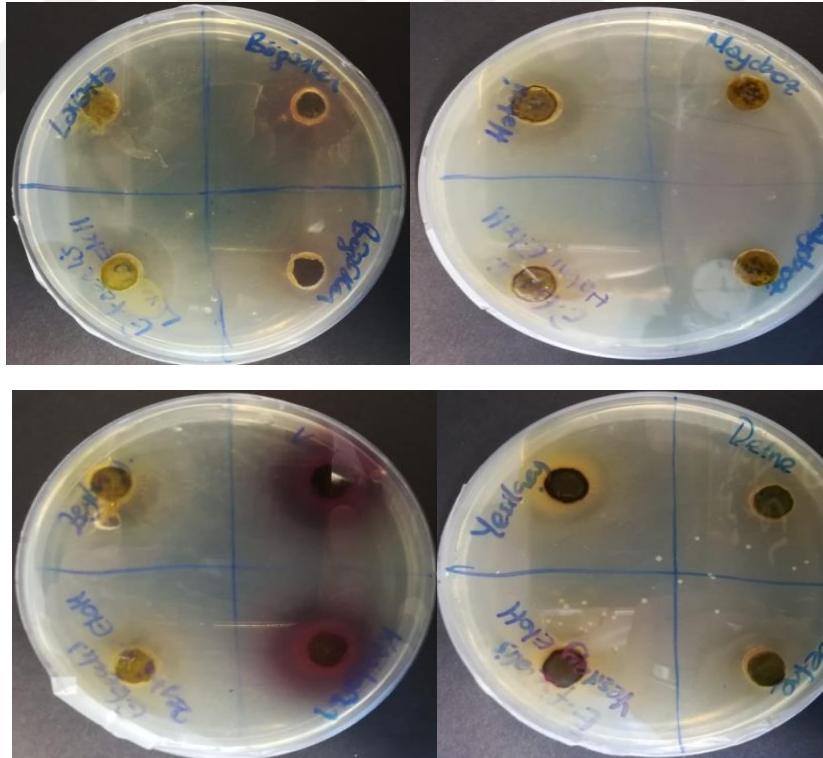
Şekil 3. 1. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. coli* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi



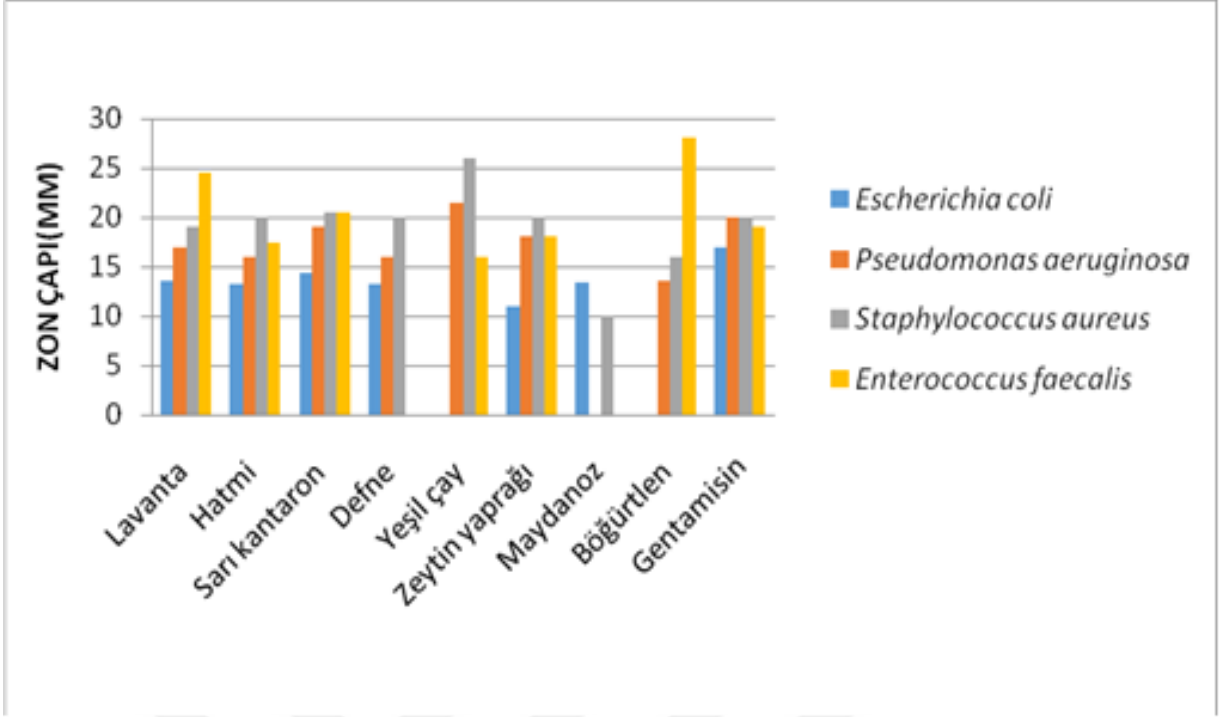
Şekil 3. 2. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi



Şekil 3. 3. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin *S. aureus* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 4. Etanol ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 5. Etanol ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği

3.2 Saf Su ile Ekstraksiyon

Lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin saf su ile Ekstraksiyonunda yeterli miktarda özütleri elde edilmiştir. Ayrıca bu özütlerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkileri denenmiştir. *E. coli* için hatmi, sarı kantaron, defne, maydanoz, böğürtlen de yeterli zon oluşmadığı, *E. faecalis* için de maydanoz da yeterli zon oluşmadığı görülmüştür. Çalışmada saf su ile ekstraksiyonunda özütü çıkarılan bitkilerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkileri etki zon ölçümü her bir bakteri için çizelge 3. 2’de verilmiş ve şekil 3.10’da gösterilmiştir.

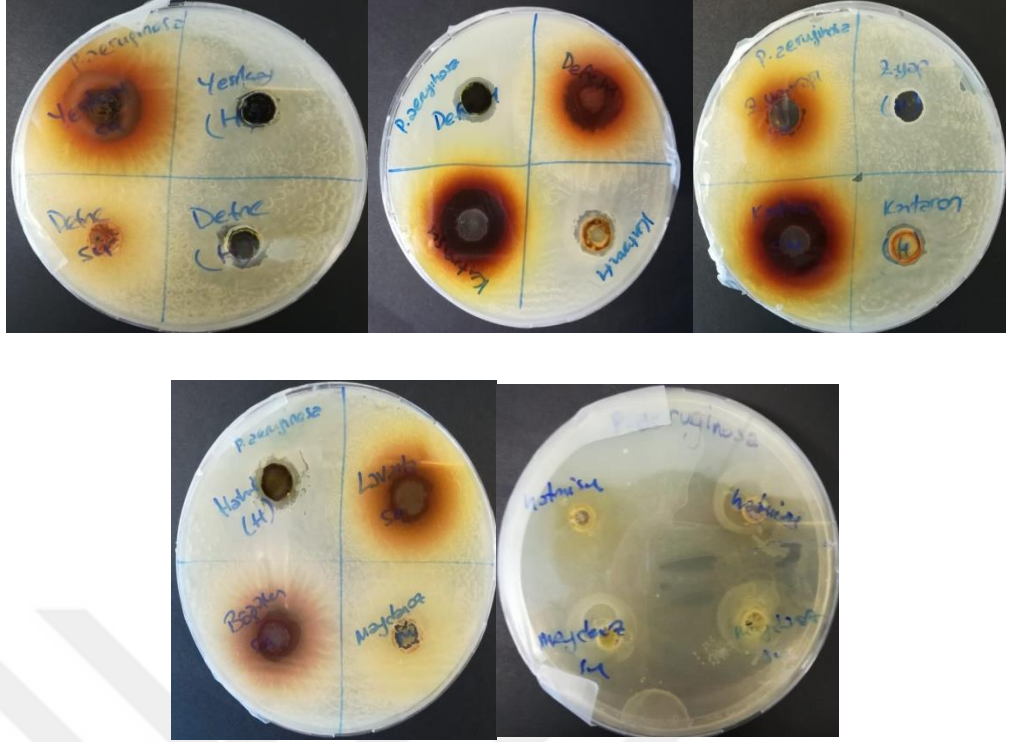
Çizelge 3. 2. Saf su ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü(mm)

ÖZÜT ELDE EDİLEN BİTKİLER	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Lavanta	11±0,5	12±0,5	18±0,5	10±0,5
Hatmi	-	-	10±0,5	-
Sarı kantaron	-	19±0,5	22±0,5	19±1
Defne	-	18±0,5	21±0,5	14±1
Yeşil çay	21±1.41	21±1	26,5±0,5	20,5±0,5
Zeytin yaprağı	13,5±0.71	11±0,5	19±1	-
Maydanoz	-	-	-	-
Böğürtlen	-	13±0,5	22±0,5	20±0,5
Gentamisin ¹	17	20	20	19

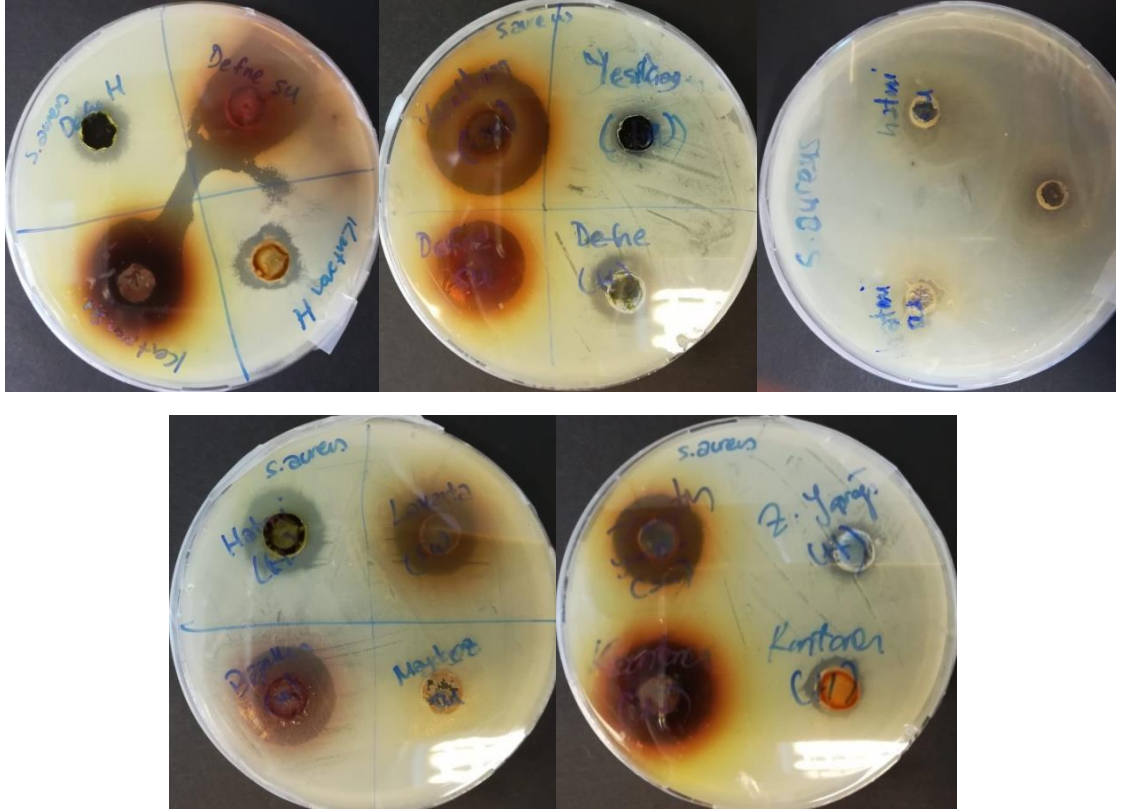
¹Açıklama: Antibiyotik (Referans değer olarak çizelgede kullanılmıştır)



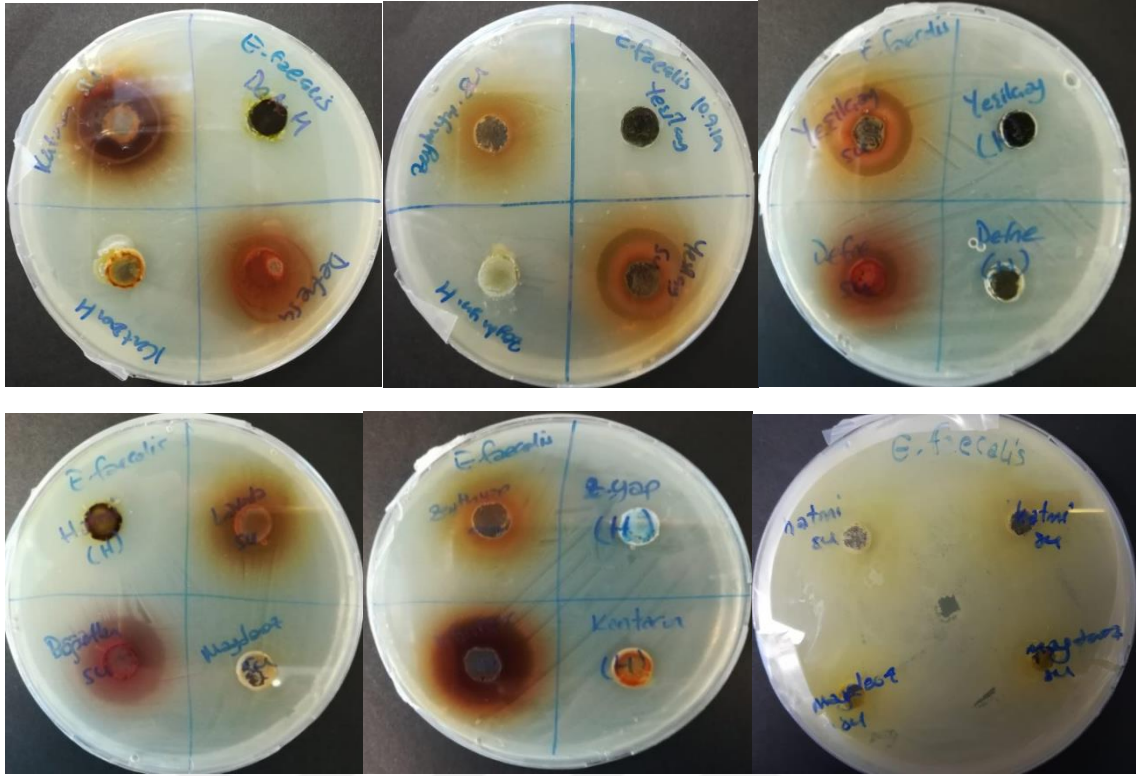
Şekil 3. 6. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. coli* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi



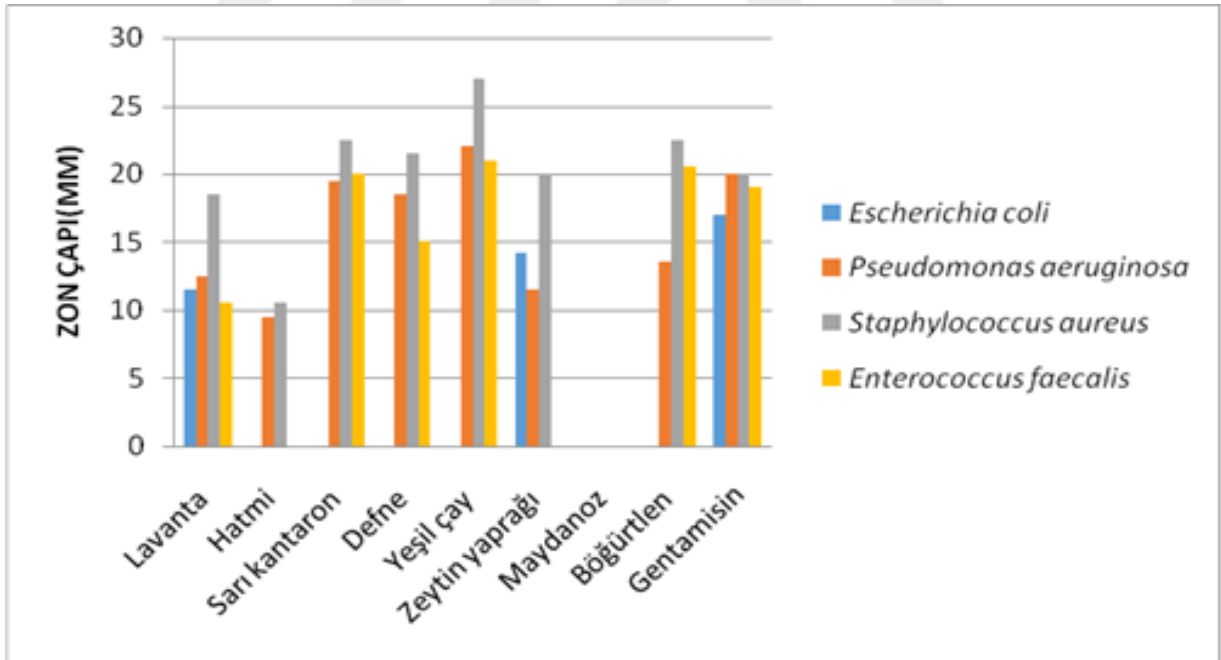
Şekil 3. 7. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 8. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *S. aureus* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 9. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 10. Saf su ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği

Gentamisin referans değerler temel alındığında sırasıyla; *E. coli* üzerinde yeşil çayın en iyi zon değerini verdiği, lavantanın en düşük zon değerinde olduğu görüldü. Hatmi, sarı kantaron, defne, maydanoz ve böğürtlenin ise zon oluşturmadığı görüldü (şekil 3.10).

P. aeruginosa üzerinde yeşil çayın en iyi zon değeri verdiği, hatminin en uzak düşük değerinde, maydanozun zon oluşturmadığı görüldü. *S. aureus* üzerinde yeşil çayın en iyi değeri verdiği, maydanozun zon oluşturmadığı, hatminin en düşük değerde zon oluşturduğu görüldü. *E. faecalis* üzerinde ise yeşil çayın en iyi zon değerini verdiği, hatmi, zeytin yaprağının ve maydanozda zon oluşmadığını, lavantanın en düşük zon oluşumu değerinde olduğu görüldü (şekil 3.10).

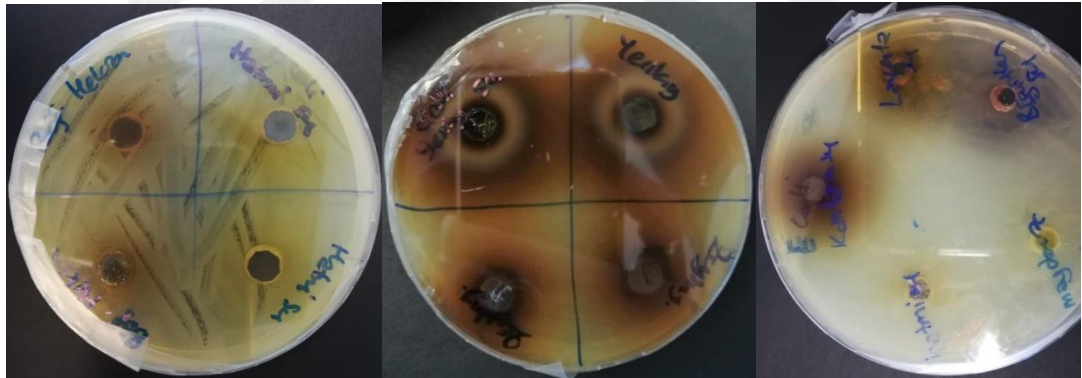
3.3 Hekzan ile Ekstraksiyon

Hatmi (*Althaea officinalis*), defne (*Laurus nobilis*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), bitkilerinin hekzan ile özütleri elde edilmiş ve bu özütlerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkileri denenmiştir. Fakat lavanta (*Lavandula officinalis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin hekzan ile yapılan ekstraksiyon işleminde yeterli miktarda özütleri elde edilememiştir. *E. coli*, hekzan ile ekstraksiyonunda test edilememiştir. *P. aeruginosa* için lavanta, maydanoz ve böğürtlende özüt yeterince elde edilememiştir. *S. aureus* için lavanta, maydanoz ve böğürtlende hekzan ile ekstraksiyonunda test edilememiştir. *E. faecalis* için lavanta ve böğürtlen de hekzan ile ekstraksiyonunda test edilememiştir. Çalışmada hekzan ile ekstraksiyonunda özütleri çıkarılan bitkilerin *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkileri etki zon ölçümü her bir bakteri için çizelge 3. 3'te verilmiş, şekil 3.15'te gösterilmiştir.

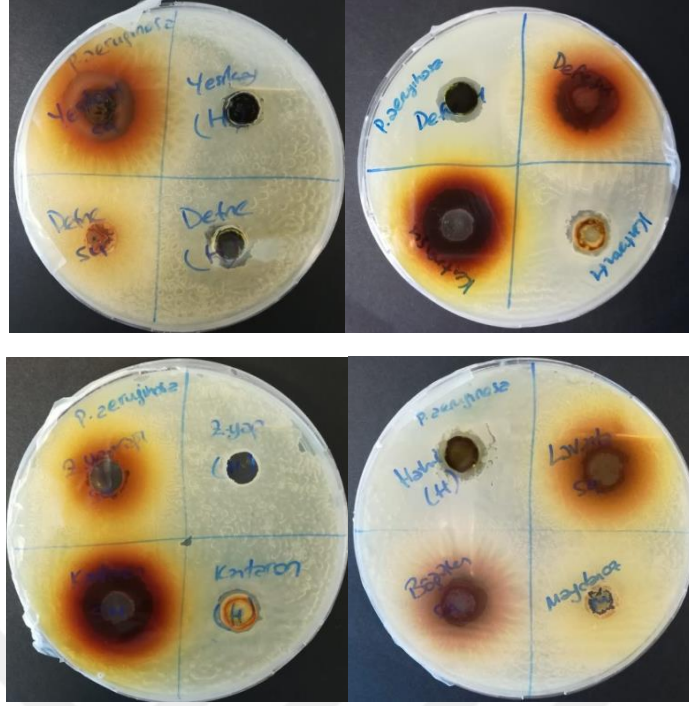
Çizelge 3. 3. Hekzan ile ekstraksiyon: Bakterilerin etki zon ölçümü (mm)

ÖZÜT ELDE EDİLEN BİTKİLER	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Lavanta	-	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.
Hatmi	-	14±1	16,5±1,5	10,5±5,5
Sarı kantaron	-	12±1	13±0,58	11,5±0,5
Defne	-	15,5±2,5	13±0,58	-
Yeşil çay	-	9±0,0	12±1,15	-
Zeytin yaprağı	-	10,5±5,5	11,05±0,5	-
Maydanoz	-	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	-
Böğürtlen	-	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.	Özüt yeterli miktarda elde edilemedi.
Gentamisin ¹	17	20	20	19

¹Açıklama: Antibiyotik (Referans değer olarak çizelgede kullanılmıştır)



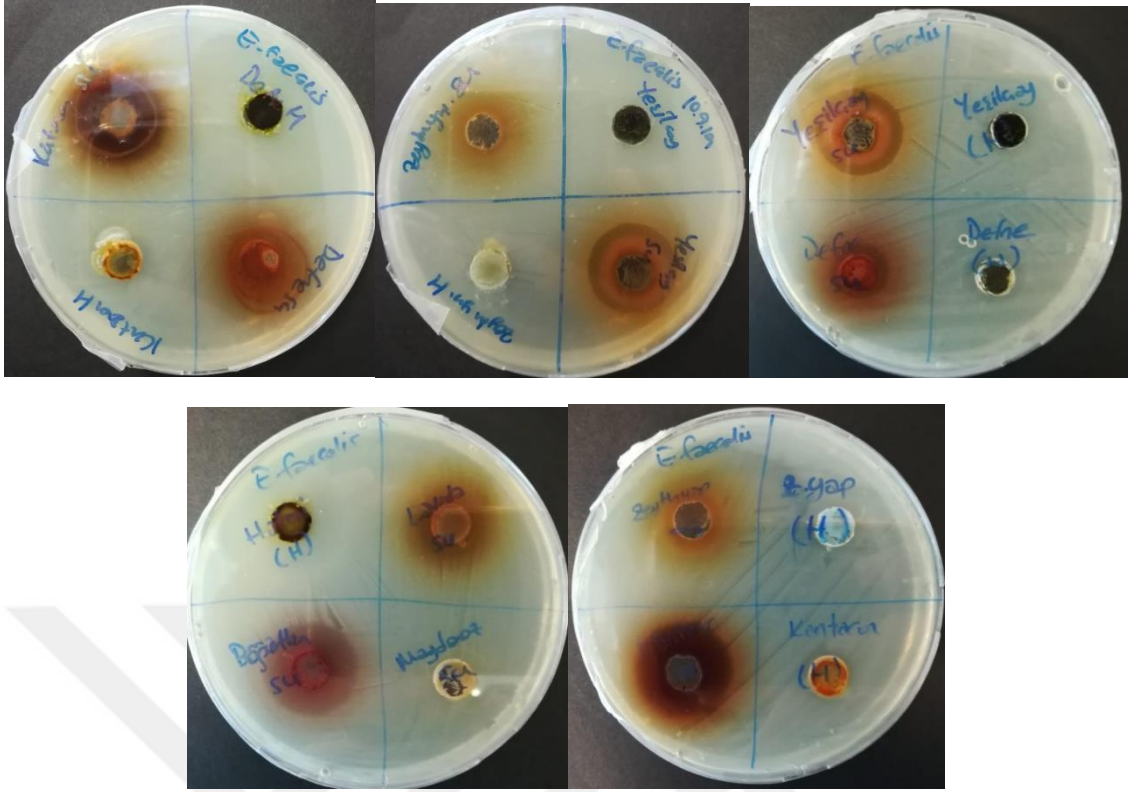
Şekil 3. 11. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. coli* bakterisi üzerindeki antibakteriyel etkisi



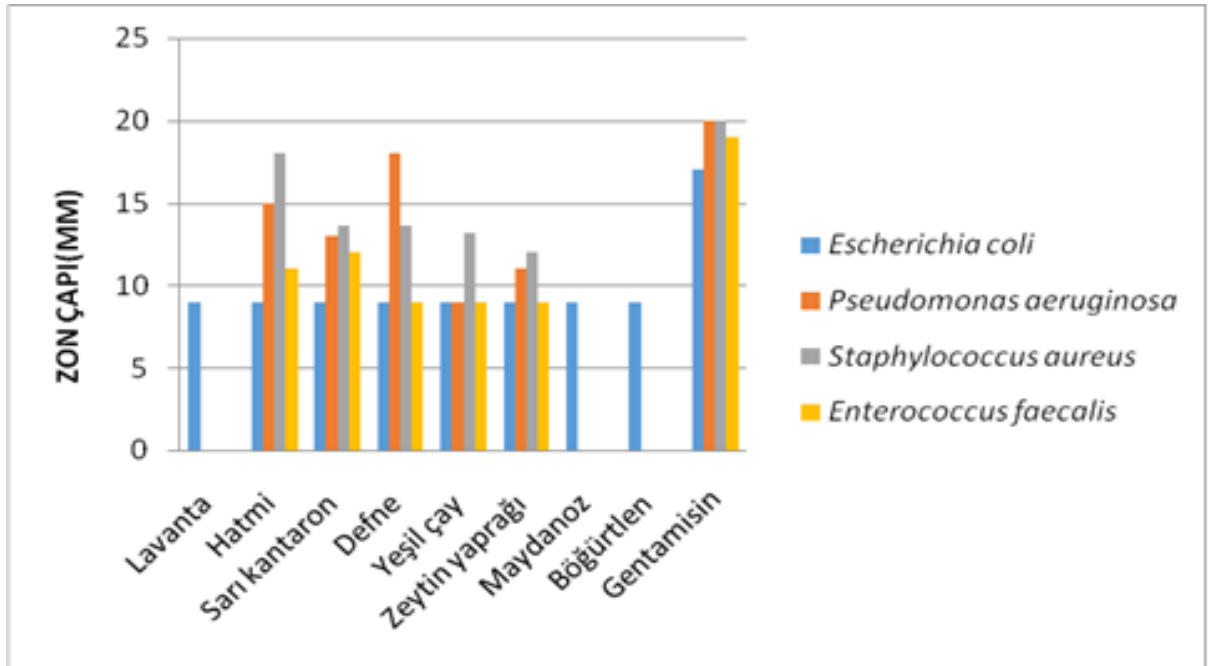
Şekil 3. 12. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *P. aeruginosa* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 13. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *S. aureus* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 14. Hekzan ve saf su ile çıkarılan bitki özütlerinin *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkisi



Şekil 3. 15. Hekzan ile Ekstraksiyonda Test Edilen Bitkilerle Etkileşiminde Zon Çapı Grafiği

4. TARTIŞMA

Bu bölümde, tez aşamasında yapılan çalışmaların sonucunda meydana gelen özütlerin antibakteriyel etki sonuçları kullanılan bitkiler bazında tartışılmıştır. Referans olarak Gentamisin antibiyotiği kullanılmıştır. Ülkemizde gentamisin mikroorganizmalara karşılık en ekonomik tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Gentamisin enjeksiyonluk aminoglikozitlerin içinde düşük toksisite riskine sahip olması ve tedavi maliyetinin düşük olması nedeniyle insan ve hayvan hekimliğinde en çok kullanılan antibiyotik olarak tercih edilmiştir (Kanbar, Rahal ve Matar, 2003).

4.1 Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*)

Bu çalışmada sarı kantaronun etanol ile ekstrakte edilen özütü *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerine referans değer üzerinde etki etmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine etkisi ise referans değere yakın bir sonuç göstermiştir. Bu da etanol ile ekstrakte edilen sarı kantaron bitkisinin özütün Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Literatürde yapılan iki çalışmada da sarı kantaron yağının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterileri üzerine inhibitör etki ettiği bildirilmiştir (Couceiro, Afreen, Zobayed ve Kozai, 2006; Kavanagh, 1972).

Benzer şekilde sarı kantaronun saf su ile ekstrakte edilen özütü ise *E. coli* üzerine etki etmiş, *P. aeruginosa* da referans sınırında, *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerine ise referans değer üzerinde bir etki göstermiştir. Hekzan ile ekstrakte edilen Sarı kantaron özütünün; *E. coli* üzerinde etkisi olmadığı, diğer bakterilerde ise referans değer altında bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sarı kantaron bitkisinin özütünün çıkarılması işleminde hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde kullanılması açısından çözücü olarak hekzan yerine öncelikli olarak etanolün tercih edilmesi daha uygun olabilir.

4.2 Lavanta (*Lavandula officinalis*)

Bu çalışmada lavantanın etanol ile ekstrakte edilen özütünün *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerine referans değer üzerinde etki ettiği, *E. coli* bakterisine referans değer altında bir değerde; *P. aeruginosa* bakterisine ise referansa yakın bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Dadaloğlu ve Evrendilek (2004)'da lavanta uçucu yağlarının *S. aureus*'a karşı etki ettiğini bulmuşlardır. Bu bitkinin etanol ile ekstraksiyonundan elde edilen özütünün de Gram pozitif

bakteriler üzerinde daha yüksek bir antibakteriyel etkisi olduğu açıktır. Bu antibakteriyel etkinin sebebi Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısının kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşması; ancak Gram negatif bakterilerin peptidoglikan hücre duvarının üzerinde bir de dış zar yapısının bulunmasından dolayı olduğu söylenebilir. Yapılan başka bir çalışmada lavanta yağının evcil su kaplumbağalarında izole edilen patojen bakteriler üzerinde de antibakteriyel etkisi incelenmiştir (Hossain, Heo, De Silva, Wimalasena, Pathirana ve Heo Gang-Joon, 2017). Denenmiş olan tüm *P. aeruginosa* suşlarının lavanta yağına karşı dirençli olduğu bulunmuştur. *P. aeruginosa* bakterisi bitki esansiyel yağlara ve antimikrobiyal maddelere sıklıkla direnç gösteren fırsatçı bir patojendir. Bu direnç mekanizmasının bu bakterideki dış zarın esansiyel yağlardaki fenolik bileşiklere karşı dayanıklı olması, bu bakterideki dışarı akış mekanizmaları ve porinli inhibisyon mekanizmalarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Longbottom, Carson, Hammer Mee ve Riley, 2004).

Lavanta bitkisinin saf su ile ekstrakte edilen özütünün Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerindeki etkisi referans değerinin altında kalmıştır. Hekzan ile çalışılan özüt çıkarma işlemi ise yeterli miktarda gerçekleşmemiştir. Bu nedenle hekzan ile ekstrakte edilmeye çalışılan özütün antibakteriyel etkisi denenememiştir. Yaptığımız çalışmanın sonuçları lavanta ile özüt elde edilmek istendiğinde etanolün en uygun çözücü olduğunu göstermektedir. Bu bilgilere göre Lavanta özütü ekstrakte edilmek istendiğinde etanol iyi bir çözücü seçimi olacaktır.

4.3 Defne (*Laurus nobilis*)

Çalışmamızda, defnenin etanol ile ekstrakte edilen özütünün *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerine referans değerinin altında etki ettiği, *S. aureus* bakterisine referansın üzerinde etki ettiği, *E. faecalis* üzerinde ise etkisinin olmadığı görülmüştür. Etanol ile ekstrakte edilen özütün en çok etki ettiği bakterinin *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir. Defnenin superkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile elde edilen özütünün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* bakterileri üzerinde etkisi bir çalışmada bildirilmiştir (Santoyo, Lloria, Jaime, Ibanez, Senorans ve Reglero, 2006). Çalışmalarında bu özüte en hassas bakterinin *S. aureus* olduğundan bahsetmişlerdir. Yine Derwich, Benziane ve Boukir (2009)'da defne yapraklarından elde edilen uçucu yağın *S. aureus*'a karşı antibakteriyel olarak etki ettiğini bildirmişlerdir.

Aynı şekilde yaptığımız bu çalışmada, saf su ile ekstrakte edilen defne özütünün yine etkisinin en çok *S. aureus* üzerinde olduğu gözlemlenmiştir, ancak *E. coli* bakterisi üzerinde bir

etkisi gözlenmemiştir. *P. aeruginosa* da referansa yakın, *E. faecalis* ' e ise referansın altında bir değerde etki ettiği görülmüştür. Hekzan ile ekstrakte edilen defne özütünün *E. coli* ve *E. faecalis* bakterilerinde etki göstermediği, *P. aeruginosa* bakterisinde referansa yakın, *S. aureus* bakterisine ise referans değerinin altında etki gösterdiği tespit edilmiştir. Defne (*Laurus nobilis*) bitkisinin özütünün ekstrakte edilmesinde hekzan yerine saf su ve etanolün tercih edilmesi daha uygun olacaktır.

4.4 Maydanoz (*Petroselinum crispum*)

Maydanozun saf su ile ekstrakte edilen özütünün Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. Hekzan ile yapılan ekstraksiyon işlemi özüt yeterli miktarda elde edilememiştir. Bu nedenle antibakteriyel etki çalışılmamıştır. Maydanozun etanol ile ekstrakte edilen özütü *E. coli* bakterisine referansın altında da olsa etki etmiş, *P. aeruginosa* bakterisine ise etkisi gözlemlenmemiştir. Aynı şekilde *S. aureus*'a referansın altında etki göstermiş, *E. faecalis* üzerinde bir etkisi görülmemiştir. Seyyednejat, Maleki, Mirzaei, Damab ve Mota 2008'de yaptıkları çalışmada maydanozun etanol ile ekstrakte edilen özütünü çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde denediklerinde, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* 'un bu özüte denenen tüm konsantrasyonlarda dirençli olduğunu görmüşlerdir. Bahsedilen çalışmada *E. coli* bakterisinin büyümesinin denenen en düşük konsantrasyonda dahi engellendiği bildirilmiş ve bu farklılık Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısının kalınlığı ile ilişkilendirilmiştir. Maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkisinin özütünün ekstrakte edilmesi işlemi hekzan ve saf su çözücüleri yerine etanolün tercih edilmesi daha uygundur.

4.5 Yeşil Çay (*Camellia sinensis*)

Bu çalışmada etanol ile ekstrakte edilen yeşil çay özütünün *E. coli* üzerinde etkisi olmadığı, Gram negatif bakterilerden olan *P. aeruginosa* üzerindeki etkisinin referans değerden fazla olduğu görülmüştür. Aynı şekilde *S. aureus* bakterisine referans değerinin üzerinde, *E. faecalis* de referansın altında bir değerde etki ettiği tespit edilmiştir. Hekzan ile ekstrakte edilen yeşil çay özütünün Gram negatif bakteriler üzerinde etkisi gözlenmemiş olup, Gram pozitif bakterilerden de *S. aureus* 'a referans değerinin altında etki ettiği görülmüştür. Kumar, Thakur, Patil, Payal ve Sharma 2012'de yeşil çayın saf su, etanol ve metanol çözücü ile ekstrakte edilen özütlerinin çevresel örneklerden izole edilen bakteriler üzerinde etkisini denemişler ve denenen altı bakteri üzerinde yeşil çay ekstraktının antibakteriyel etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ancak

hücre duvarı farklılıklarından dolayı yeşil çayda bulunan kateşinlerin, Gram pozitif bakterilerde hücre zarına daha kolay zarar verebildiği görülmüştür. Ancak Gram negatif bakterilerdeki dış zar yapısının özelliği nedeniyle, Gram negatif bakterilere daha az etki ettiği bildirilmiştir (Sirk, Brown, Sum ve Friedman, 2008; Ikigai, Nakae, Hara ve Shimamura, 1993).

Çalışmamızda saf su ile ekstrakte edilen yeşil çay özütünün ise Gram (-) ve Gram (+) bakterilere referans değerini oldukça üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, yeşil çay bitkisinden özüt ekstraksiyon işlemi en etkili çözücünün saf su olduğunu göstermiştir.

4.6 Zeytin Yapağı (*Olea europaea*)

Yaptığımız bu çalışmada zeytin yaprağının etanol ile ekstrakte edilen özütünün Gram negatif bakterilerde *E. coli* üzerinde referans değerini altında bir etki gösterdiği, *P. aeruginosa*'ya ise referansa yakın bir etki gösterdiği görülmüştür. Gram pozitif bakterilerden ise *S. aureus* üzerine olan etkisinin referans değerini üzerinde, *E. faecalis*'e ise referans değere yakın etki ettiği görülmüştür. Etanolla ekstrakte edilen özütlerin Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Hekzan ile ekstrakte edilen zeytin yapağı özütünün Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa*'ya, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* a referans değerini altında etki ettiği diğer iki bakteriye ise etkisinin olmadığı görülmüştür. Saf su ile ekstrakte edilen zeytin yapağı özütünün Gram negatif bakterilere referansın altında, Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a referansla aynı, *E. faecalis*'e ise etki etmediği görülmüştür. Saf su ile ekstrakte edilen özütün etkisinin en çok *S. aureus* bakterisi üzerinde olduğu görülmüştür. Denenen tüm bakteriler arasında zeytin yapağı özütlerine en duyarlı bakterinin *S. aureus* olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada da zeytin yaprağının sulu özütünün *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkisi olduğundan bahsedilmiştir (Korukluoglu, Sahan, Yigit, Ozer ve Gucer, 2010). Bu ve benzeri çalışmalar hastane kaynaklı en yaygın bakterilerden olan *S. aureus* ile mücadelede zeytin yapağı özütlerinin dezenfektanlarda kullanılabileceği öngörülmektedir.

4.7 Böğürtlen (*Rubus fruticosus*)

Yaptığımız çalışmada hekzan ile yapılan ekstraksiyon işlemi böğürtlen meyvesinden yeterli miktarda özüt elde edilemediğinden antibakteriyel etki denemesi yapılamamıştır. Bu durum hekzanın apolar bir çözücü olması, ancak etanol ve saf suyun polar çözücüler olmasından kaynaklanabilmektedir (Sun, Wu, Wang ve Zhang, 2015). Böğürtlenin etanol ile ekstrakte edilen özütünün Gram (-) bakterilerden *P. aeruginosa*, Gram (+) bakterilerden *S.*

aureus'a referans altında etki ettiği, *E. faecalis* ise referansın çok üzerinde etki ettiği görülmüştür. Saf su ile ekstrakte edilen böğürtlen özütünün *P. aeruginosa* 'ya referans ın altında etki ettiği, *E. coli*'ye ise etki etmediği görülmüştür. Gram pozitif bakterilerde ise saf su ile ekstrakte edilen böğürtlen özütünün referans değerin üzerinde etki ettiği görülmüştür. Krzepińko, Prażak, ve Święcińo, 2021'de yaptıkları çalışmada saf su, etanol-saf su, gliserol-saf su çözücüleri ile ekstrakte edilen böğürtlen özütlerinin *E. coli* üzerinde etkisinin görülmediğini, *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde etki gösterdiği bildirmişlerdir. Buradan da anlaşılacağı üzere saf su ve etanol ile ekstrakte edilen böğürtlen meyve özütlerinin Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkisinin olduğu söylenebilir.

4.8 Hatmi (*Althaea officinalis*)

Saf su ile ekstrakte edilen hatmi özütünün Gram negatif bakterilerinden *P. aeruginosa* referansın altında, *E. coli* bakterisine ise etki etmediği görülmüştür. Gram pozitif bakterilerden *S. aureus*'a referansın altında, *E. faecalis* e ise etki etmediği tespit edilmiştir. Bu bitkinin özütünün elde edilmesi için çözücü olarak saf su kullanıldığında özütün antibakteriyel etkisinin yok denebilecek kadar çok az olduğu görülmüştür. Aynı şekilde hekzan ile ekstrakte edilen hatmi özütünün *P. aeruginosa*'ya ve *S. aureus*'a referans değerin altında etki ettiği, ancak saf su ile ekstrakte edilen özütlerden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Hekzan özütünün diğer iki bakteriye ise etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada hatminin etanol ile ekstrakte edilen özütünün Gram negatif bakterilere referans değerin altında etki gösterdiği görülmüştür. Gram pozitif bakterilere ise *S. aureus* üzerine olan etkisi referans değerin üzerinde, *E. faecalis*'e ise referans değere yakın etki ettiği görülmüştür. Bu bitkinin de etanol ile ekstrakte edilen özütlerinin Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Seyyednejad, Koochak, Darabpour ve Motamedi 2010'da yaptıkları çalışmada hatmi bitkisinin etanol özütünün en çok *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiğinden bahsetmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bazı bitki örneklerinin Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen özütlerinin bakterilere karşı antibakteriyel etkisi agar kuyu difüzyon tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Bu amaçla, lavanta (*Lavandula officinalis*), hatmi (*Althaea officinalis*), defne (*Laurus nobilis*), sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), yeşil çay (*Camellia sinensis*), böğürtlen (*Rubus fruticosus*), zeytin yaprağı (*Olea europaea*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) bitkilerinin özütleri Soxhlet ekstraksiyon ile elde edildikten sonra agar difüzyon teknikleri kullanılarak antibakteriyel etkileri ölçülmüştür.

Sonuç olarak; kullanılan bitkilerin ekstraksiyonu ile elde edilen özütler kullanılarak bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin agar kuyu difüzyon tekniği dışında ki teknikler kullanılarak ölçülmesi ile farklı sonuçlar elde edilebilir. Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen özütlerin içerisindeki etken maddeler belirlenerek bitkisel drogların üretiminde kullanılabilir. Etken maddelerin farklı bakteri çeşitleri üzerindeki etkilerinin referans değerlere göre etkileri karşılaştırılarak denenmemiş bitki örnekleri üzerinde denenebilir ve bu çalışmada elde edilememiş veya test edilememiş bitki örnekleri, bakteri kültürleri ayrı çalışmalarla farklı yöntemler deneyerek detaylandırılıp çalışılabilir. Etken maddeleri tespit etmek için yeni yöntemler ve farklı çözücüler denenmelidir. Bununla birlikte, bitkilerin drogları temel alınarak farklı aktif bileşiklerin bakteriler üzerindeki etkileri, fraksiyonu ve karakteristik özelliklerinin tespiti gelecekte yapılması gereken araştırma konusu olacaktır.

Yaptığımız çalışmada, genel olarak hekzan ile ekstrakte edilen özütlerin yeterli miktarda olmadığı görülmüştür. Bunun nedenini hekzan ın kullandığımız bitkiler için iyi bir çözücü olmamasından ve apolar yapıda olmasından kaynaklanabildiği söylenebilir. Bunun aksine saf su ve etanol polar yapıda olan çözücülerdir. Etanol sarı kantaron, lavanta, defne, maydanoz, böğürtlen meyvesi, zeytin yaprağı ve hatmi için tercih edilmesi gereken çözücülerden biri iken, özellikle yeşil çay özütü elde etmek için saf su tercih edilmelidir. Böğürtlen meyvesi ve defne yaprağından özüt elde edilme sürecinde saf su da çözücü olarak tercih edilebilir. Bu bitkilerin antibakteriyel etkilerinin ölçülmesi ve etken maddelerinin belirlenmesi için farklı klinik çalışmalara da ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Altundağ, Ş., & Aslım, B., (2005). *Kekiğin Bazı Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 12-14.
- Akyüz, E., (2007). *Polygonum bistorta ssp. Carneum Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antibakteriyal Aktiviteleri*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.
- Aureli, P. C., (1992). *Antimicrobial Activity of Some Plant Essential Oils Against Listeria monocytogenes. J. Food Protect.*, 344-348.
- Aydın, F., (2001). *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının değişik yöntemlerle çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıklarının araştırılması*". A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Ayhan, K., (2000). *Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını içinde (37-81)*. Ankara: Sim Matbaacılık Ltd.
- Azaz, A. D., İrtem, H. A., Kürkçüoğlu, M., & Can Başer, K. H., (2004). *Composition and the in vitro Antimicrobial Activities of the Essential oils of some Tymus Species. Z. Naturforsch 59c*, 75-80.
- Bektaş, T., Daferera D., Sökmen M., Polissiou M., Sökmen A., (2 July 2004). *The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of Origanum syriacum L var bevanii. J. Sci.Food. Agric.*, 1389-1396. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1758>
- Beuchat, L. R., (1976). *Sensitivity of Vibrio parahaemolyticus to Spices and Organic Acids. J. Food Sci.*, 889-992.
- Başer, K.H.C. (Ed.), (2010). *Tıbbi ve Aromatik Bitkisel Ürünlerin Üretimi ve Kalite Kontrolü*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, Eylül 2010
- Başustaoğlu A., Aydoğan H., (2002). *Enterokoklar*. Ed: Uzun Ö. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2002;5(2):45-60.
- Büyüktünel E., (2012). *Gelişmiş ekstraksiyon çeşitleri I*. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 32 / Sayı 2 / Temmuz 2012 / ss. 209-242,
- Couceiro MA., Afreen F., Zobayed SMA., Kozai T., (2006). *Variation inconcentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: effects of harvesting time temperature and germplasm. Plant Science* 170(1): 128-134.
- Çolak, N., ve Tülek. Y., (2003). *Süperkritik akışkan ekstraksiyonu*, Pamukkale üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü, Denizli-28.sayı-3 Mayıs-Haziran, 2003
- Dadaloğlu I., Evrendilek G. A., (2004). *Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (Origanum minutiflorum), bay laurel (Laurus nobilis), Spanish lavender (Lavandula stoechas L.) and fennel (Foeniculum vulgare) on common foodborne pathogens. Journal of Agricultural and food chemistry* 2004; 52(26): 8255-8260.

- de Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E.,(1998). *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.
- de Castro, M. L., & Priego-Capote, F., (2010). *Soxhlet extraction: Past and present panacea. Journal of Chromatography A*, 2383.
- Derwich E., Benziane Z, Boukir A., (2009). *Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of Laurus nobilis from Morocco. Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2009; 3(4): 3818-3824.
- Diagne, R. G., Foster., G. D., & Khan, S. U.,(2002). *Comparison of Soxhlet and Microwave-Assisted Extractions for the Determination of Fenitrothion Residues in Beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3204.
- Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., & Szefer, P.,(2004). *Organochlorine pesticides and PCBs in perch Perca fluviatilis from the Odra/ Oder river estuary, Baltic Sea. . Food Chemistry*, 87(1), 17-23.
- Foulquie Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L., (2006). *The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol.*, 106, 1-24. 14. Gimenez-Pereira M.L., 2005. Enterococci in milk products. Yüksek Lisans Tezi, Massey Üniversitesi, Yeni Zelanda.
- Giridhara Upadhyaya P.M., Ravikumar K.L., and Umapathy B.L., (2009). *Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen.*, Indian J. Med. Microbiol., Vol. 27, no. 4, pp. 301-5, 2009. DOI: [10.4103/0255-0857.55437](https://doi.org/10.4103/0255-0857.55437)
- Guenther, E., (1948)., “*The Essential Oils*”, Vol. 1-6, Robert E. Krieger Publishing Co., Inc., Malabar, Florida.
- Güçkan R., Elmas A., Tilgel S., ve Yüksel G., (2013). *Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları*, Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Amasya, Türkiye; Int J Basic Clin Med 2013;1(2): 74-77
- Gürgün V. ve Halkman A.K., (1990). *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı*. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara künyeli kitap bölümü.
- Halkman AK., (2019). *Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları*, 891112005, Ank. Üniversitesi. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2019.
- Hossain S., Heo H., De Silva B. C. J. , Wimalasena S. H. M. P. , Pathirana H. N. K. S. , & Heo Gang-Joon.,(2017), *Antibacterial activity of essential oil from lavender (Lavandula angustifolia) against pet turtle-borne pathogenic bacteria*. Laboratory volume 33, pages195–201 (2017), PMID: **29046693**, PMCID: [PMC5645596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046693/) ,DOI: [10.5625/lar.2017.33.3.195](https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.3.195)
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T., (1993), “*Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*”, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes Volume 1147, Issue 1, Pages 132-136, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)

- İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Baser, K.H.C., Kıvanç, M., (2002).,” *Bazı Umbelliferae türlerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyel etkileri*”. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler (29-31 Mayıs, Eskişehir):355-366. ISBN 975-94077-2-8.
- İzgü, E., (1973). *Genel ve Endüstriyel Farmasi*, Ayyıldız Matbaası, Ankara.
- Kanbar A., Rahal E., And Matar G.M., (2003). *In vitro inhibition of the expression of Escherichia coli O157:H7 genes encoding the shiga-like toxins by antimicrobial agents: Potential use in the treatment of human infections*, March 2003, The Journal of Applied Research 3(2):137-143
- Karakaş, S., & Güvenilir, Y., (2003, Aralık 2018). *İTÜ Akademik Açık Arşiv/Tezler/Fen bilimleri enstitüsü/ Kimya Mühendisliği Lisansüstü programı*.
<https://polen.itu.edu.tr/handle/11527/3793>: <https://polen.itu.edu.tr/handle/11527/3793>
adresinden alındı.
- Kavanagh F., (1972). *Analytical Microbiology*. Academic Press, New York.
- Kaya, D., Ergönül P.G., (2015). *Uçucu Yağları elde etme yöntemleri*, GIDA (2015) 40 (5): 303-310, doi: 10.15237/gida.GD15014 Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa.
- Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer ET., Gucer S., (2010). *Journal of Food Processing and Preservation*; January 2010; 34, 383-396. DOI:[10.1111/j.1745-4549.2008.00318.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00318.x)
- Krzepiłko A., Prażak R., Święcilo A., (2021). *Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Raspberry, Blackberry and Raspberry-Blackberry Hybrid Leaf Buds*. *Molecules* 2021, 26(2), 327;<https://doi.org/10.3390/molecules26020327>.
- Kumar A., Thakur P., Patil S., Payal C., and Sharma P., (2012). *Antibacterial Activity of green tea (Camellia sinensis) extracts against various bacteria isolated from environmental sources*. Volume 4, Issue 1 (2012).
- Kutlular, Ö., (2007, Haziran). *Bazı adaçayı ve kekik türlerinin uçucu yağlarının süper ısıtılmış su ile ekstraksiyonları ve GC-MS ile karakterizasyonları*, Yüksek Lisans Tezi. Denizli, Türkiye: Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Longbottom C.J., Carson C.F., Hammer K.A., Mee J.B., Riley V.T., (2004). *Tolerance of Pseudomonas aeruginosa to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes*. *J Antimicrob Chemother* 2004 Aug;54(2):386-92, doi: 10.1093/jac/dkh359
- Marino, M. B., (1999). *Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Thymus vulgaris L. Measured Using a Bioimpedometric Method*. *J. Food Protect.*, 1017-1023.
- Nakipoğlu, M., & Otan , H., (1992). *Tıbbi Bitkilerin Flavonitleri*, Anadolu,. *J. of AARI*,, 70-93.
- Özan, M., (1996). “*Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile Pseudomonas aeruginosa 'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar*”. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara.).
- Pandit, V. A., (1994). *Sensitivity of Listeria Monocytogenes to Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*. *Food Microbiol.*, 57-63.

- Pattison, E., (1968). *Fatty Acids and Their Industrial Applications*,. Marcel Dekker Inc., NY, .
- Principe, P. P., (1991). *Valuing the Biodiversity of Medical Plants. In Consevation of Medicinal Plants. Eds. Akerele, O.,.*
- Rafajlovska, V. R., (2001). *Contents of Fatty Acids in Stinging Nettle Extracts Obtained by Supercritical Carbon Dioxide*,. *Acta Pharm.*, 45-51.
- Riehemann, K., Behnke, B., & Schulze, K.,(1999). *Plant extracts from stinging nettle (Urtica dioica), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. Science Direc'te FEBS Mektupları,cilt 442,Sayı 1, 89-94.*
- Rousseau, R.W., John Wiley., & Sons., (1987). *Handbook of Separation Process Technology*, ISBN 0-471-89558-X.13 May 1987.
- Santoyo S., Lloria R., Jaime L., Ibanez E., Senorans F. J., Reglero G., (2006). *Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from Laurus nobilis L. Chemical and functional characterization. European Food Research and Technology 2006; 222(5-6): 565-571*
- Sarıkaya, Y., (1997). *Fizikokimya*. Ankara.: Gazi Büro Kitabevi, 2. Baskı, .
- Seyyednejat S., M., Maleki S., Mirzaei N., Damab., and Mota H., (2008). *Antibacterial Activity of Prunus Mahaleb and Parsley (Petroselinum crispum) Against Some Pathogen, Asian Journal of Biological Sciences 1 (1): 51-55, 2008.*
- Seyyednejad, S., M., Koochak, H., Darabpour, E., Motamedi, H., (2010). *A Survey on Hibiscus rosa-sinensis, Alcea rosea L. and Malva neglecta Wallr as Antibacterial Agents, Asian Pasific Journal of Tropical Medicine, 351-355.*
- Sirk T.W., Brown E. F., Sum A. K., and Friedman M., (2008). *Author Information Molecular Dynamics Study on the Biophysical Interactions of Seven Green Tea Catechins with Lipid Bilayers of Cell Membranes.J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 17, 7750–7758, PMID: 18672886, DOI: [10.1021/jf8013298](https://doi.org/10.1021/jf8013298).*
- Sivropoulou, A. P., (1996). *Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. J.Agr. Food Chem., 1202-1205.*
- Sun C., Wu Z., Wang Z., and Zhang H., (2015). *Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of beijing probolis extracs, evidence-based complementary alternative Medicine. Volume 2015. Article ID 595393 | <https://doi.org/10.1155/2015/595393>*
- Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., & Aziz, M., (2000). *Acute Diuretic, Natriuretic and Hypotensive Effects of a Continuous Perfusion of Aqueous Extract of Urtica dioica in the Rat. Journal of Ethnopharmacology, 95-100.*
- Tanker, M., Tanker, N., (1990). “Uçucu yağlar”, Farmakognozi Cilt 2, Ankara Üniversitesi.
- Tan, A., (1992). *Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları. . J. of AARI.*
- Tassou, C. K., (2000). *Inhibition of Salmonella enteridis and Staphylococcus aureus in Nutrient Broth by Mint Essential Oil. Food Res. Int., 273-280.*

Zaika, L. K., (1981). *Inhibitory and Stimulatory Effects of Oregano on Lactobacillus plantarum and Pediococcus cerevisiae. J. Food Sci.*, 1205-1210.

