

## 1.GİRİŞ

Dünya üzerinde 750 bin - 1 milyon arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Doğrudan gıda olarak kullanılmak üzere yetiştirilen türler 3 bin civarındadır. Antik çağlardan 19.yy başlarına kadar geçen sürede artış göstererek, bugün dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan bitki sayısı 20 bine ulaşmıştır. Türkiye’de bu sayının 500 civarında olduğu bildirilmektedir (Baytop 1999).

Tıbbi bitkiler, içlerindeki biyolojik olarak aktif bileşiklerin varlığı bilinmeden, antik çağlardan beri insanlar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmışlardır. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar ve bunlara karşı olan ilgi çok artmıştır. Çünkü, bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz tedavi olanağı mümkün olmaktadır. Ayrıca tedavi alanına sokulan yeni sentetik maddelerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler, ancak kullanıma girdikten sonra tam olarak anlaşılmakta ve onarılması mümkün olmayan zararlara sebep olmaktadır. (Hammer ve ark. 1999).

Türk halkı, çoğunluğunun kırsal bölgede yaşaması nedeniyle, yabancı bitkiler ile yakından ilgilidir. Halk yabancı bitkilerin bir bölümünden gıda, baharat, boyar madde veya ilaç olarak yararlanmaktadır. Bir kısım bitki ise zehirli bileşikler taşıması nedeniyle halk ve hayvan sağlığı nedeniyle önem taşımaktadır. Anadolu’da yabancı bitkilerin gıda ve baharat olarak kullanışı oldukça yaygındır. Birçok yabancı bitkinin toprak üstü kısmı veya kökleri sebze olarak tüketilmektedir. Gıda olarak kullanılan yabancı bitkilerin başında halk arasındaki isimleriyle kenger, evelik, madımak, ebegümece, ciriş, çörtük sayılabilir. (Baytop 1999).

Birçok aromatik bitki de halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerden çoğunlukla tedavi amaçlı kokulu çaylar hazırlanmaktadır. Aromatik bitkilerden hazırlanan drogların birçoğu sindirim sistemi üzerinde etkilidir. Bunlar, gaz söktürücü, hazmı kolaylaştırıcı, safra salgısını arttırıcı olarak kullanılırlar. Bir kısım bitkiler ise idrar söktürücü ve böbrek taşlarını düşürücü etki göstermektedir. Diğer bir kısım solunum yolları üzerine etkilidir. Antiseptik özellikleri yanında solunumu uyarırlar. Bazı aromatik bitkiler de sinir sistemi üzerinde etki göstererek yatıştırıcı olarak kullanılırlar. Bunların dışında, kurt düşürücü, spazm giderici, eflasyon dağıtıcı,

adet ve romatizma ağrılarını giderici ve mikrop öldürücü gibi çeşitli etkilere sahip olan çok sayıda aromatik bitki vardır ( Duke 1985, Baytop 1999).

Aromatik bitkilerin en önemli özellikleri sahip oldukları hoş koku ve tatlarıdır. Bu özelliklerini taşıdıkları uçucu yağlara borçludurlar. Aromatik drogların ve onlardan elde edilen uçucu yağların da maddelerinin hazırlanmasında, parfümeri ve kozmetik sanayinde, tıp ve eczacılık alanlarında geniş bir kullanımı vardır (Baytop 1999).

Bu çalışmada biyolojik olarak aktif maddelerin antimikrobiyel özelliklerinin araştırılması amacı ile 3 farklı esansiyel yağın (limonen, öjenol ve sinnamik asit), 5 adet maya (*Candida oleophila*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia fructicola*, *Saccharomyces uvarum* ve *Schizosaccharomyces pombe*) üzerindeki etkileri ile etken maddelerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmeye çalışılmıştır.

## 2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

Uçucu yağların, aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan genellikle su veya buhar distilasyonu yöntemleri ile elde edilen, kendilerine has koku, tat, renk ve görünüşe sahip karışımlar olduğu belirtilmektedir. Ayrıca uçucu yağların oda sıcaklığında sıvı halde bulunduğu ve açıkta bırakıldıklarında kolaylıkla buharlaşma özelliğine sahip oldukları da ifade edilmektedir. Uçucu yağların çoğunun sudan hafif olduğu ve suyla karışmadıklarından suyun üzerinde toplandığı; ancak bileşimindeki oksijenli bileşiklerin bir kısmı suda çözüldüğü ve bu özelliklerine dayanarak aromatik suların hazırlanabildiği belirtilmiştir (Evans 1996).

Uçucu yağların, bitkilerin başta çiçek ve yaprakları olmak üzere herhangi bir organında ( kabuk, kök, odun, meyve, tohum) bulunabildiği belirtilmektedir. Bazen bitkinin bütün dokularında, bazen de sadece özel organ ve dokularında meydana geldiği ifade edilmektedir. Uçucu yağların bitkinin bağlı olduğu familyaya göre belirli bir oranda salgı tüylerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve salgı ceplerinde bulunduğu, bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmayan bu maddelerin ne amaçla oluştuğunun tam olarak bilinmediği ileri sürülmektedir. Ancak bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları, yaralanmalara karşı oluşan reçineyi çözebilme yeteneğine sahip oldukları bildirilmektedir. Yayıdıkları kokular sayesinde de böcekleri bitkiden uzaklaştırarak bitkiyi korumada yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle sıcak iklimde yaşamaları nedeniyle uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlediği düşünülmektedir. Bu bitkileri taşıyan başlıca familyalar ise *Coniferae*, *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae*, *Labiatae*, *Umbelliferae*, *Iridaceae*, *Zingiberaceae* ve *Graminae* olduğu ifade edilmiştir (Evans 1996).

Uçucu yağların petrol eteri, hekzan, eter, etanol gibi organik çözücülerin çoğunda çözüldüğü düşünülmektedir. Uçucu yağların kalitesinin genellikle yoğunluk kırılma indisi, optik çevirme gibi fizikokimyasal özelliklerle belirlendiği ifade edilmiştir. Optikçe aktif oldukları ve kırılma indislerinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Ayrıca çoğu uçucu yağın, çok sayıda bileşiğin karışımından oluştuğu ve bu yüzden kimyasal kompozisyonlarının oldukça karmaşık olduğu da saptanmıştır (Guenther 1972, Evans 1996).

Aromatik bitkilerin coğrafik bölgelerindeki mevsimsel ve iklimsel değişiklerin bitkinin uçucu yağını oluşturan bileşenlerde dikkate değer derecede farklılıklar ortaya çıkardığı rapor edilmiştir. Kimyasal bileşimlerinin, Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS) sistemi ile belirlenebildiğı saptanmıştır (Guenther 1972, Evans 1996).

Uçucu yağların genellikle hidrokarbonlar ve oksijenli türevlerinden meydana geldiğı tespit edilmiştir. Bu hidrokarbonların çoğu terpenoit kökenli olduğu açıklanmıştır. Çok az bir kısmında aromatik benzen türevleri terpenlerle karışım halinde olduğu saptanmıştır. Terpenlerin  $(C_5H_8)_n$  genel formülüne uyan hidrokarbonlar olduğu ve 2 izopren molekülünün kondensasyonu ile meydana geldiğı ifade edilmiştir (Guenther 1972).

İki izopren molekülünden oluşan 10 karbonlu terpenlerin 'Monoterpen' ( $C_{10}H_{16}$ ), 3 izopren molekülünden oluşan 15 karbonlu terpenlerin 'Seskiterpen' ( $C_{15}H_{24}$ ), 4 izopren molekülünden oluşan 20 karbonlu terpenlerin 'Diterpen' ( $C_{20}H_{32}$ ) olarak adlandırıldığı rapor edilmiştir. 25 karbonluların 'Sesterterpen' ( $C_{25}H_{40}$ ) adını aldığı ve uçucu yağların bileşiminde bu ana yapılarla rastlandığı da ifade edilmiştir. Terpenlerin oksitlenmesiyle oluşan oksijenli türevlerin yağa özgü tat ve koku veren bileşikler olduğu bu oksijenli türevlerin alkol, keton, ester, aldehit oksit, eter ve bunlara benzer yapılarda bulunabildiğı saptanmıştır (Evans 1996).

Uçucu yağ eldesinde 4 temel yöntemin kullanıldığı bildirilmiştir. Bunların; destilasyon, soğukta sıkma, çözücü ekstraksiyonu ve sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon yöntemleri olduğu belirtilmiştir (Deans 1991).

Bütün tıbbi uçucu yağların, limon esansı ve ardıç katranı hariç, destilasyon yoluyla elde edildiğı rapor edilmektedir. Distilasyon ile uçucu yağ eldesinde farklı uygulamalar olduğu da belirtilmiştir (Lawrance 1995).

Uçucu yağ eldesinde bilinen en eski yöntemin su destilasyonu olduğu belirtilmektedir. Drog, su ile birlikte kaynatılınca oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağın soğutucuda yoğunlaşıp Florentin Kabı adı verilen toplama kabında yoğunluğuna göre suyun üstünde veya altında biriktiğı ifade edilmiştir. Laboratuvar ölçekli uçucu yağ miktar tayini için de bu yöntem kullanıldığı belirtilmektedir. Endüstrideki uygulamalara gül yağı üretimi örnek olarak verilmiştir (Lawrance 1995).

Buhar destilasyonu yönteminde bitki materyalinin kaynar suyla değil, su buharı ile distile edildiği bildirilmiştir. Bir buhar kazanında üretilen ve drog üzerine gönderilen su buharı yağı sürükleyerek soğutucuya götürdüğü ve sıvılaştıran su-yağ karışımı toplama kabında yoğunluk farkından dolayı iki tabakaya ayrıldığı ifade edilmiştir. Suyun destilasyon kazanının alt kısmındaki ayrı bir bölmede kaynatılması ve oluşan buharların delikli ızgaranın üstündeki drog tabakasına gönderilmesi halinde yöntem 'Su-Buhar Distilasyonu' adı verildiği bildirilmiştir. Bu yöntemin az gelişmiş ülkelerde ve kırsal kesimde yapılan distilasyonlarda kullanıldığı fakat buhar distilasyonu kadar verimli olmadığı rapor edilmiştir. Narenciye esansları gibi bazı uçucu yağlar distilasyon yöntemi ile bozulması nedeniyle narenciye kabuklarının yağ içeren hücrelerinin patlatıldığı ve açığa çıkan yağın suyla yıkanarak kabuktan alındığı yöntem soğukta sıkma yöntemi olarak ifade edilmiştir. Çözücü ekstraksiyon yönteminde droğun uygun bir organik çözücü ile (benzen, heksan, heptan gibi) ekstre edilip organik çözücüye geçen uçucu yağ, sabit yağ, renk maddeleri ve mumların çözücünün alçak basınçta uçurulması sonucu elde edildiği rapor edilmiştir. Bu bakiyeye konkret adı verildiği ve konkretin etanol ile tüketildiğinde kokulu maddelerin alkole geçtiği ifade edilmiştir. Alkollü ekstreden mum, yağ gibi maddelerin dondurarak ayrılması sonucu kalan ve absolu adı verilen sıvı kısmın ise parfümeride kullanıldığı bildirilmiştir. Uçucu yağ eldesinde kullanılan en pahalı yöntemin anfloraj (enfleurage) usulü olduğu da eklenmiştir (Lawrance 1995).

Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon yönteminin, CO<sub>2</sub> gibi sıvılaştırılmış gazlar kullanılarak gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Saf CO<sub>2</sub>'nin sıvı ve gaz fazda aynı anda bulunabileceği en yüksek sıcaklık ve basıncın kritik sıcaklık ve basınç olduğu ifade edilmiştir. İşlem sıvılaştırılmış gazın kritik noktasının civarında yüksek basınçlı ekstraksiyon kabında sirkülasyonu ile gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Lawrance 1995).

Yine yapılan çalışmalar sonucu esansiyel yağlar içindeki etkili maddelerin flavonoidler olduğu ortaya çıkarılmıştır. Flavonoidler, polifenolik bileşiklerin bir grubudur. Flavonoidlerin antiinflamatuvar, antihepatotoksik ve antiülser gibi biyolojik etkilerinin yanında enzimleri inhibe etme ve antioksidan etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Bir çoğunun antialerjik ve antimikrobiyel etkilerinin yanında bazılarının

da kardiovasküler ölümler için koruyucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Lawrance 1995).

Çalışma konusu olan esansiyel yağların özellikleri şöyledir: Karanfilin, 10-20 m yüksekliğinde, yaprak dökmeyen ağaçlardan elde edildiği bildirilmektedir. Vatanı tropik Asya (Moluk adaları, Zengibar) olarak bilinmektedir. Çiçeklerinin pembe ve kiraz çiçekleri gibi demet halinde bulunduğu gözlenmiştir. Bu çiçeklerin kurutulmuş tomurcuklarının 'karanfil' adını aldığı belirtilmektedir. Çiçek sapları da karanfil adıyla satılmakta ise de ikinci kalite ürün olarak görülmektedir. Karanfile koku ve lezzetini veren 'öjenol' adındaki uçucu yağ olduğu saptanmıştır.

Kurutulmuş tomurcuklar ezilip su buharı distilasyonuna tabi tutulursa %14-20 kadar karanfil esansı denilen uçucu yağ ve bu uçucu yağda %80-90 kadar öjenol ve %3 kadar da asetil öjenol bulunduğu ifade edilmiştir (1\*).

Öjenolün, hoş kokulu, kuvvetli antiseptik ve analjezik bir madde olduğu ve tıpta, diş hekimliğinde ağrı kesici ve antiseptik olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bunların dışında pasta ve şekerlikte, parfümeride, diş macunu yapımında ve sabun sanayiinde kullanım bulmaktadır. Ayrıca öjenol vanilya imalatında kullanılan başlıca maddelerden biridir (1\*).

Tarçının; vatanı Güney ve Güneydoğu Asya olan, yaprak dökmeyen aromatik kokulu ağaçtan elde edildiği bilinmektedir. En çok kullanılan 2 türü olduğu belirtilmektedir. Bunlar Çin ve Seylan tarçınıdır. Tarçının % 0.5-4 oranında esansiyel yağ içerdiği saptanmıştır. Esansiyel yağın bileşiminin; %80 sinamaldehit, %10 öjenol, %5-10 trans-sinamik asit %4-10 fenolik bileşiklerdir (tannin, kateşin, oligomerik proantosiyanidin, limonen, alfa-terpinen) olduğu bildirilmiştir (2\*).

Tarçının pratikte birçok hastalık için tedavi edici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bunlar; ateş düşürücü, iştah açıcı, ülser, mide yanması, mide bulantısı, hazımsızlık, yorgunluk ve enfeksiyon, kalın bağırsakta ve karın boşluğunda duyulan sancıları giderici olarak belirtilmektedir (2\*).

---

1\* <http://www.bitkisagligi.net/karanfil.htm>

2\* <http://www.bahce.biz.com/bitki/baharat/baharatlar/tarcin.htm>

Bununla birlikte ABD'nin Beltsville kentindeki Tarım ve Besleme Araştırma Merkezi'nde yapılan araştırmada tarçının içinde bulunan MHPC (metil hidroksi kalkan polimer) maddesinin kandaki şeker düzeyini belirgin şekilde düşürdüğü saptanmıştır. Sinnamik asitin tarçın aromasına sahip olup, sinamaldehit ile yakın bir ilişkisi olduğu ve tarçın yağının temel bileşenlerinden olduğu saptanmıştır. Sinnamik asitin gıdalara aroma vermek amacıyla ve kozmetikte kullanıldığı belirtilmektedir. Bunun dışında da gıdalardaki antifungal ve antibakteriyel etkisi kanıtlanmıştır (2\*).

Limonun, mart-ekim ayları arasında beyazımsı-pembe renkli, güzel kokulu çiçekler açan, 3-5 m boylarında, kışın yapraklarını dökmeyen küçük boylu ağaçlar olduğu bilinmektedir. Vatanı Çin olup, Akdeniz bölgesinde geniş çapta yetiştirildiği ifade edilmiştir. Onuncu yüzyılda Araplar tarafından Avrupa'ya getirildiği bildirilmiştir. Limonun meyve kabuğu, limon esansı ve usaresi kullanılmaktadır. Limon kabuğunda uçucu yağ, hesperidin acı maddesi ve tanenli bileşikler olduğu belirtilmiştir. Limon esansının, taze meyve kabuklarını sıkmak suretiyle elde edildiği bildirilmektedir. 1500-3000 adet limondan 1 kg kadar esans elde edildiği saptanmıştır. Yeşil olanların sarı ve olgun olanlarından daha fazla esans verdiği belirtilmiştir. Limon yağının limonata yapımında, kozmetik sanayinde, sabun yapımında, pasta-şekerlemecilikte, koku ve lezzet vermek üzere gıda sanayinde kullanıldığı ifade edilmektedir (3\*).

Limon yağı içeriği; uçucu yağ (kabuğun ~%2.5'u), limonen (alfa-terpinen, alfa-pinen, beta-pinen, sitrale bağlı olarak), kumarinler, bioflavonoidler, vitaminler A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C (40-50 mg/100g C vit.) ve musilaj olarak saptanmıştır. D-limonenin yaygın olarak sitruslarda ve birçok baharatta temel madde olarak esansiyel yağlarda bulunduğu ve çoğunlukla aroma ve güzel koku vermesi amacıyla kullanıldığı ifade edilmiştir. Vücuda alınmasının, meyve-sebze ve esansiyel yağlar içeren ürünlerle olduğu bildirilmektedir. Günlük tüketimin 0,2-2mg/kg olması gerektiği tahmin edilmektedir. Limon yağının tıptaki kullanım yerlerinin; boğaz ağrısı, kan basıncı, sindirim bozuklukları, ateş düşürücü, tonik olarak, stres giderici, antiseptik, laksatif durumlarda, astım, bronşit, katarakt, hipertansiyon, akne, varis, solunum sistemi enfeksiyonları, kılcal damar sorunlarını gidermede kullanıldığı bildirilmiştir (3\*).

---

2\* <http://www.bahce.biz.com/bitki/baharat/baharatlar/tarcin.htm>

3\* <http://www.lokman-hekim.com/limon.htm>

Bitkisel ekstraktlar ve uçucu yağlar çeşitli amaçlar için uzun yıllardan beri kullanıldığı ancak son yıllarda farklı özelliklerinden yararlanılarak daha geniş amaçlı kullanımları ve bununla ilgili araştırmalar büyük bir hızla sürdürüldüğü bilinmektedir. Üzerinde en çok durulan konunun ise antimikrobiyel özellikleri olduğu bildirilmiştir. Bu özelliklerinden yararlanılarak uçucu yağların, çiğ ve işlenmiş gıdaların korunmasında, modern ilaçlarda katkı maddesi ve doğal tedavilerde kullanılmaya başlandığı ifade edilmiştir. Bitki ekstreleri ve uçucu yağların antimikrobiyel özelliklerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yayınlanmış çok sayıda makale bulunduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalarda bir çeşit uçucu yağ birçok patojen mikroorganizmaya karşı denenirken bazen de birçok bitki ekstresi ve yağ tek bir mikroorganizma hedef alınarak çalışılmıştır (Hammer ve ark. 1999, Deans ve Dorman 2000).

Kullanılan antimikrobiyal test metotları birbirinden farklılıklar göstermektedir. Ayrıca seçilen yağların ya da bunların elde edildiği bitkilerin gerek toplandığı yer bakımından gerekse ekstraksiyon yöntemleri bakımından farklılıklar mevcuttur. Bu faktörlerden dolayı çalışma sonuçları arasında bazı farklılıklar olma ihtimalinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Vanden Berge ve Vlietinck 1991, Hammer ve ark. 1999).

1960'lı yıllara kadar mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık testleri için birçok yöntem bildirilmiştir. Bakterilerin antibiyotik duyarlılığını tayin etmede kullanılan başlıca iki temel yöntem olduğu belirtilmiştir. Bu yöntemlerin, antibiyotiklerin seri halde seyreltikten sonra mikroorganizmalar ile etkileştirildiği 'titrasyon (dilüsyon veya seyreltme) yöntemleri' ve besiyerine test edilecek kültürün ekilmesinden sonra besiyeri yüzeyine test maddesi emdirilmiş disk yerleştirmek suretiyle yapılan 'diffüzyon yöntemleri' olduğu ifade edilmiştir (Beşe 1989).

Antibiyotiklerin duyarlılıklarını belirlemede kullanılan testler, uçucu yağların antimikrobiyel özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabildiği bilinmektedir. Geçen yüzyıl boyunca uçucu yağların antimikrobiyel aktivitesini belirlemede birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Genelde uçucu yağların antimikrobiyel aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek zordur. Çünkü, uçucu olmaları yanında sudaki çözünürlüklerinin az olması ve karmaşık yapıda olmaları deneyleri güçleştirmektedir. Yapılan deneyi ve sonuçları etkileyen en önemli faktörler ise; deneyin yapılış tekniği, kullanılan besiyeri, kullanılan mikroorganizma ile uçucu yağın yapısal özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (Janssen ve ark. 1987).



Uçucu yağların, uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde aktivite gösteren özel kokulara sahip olması gibi özellikleri olduğu ifade edilmiştir. Uçucu yağların, organik maddelerin kompleks bir karışım halinde bulunduğu heterojen karışımlar olması nedeniyle biyolojik olarak aktif olabilecekleri düşünülmüştür. En çok rapor edilen özellikleri antimikrobiyel olmalarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkarıldığı testlerin belli bir standardizasyona bağlı olmadığı ve hemen her laboratuvarında yapılabildiği belirtilmiştir. Kullanılan tekniklerin ise genel olarak agar difüzyon ve dilüsyon yöntemleri olduğu ifade edilmiştir (Janssen ve ark. 1987).

Dilüsyon teknikleri bir mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılığını tayin etmek için geliştirildiği; ancak bitki ekstraktları veya uçucu yağların da antimikrobiyel özelliklerin belirlenmesinde de kullanıldığı belirtilmektedir. Bu yöntemlerin antimikrobiyel maddelerin seri olarak seyreltilmesi ve üzerine bakteri kültürünün inoküle edilmesi esasına dayandığı bildirilmektedir. İnkübasyondan sonra test edilen antimikrobiyel maddenin, kullanılan mikroorganizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olduğu üremenin varlığı ya da yokluğunun bulanıklık tayiniyle yapıldığı ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon değeri, Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) değeri olarak tanımlandığı ifade edilmiştir. Bu yöntem en çok antibiyotikler için kullanılsa da bitki ekstraktları ve uçucu yağlar için de kullanıldığı saptanmıştır. En önemli avantajının 10-25 µL uçucu yağ ile deneyin gerçekleştirilmesi olduğu bildirilmiştir. Bir diğer avantajının da aynı anda birçok maddeyi test etmesi olduğu saptanmıştır. (Beşe 1989, Vanden Berge ve Vlietinck 1991, Lambert 2000).

Hammer ve ark. (1999) yaptığı bir çalışmada 20 bitkiye ait uçucu yağ mikrodilüsyon sıvı besiyeri yöntemi kullanarak test etmiş, 16 uçucu yağın %2'lik (v/v) konsantrasyonunda, kullandıkları tüm test mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiğini diğer 4 uçucu yağın ise MİK değerlerinin %8 (v/v) değerinden büyük olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mikrodilüsyon sıvı besiyeri ile yapılan bir çalışmada da *Combretum molle* bitkisinin ekstresi, *Staphylococcus aureus*'a karşı denenmiş ve MİK değeri 0.56 mg/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada tetrazolyum tuzları kullanılarak mikrotitrasyon petrilerinde sonucu değerlendirmenin daha kolay olduğu ortaya konmuştur (Eloff 1998).

Antimikrobiyal testlerde kullanılan bir diğer metot da agar difüzyon metodu olduğu ve uçucu yağların test edilmesinde kolaylığından dolayı en çok bu teknik tercih edildiği bildirilmiştir. Agar difüzyon tekniğinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir çukur sistemiyle, test mikroorganizmasının bulunduğu uygun bir besiyerinin kullanıldığı ifade edilmiştir. İnhibisyon zonunun oluşması için belirli bir sürenin geçmesi gerektiği ve bu sürenin “kritik zaman” ( $T_{crit}$ ) olarak adlandırıldığı ifade edilmiştir. Ancak agar difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapları değerleri ve buna karşılık gelen madde konsantrasyonları ile gerçek MİK değerleri arasında kesinlikle bir paralellik olduğu ancak elde edilen zon çaplarının MİK değerleriyle gereken uyumu göstermediği bildirilmiştir (Hadacek ve Greger 2000).

Yapılan bir çalışmada *Peucedanum cervaira* (L.) bitkisinin köklerinden izole edilen ‘Falcarindiol ve Juglon’ maddeleri, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbaum* ve *Fusarium avenaceum* küflerine karşı kağıt disk difüzyon yöntemi kullanılarak denenmiştir. 9 mm’lik kağıt diskler 20 µL maddenin çözeltisinden emdirilerek, üzerinde  $10^4$  cfu/mL spor solüsyonu bulunan besiyerine yerleştirilmiştir. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonları ölçülmüş ve kağıt diskteki madde miktarı MİK değeri olarak verilmiştir. Aynı zamanda mikrodilüsyon yöntemi sıvı besiyerinde denenmiş ve iki yöntem sonuçlarının hemen hemen birbirine benzediği rapor edilmiştir (Hadacek ve Greger 2000).

Seçilen 35 Türk endemik tıbbi bitkisinden 76 ekstrenin elde edildiği bir çalışmada, bu ekstreler *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* ve *Candida albicans*’a karşı agar difüzyon yöntemiyle denenmiştir. 1 ile 11 mm arasında inhibisyon çapları ölçülmüş ve en güçlü aktivite *Perganum harmala* ve *Hypericum scabrum* bitkilerinin ekstrelerinde gözlenmiştir (Sökmen ve ark. 1999).

Mehrabian ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada *Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* ve *Juglans regia* bitkilerinin su, metanol ve kloroformlu ekstraktlarının, havayla taşınan bazı bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyel etkileri agar difüzyon yoluyla belirlenmeye çalışılmıştır. Saboraud Dextrose Agar plakları üzerinde 6.4 mm çapında çukurcuklar açılarak içlerine 200’er µL ekstrakt konulmuştur. Çalışma sonucunda özellikle *Carthamus tinctorius* bitkisinin sulu ekstresinin tüm mikroorganizmalara karşı (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Fusarium solani*,

*Alternaria alternata*) etki gösterdiği ve 25-40 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturduğu bildirilmiştir. Diğer bitki ekstraktlarının de orta derecede antimikrobiyel etkiye sahip oldukları kaydedilmiştir.

Uçucu yağların antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesinde son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan diğer bir yöntemin de biyootografi olduğu ifade edilmiştir. Biyootografi yöntemi bitki ekstraktlarının veya saf maddelerin hem bitki hem de insan patojenlerine karşı denenmesinde oldukça kolay ve doğru sonuçlar veren bir yöntem olarak gösterilmiştir. Bu yöntemde uçucu yağın antibakteriyel özellikleri yanında asıl olarak uçucu yağı oluşturan organik bileşenlerden hangisinin aktiviteden sorumlu olduğunun ortaya konulduğu saptanmıştır (Cannel 1998, Cowan 1999, Mehrabian ve ark. 2000).

Rahalison ve ark.(1994) *Swartzia madagascariensis* (*Leguminosae*) bitkisinin ekstraktını biyootografi yöntemi ile *Candida albicans* 'a karşı değerlendirmişler ve sonuçta İTK plağı üzerinde  $R_f$  0,5 ve 0.82 değerlerine iki ayrı inhibisyon zonu gözlemlemişler ve reaktif madde uygulanan referans plakta gözlenen maddelerin zonu oluşturanlarla birebir aynı konumda oldukları gösterilmiş; ancak zonu oluşturan maddelerin tayini yapılamamıştır. Ayrıca bu ekstraktın mikrodilüsyon sıvı besiyerinde ile *C. albicans*'a karşı güçlü antimikrobiyel aktivite gösterdiği de bildirilmiştir.

Biyootografi yöntemi ile yapılan bir diğer çalışmada *Combretum erythrophyllum* (*Combretaceae*) bitkisinin farklı çözücülerle elde edilmiş ekstraktları, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı denemiş ve *S. aureus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Biyogram plağında ondört ayrı aktif fraksiyon olduğu ve bu fraksiyonların üzerinde net gözlenebilen zonların olduğu bildirilmiştir; ancak bu fraksiyonların hangi maddeler olduğu aydınlatılmamıştır (Martini ve Eloff 1998).

Nostro ve ark. (2000) tarafından *Staphylococcus aureus* kullanılarak *Helichrysum italicum*, *Hieracium pilosella*, *Lonicera caprifolium*, *Nepeta cataria*, *Phytolacca dodecandra* ve *Plantago lanceolata* bitkilerinin çeşitli organlarından hazırlanan ekstraktlar biyootografi tekniği ile denenmiş ve *N. cataria*, *H. italicum*, *P. dodecandra* ekstraktlarının çok net gözlenebilen zonlar oluşturdukları bildirilmiştir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada da farklı ülkelere ait *Mentha piperita* L. (nane) uçucu yağları *Candida albicans*'a karşı biyootografi yöntemi kullanılarak denenmiş ve

inhibisyon zonları gözlenmiştir. Bu zonları oluşturan maddeler izole edilmiş ve GC/MS analizi ile tayin edilmiştir. Sonuç olarak nane uçucu yağının *C. albicans*'a karşı göstermiş olduğu antimikrobiyel etkinin mentolden ileri geldiği bildirilmiştir (İşcan ve ark. 2001).

Uçucu maddelerin özellikle de bitkisel uçucu yağların buhar fazındaki antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcut olduğu belirtilmektedir. En kullanışlı yöntemin ise mikro-atmosfer metodu olduğu savunulmaktadır. Bu yöntemin genellikle filamentli funguslar için daha uygun olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmada hazırlanan fungal sporlar, son konsantrasyonu  $10^4$  spor/nokta olacak şekilde besiyerinin merkezine noktalar halinde inoküle edilmiştir. Bu yöntem ile havadaki fungal ya da bakteriyel yükün yok edilmesi veya zararsız hale getirilmesinde uçucu yağların kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu sayede insanlara zarar vermeden kütüphane, müze, hastane, sinema vb. mekanların atmosferini mikrobiyel floraya karşı uçucu yağlarla koruma şansının olabileceği bildirilmiştir (Delespaul ve ark. 2000).

Bazı araştırmacılar ise uçucu yağları değişik çaplarda filtre kağıtlarına emdirip, farklı miktarlarda uygulayarak, uçucu yağın değil de buhar basıncının bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla uçucu saf maddeler denenmiş ve sonuç olarak buhar basıncının uçucu yağın buhar faz aktivitesini desteklemediği ortaya konmuştur (Janssen ve ark.1987).

Mikro-atmosfer yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 37 bitkiye ait uçucu yağ, müze ve kütüphane havasından izole edilen funguslara karşı denenmiş, *Cymbopogon martini* ve *C. nardus* bitkilerine ait uçucu yağların buhar fazlarının *Aspergillus amstelodami*, *A. niger*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, *Stachybotrys atra* ve *Myrothecium verrucaria*'ya karşı güçlü fungustatik aktivite gösterdiği bildirilmiş ve bu iki bitkiye ait uçucu yağların kapalı mekanların korunmasında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Delespaul ve ark. 2000).

Basım ve ark. (2000) *Thymra spicata L. var. spicata* bitkisinin uçucu yağını, ekonomik bakımdan önemli bitki patojenleri olan *Erwinia amylovora*, *E. caratovora pv. caratovora*, *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria* bakterilerine karşı denenmiş ve sırasıyla 59, 569, 91, 684, 98 ve 41 mg/mL'lik

konsantrasyonları minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) olarak bildirmişlerdir.

Stange ve ark.(2002)'nın, *Penicillium* türleri üzerinde farklı sitrus kabuk ekstraktlarının etkisini araştırdıkları çalışmalarda 7 farklı sitrus kabuğu %80'lik etanolle ekstrakte edilip *Penicillium* türleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak bu ekstraktların; *Penicillium* türlerinden bazılarını (*P.expansum*, *P.italicum*, *P.digitatum*) teşvik edici etkisinin olduğu, ancak bunun yüksek seyreltmelerde etkisinin azaldığı rapor edilmiştir. Bu küflere karşı en fazla etkili olan maddelerin ise seskiterpen ve monoterpen (limonen dışında) olduğu ifade edilmiştir. Bunun dışında; *P.expansum* üzerinde daha az çalışma yapıldığı bunun nedeninin ise bu küfün 21 tür bitkide hastalığa yol açmasına rağmen sitrus meyvelerinde hastalığa neden olmaması olarak belirtilmiştir.

### **3.MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1.Materyal**

Materyal olarak Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan saf maya kültürleri kullanılmıştır. Araştırmada seçilen türler, *Saccharomyces uvarum* ve *Schizosaccharomyces pombe* U.Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden, *Candida oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata* U.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden elde edilmiştir. Etken madde olarak ise Aromsa firmasından temin edilen sinnamik asit, öjenol ve limonen kullanılmıştır.

#### **3.2.Yöntem**

Denemede Malt Ekstrakt sıvı ve katı (Anonim 1995) besiyerleri kullanılmıştır. Maya gelişimini engellemek amacıyla, Aromsa firmasından temin edilen sinnamik asit, öjenol ve limonenin, etanolde seyreltilmiş çeşitli konsantrasyonları kullanılmıştır. Tez çalışması yapılırken birim üzerinden çalışılmış ve sonuçlar konsantrasyona çevrilmiştir.

##### **3.2.1. Mayaların Aşılması**

Mayalar araştırma süresince iki ayda bir yatık Malt Ekstrakt Agar (MEA-Merck)'da yenilenecek muhafazaya alınmıştır. Deneme aşamasında, yatık agardan 1 öze dolusu kültür alınarak 10 mL steril Malt Extract sıvı (MEB-Merck) içeren tüplere aşılmalıdır. Tüpler 30°C'de 24 h inkübasyona bırakılarak ekimde kullanılacak genç kültürler hazırlanmıştır (Abbasoğlu 1996, Anonim 2000).

##### **3.2.2.Antimikrobiyel Özelliğın Belirlenmesi**

Öjenol, sinnamik asit ve limonenin antimikrobiyel özelliğinin belirlenmesinde disk diffüzyon ve tüp seyreltme yöntemleri kullanılmıştır.

###### **3.2.2.1.Disk Diffüzyon Yöntemi**

15-20 mL besiyeri dökülmüş petrilerin yüzeyine 0,2 mL 24 saatlik test mikroorganizması sürülmüştür. Daha sonra 6 mm çaplı steril disk (Schleicher&Schvellasoy Discs-6mm) petriye steril koşullarda yerleştirilmiştir.

Disklere, etanolde çeşitli konsantrasyonlarda çözüldürülmüş limonen, sinamik asit veya öjenolden 10 µL emdirilmiştir. Aşılama 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Buharlaşmayı önlemek için petrilere poşetlenerek 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Abbasoğlu 1996, Anonim 2000).

### **3.2.2.2. Tüp Seyreltme Yöntemi**

2.5 mL Malt Ekstrakt Broth içeren tüplere 0,5 mL kültür aşılama etanolde çeşitli konsantrasyonlarda alkolde çözüldürülmüş öjenol, sinamik asit veya limonenden 10 µL aşılama yapılmıştır. Aşılama 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Aşılama tüpleri 30°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra öze ile Malt Ekstrakt Agar dökülmüş petrilere ekim yapılarak 24-48 saat sonundaki maya gelişimi gözlenmiştir (Abbasoğlu 1996, Anonim 2000).

### **3.2.2.3. Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi**

Her deneme başlangıcında test mikroorganizmasının sayısı belirlenmiştir. Mikroorganizma sayısının belirlenmesinde yayma yöntemi kullanılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda seyreltilmiş olan dilüsyonlardan 0,1 mL çekilerek Malt Ekstrakt Agar dökülmüş petrilere aşılama yapılmıştır. Mayaların gelişme süresine göre 30°C'de 24 veya 48 saatte üreyen petrilere sayım yapılmıştır (Anonim 1995).

### **3.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Petrilere maya gelişimi her 24 saatte bir ve 2 gün süreyle izlenmiştir. İnkübasyon süresi boyunca zon çapları kaydedilmiştir. Sıvı kültür denemelerinde ise tüplerden öze ile Malt Ekstrakt Agar dökülmüş petrilere ekim yapılarak 24-48 saat sonundaki maya gelişimi olup olmadığı gözlenmiştir (Anonim 2000).

### **3.2.4. İstatistiksel Analiz**

Öjenol, limonen ve sinamik asitin test mayaları üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kümeleme analizleri, Özdamar (2004) SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Mikroorganizma Sayısının Belirlenmesi

Çizelge 4.1’de denemede kullanılan test mikroorganizmalarına ait sayım sonuçlarının ortalama değerleri görölmektedir. Her ekim sonunda yapılan sayımların yakın değerde olmaları elde edilen sonuçlarda mikroorganizmaların sayısal farklılığından doğabilecek hataları ortadan kaldırmıŐtır (Anonim 2000).

**Çizelge 4.1. Mikroorganizmaların Sayım Ortalamaları**

Mikroorganizma Adı	Sayım (kob/mL)
<i>Candida oleophila</i>	$2,9 \times 10^7$
<i>Kloeckera apiculata</i>	$7,1 \times 10^7$
<i>Metschnikowia fructicola</i>	$3 \times 10^7$
<i>Saccharomyces uvarum</i>	$4,68 \times 10^6$
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$7,6 \times 10^6$



## 4.2.Disk Difüzyon Yöntemine Ait Sonuçlar

### 4.2.1.Öjenole Ait Sonuçlar

Çizelge 4.2.1’de etil alkolde çözüldürülmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenolün test mayaları üzerindeki inhibisyon zon çapları verilmiştir.

**Çizelge 4.2.1. Öjenolün test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon çapları (mm)**

Konsantrasyonlar (g/100mL)	Test Mikroorganizmaları				
	<i>C.oleophila</i>	<i>K.apiculata</i>	<i>M.fructicola</i>	<i>S.uvarum</i>	<i>S.pombe</i>
53,35	27,3	24,1	23,5	24,2	27,4
35,56	22,6	22	23,5	19,6	19,8
17,78	20,6	19,9	20,5	12,6	16,21
9,70	11,9	11,9	9,3	10,3	10,8
9,28	*	*	7,1	*	*
9,20	*	*	7,0	*	*
9,12	*	*	-	*	*
8,21	11,3	11,4	*	*	*
7,62	*	10,5	*	*	*
7,46	*	*	*	*	7,5
7,41	*	*	*	*	7,1
7,36	*	*	*	*	7,0
7,31	*	*	*	*	7,0
7,26	*	*	*	*	-
7,11	8,1	*	*	7,0	*
6,97	*	*	*	7,0	*
6,84	*	*	*	7,0	*
6,80	*	*	*	7,0	*
6,75	*	*	*	-	*
6,67	*	8,7	*	*	*
6,55	7,0	*	*	*	*
6,51	7,0	7,1	*	*	*
6,47	-	-	*	*	*

**-: Zon oluşumu gözlenmemiştir.**

**\*: Bu konsantrasyonda deneme yapılmamıştır.  
n=4 (4 tekerrürülü çalışılmıştır)**

*M.fructicola*’nın minimum inhibisyon konsantrasyonunun %9.20 olduğu belirlenmiştir. Öjenole karşı en dirençli mikroorganizmanın *M.fructicola* olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla *S.pombe* (%7.31) ve *S.uvarum* (%6.80) takip etmektedir. En

dirençsiz mikroorganizmaların ise %6.51'lik konsantrasyonla *C.oleophila* ve *K.apiculata* olduğu belirlenmiştir.

Öjenolün *Rhizopus stolonifer*, *Mucor sp.* ve *Sclerotinia sclerotiorum* küfleri üzerinde inhibitör etkisinin denendiği bir çalışmada minimum inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla %9.4 , %9.3, %9.5 olarak bulunmuştur (Edris ve Farrag 2003). Bu değerler test mayalarından *M.fructicola*'ya çok yakındır.

Yine öjenol, timol, karvakrol ve allisinin mikotoksijenik *Aspergillus* üzerindeki inhibisyon etkisinin derecelerinin araştırıldığı bir çalışmada, öjenolün diğerleri arasında en etkili etken madde olduğu gözlenmiştir (Snyder 1997).

#### 4.2.2. Limonene Ait Sonuçlar

Çizelge 4.2.2'de etanolde çözündürülmüş, farklı konsantrasyonlardaki limonenin, test mayaları üzerindeki inhibisyon zon çapları verilmiştir.

Limonene karşı da yine en dirençli mikroorganizmanın %47.10'luk değerle *M.fructicola* olduğu tespit edilmiştir. Ancak minimum inhibisyon konsantrasyonu öjenole nazaran oldukça düşüktür. *M.fructicola*'yı %40.68'lik değerle *C.oleophila* takip etmektedir. *K.apiculata*'nın minimum inhibisyon konsantrasyonu %29.83'lük değerle 3.sırada yer almaktadır. Limonene karşı en dirençsiz mikroorganizmanın *S.pombe* olduğu tespit edilmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu ise %6.30'dur. *S.pombe*'yi yakın bir değerle *S.uvarum* izlemektedir. *S.uvarum*'un minimum inhibisyon konsantrasyonu ise %9.73 olarak tespit edilmiştir. Görüldüğü gibi diğer mikroorganizmaların öjenol ve limonene dirençleri arasında büyük fark olmasına rağmen *S.pombe* ve *S.uvarum*'un bu etken maddelere karşı dirençleri hemen hemen aynıdır.

Limonenin küfler (*Aspergillus flavus*, *A.ochraceus* ve *A.parasiticus*) üzerinde antimikrobiyel etkisinin araştırıldığı bir çalışmada MİK değerleri sırasıyla %27.73, %21.46 ve %22.68 olarak bulunmuştur (Badeaa ve Soliman 2002). Öjenolde olduğu gibi limonende de küflerin MİK değerleri kullanılan test mayalarından birine (*K.apiculata* %29.83) oldukça yakındır.

**Çizelge 4.2.2. Limonenin test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon çapları (mm)**

Konsantrasyonlar (g/100mL)	Test Mikroorganizmaları				
	<i>C.oleophila</i>	<i>K.apiculata</i>	<i>M.fructicola</i>	<i>S.uvarum</i>	<i>S.pombe</i>
89,50	*	8,9	9,7	16,4	27,6
59,67	*	*	9,3	*	*
52,65	*	*	7,1	*	*
47,10	*	*	7,0	*	*
46,86	*	*	-	*	*
44,75	7,0	8,8	*	11,5	*
42,62	7,0	*	*	*	*
40,68	-	*	*	*	*
29,83	-	7,1	*	11,0	*
28,87	*	-	*	*	*
22,37	*	-	*	*	*
17,90	*	*	*	*	18,1
12,78	*	*	*	10	15,9
9,94	*	*	*	7,2	13,6
9,83	*	*	*	7,0	*
9,73	*	*	*	7,0	*
9,62	*	*	*	-	*
8,95	*	*	*	-	*
7,46	*	*	*	*	7,5
6,39	*	*	*	*	7,1
6,30	*	*	*	*	7,0
6,26	*	*	*	*	-
6,17	*	*	*	*	-
5,97	*	*	*	*	-

-: Zon oluşumu gözlenmemiştir.

\*: Bu konsantrasyonda deneme yapılmamıştır.

n=4

### 4.2.3. Sinnamik Asite Ait Sonuçlar

Çizelge 4.2.3'te etanolde çözündürülmüş, farklı konsantrasyonlardaki sinnamik asitin test mayaları üzerindeki inhibisyon zon çapları verilmiştir.

**Çizelge 4.2.3. Sinnamik asitin test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon çapları (mm)**

Konsantrasyonlar (g/100mL)	Test Mikroorganizmaları				
	<i>C.oleophila</i>	<i>K.apiculata</i>	<i>M.fructicola</i>	<i>S.uvarum</i>	<i>S.pombe</i>
4,0	7,5	9,9	9,9	14,1	*
3,84	*	*	9,0	9,5	-
3,80	*	*	8,1	-	7,0
3,60	7,5	9,0	7,4	*	*
3,24	7,0	*	7,0	*	*
3,20	-	*	-	*	*
2,84	*	-	-	*	*
2,80	*	7,1	-	*	*
0,40	*	*	-	*	*
0,04	*	*	-	*	*
0,02	-	-	-	-	-
0,004	-	-	-	-	-

**-: Zon oluşumu gözlenmemiştir.**

**\*: Bu konsantrasyonda deneme yapılmamıştır.**

**n=4**

Test mayalarının sinnamik asite karşı gösterdikleri direnç arasında farklılıklar bulunmasına rağmen, konsantrasyonlar arasında çok büyük bir farklılık gözlenmemiştir. sinnamik asite karşı en direçli mikroorganizmanın *S.uvarum* olduğu ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun da %3.84 olduğu tespit edilmiştir. Bunu %3.80'le *S.pombe*, %3.24 ile *C.oleophila* ve *M.fructicola* izlemektedir. En dirençsiz mikroorganizmanın ise %2.8 ile *K.apiculata* olduğu belirlenmiştir.

Sinnamik asit'in *Aspergillus flavus*, *A.ochraceus* ve *A.parasiticus* küfleri üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada MİK değerleri sırasıyla %5.92, %3.24 ve %2.57 olarak bulunmuştur (Badeaa ve Soliman 2002). *A. flavus* dışındaki küflerin minimum engelleme konsantrasyonları test mayalarına oldukça yakın olup diğer iki etken madde de olduğu gibi sinnamik asitte de paralellik göstermiştir.

### 4.3. Tüp Dilüsyon Yöntemine Ait Sonuçlar

#### 4.3.1. Öjenole Ait Sonuçlar

Çizelge 4.3.1’de etil alkolde çözündürülmüş farklı konsantrasyonlardaki öjenolün test mayaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları verilmiştir.

**Çizelge 4.3.1. Öjenolün test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları**

Konsantrasyonlar (g/100mL)	Test Mikroorganizmaları				
	<i>C.oleophila</i>	<i>K.apiculata</i>	<i>M.fructicola</i>	<i>S.uvarum</i>	<i>S.pombe</i>
106,70	-	-	-	-	-
53,35	+	+	+	+	+
71,13	-	-	-	-	-
66,69	-	-	*	-	-
62,76	-	-	*	-	-
59,28	-	-	*	-	-
54,72	-	-	*	-	-
54,44	+	+	*	-	-
54,16	*	*	*	+	+
53,89	*	*	*	*	+

-: Üreme yok.

+: Üreme var.

\*: Bu konsantrasyonda deneme yapılmamıştır.

n=4

Tüp dilüsyon yöntemi ile yapılan denemelerde de disk difüzyon yönteminde olduğu gibi en dirençli mikroorganizmanın %71.13’lük değerle *M.fructicola* olduğu tespit edilmiştir. Ancak minimum inhibisyon konsantrasyonu disk difüzyon yöntemine nazaran oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. *K.apiculata* ve *C.oleophila* eşit direnç göstererek (%54.72) *M.fructicola*’yı takip etmişlerdir. Üstelik konsantrasyon farklı olmasına rağmen disk difüzyon yönteminde de bu iki mikroorganizma eşit direnç göstermiştir. *S.pombe* %54.44’lük değerle 4.sırada ve *S.uvarum* ise %54.16’lık değerle son sırada yer almıştır. Görüldüğü gibi *M.fructicola* dışındaki mikroorganizmalar disk difüzyon yöntemi ile paralellik göstermemektedir.

Tüp dilüsyon yöntemi ile yapılan denemelerde limonenin saf olarak kullanıldığı durumda dahi hiçbir test mayasında gelişmeye engel olamadığından farklı konsantrasyonlarda deneme yapılmamıştır.

#### 4.3.2. Sınnamik Asite Ait Sonuçlar

Çizelge 4.3.2.'de etanolde özündürölmüş, farklı konsantrasyonlardaki sınnamik asitin test mayaları üzerindeki inhibisyon zon çapları verilmiştir.

**Çizelge 4.3.2. Sınnamik asitin test mikroorganizmaları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları**

Konsantrasyonlar (g/100mL)	Test Mikroorganizmaları				
	<i>C.oleophila</i>	<i>K.apiculata</i>	<i>M.fructicola</i>	<i>S.uvarum</i>	<i>S.pombe</i>
6,00	-	-	-	*	*
5,40	*	-	-	*	*
5,20	*	+	+	*	*
5,00	*	+	+	*	*
4,90	-	+	+	-	*
4,80	-	*	*	*	-
4,60	-	*	*	*	*
4,40	-	*	*	*	*
4,36	-	*	*	*	*
4,32	+	*	*	*	*
3,84	*	-	*	-	-
3,80	*	+	*	+	+
2,40	*	+	*	+	+
0,40	+	+	+	+	+
0,20	+	+	+	+	+
0,08	+	+	+	+	+
0,004	+	+	+	+	+

-: Üreme yok.

+: Üreme var.

\*: Bu konsantrasyonda deneme yapılmamıştır.

n=4

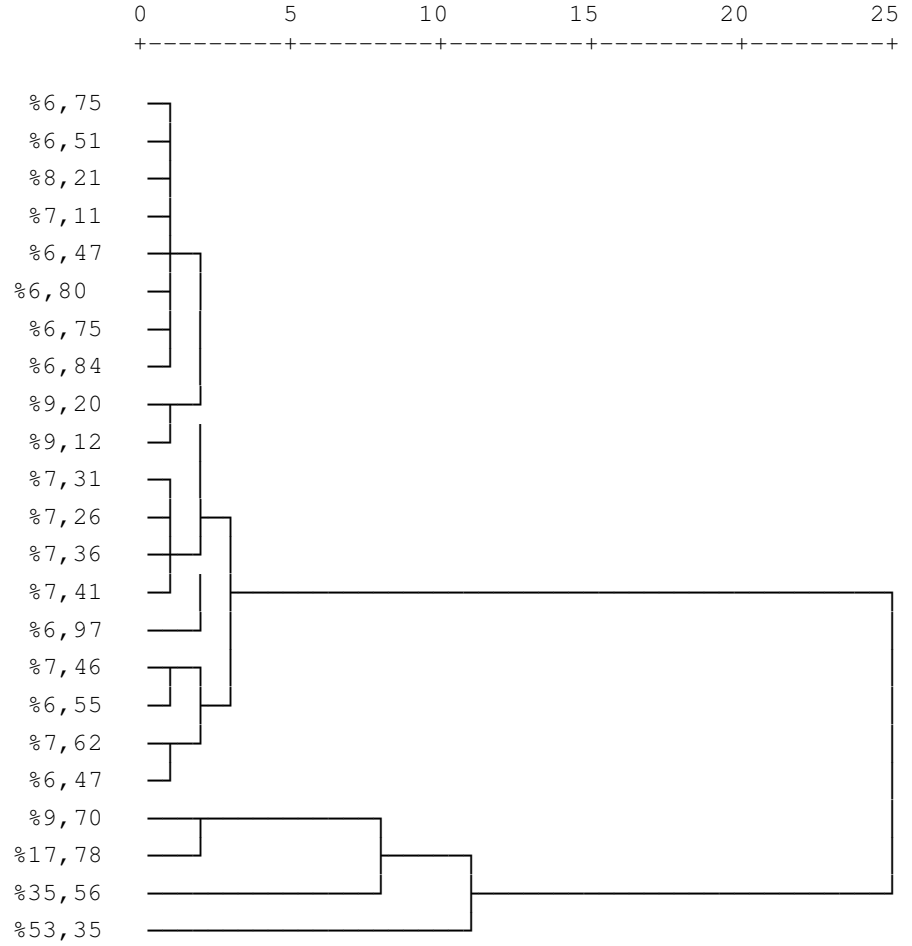
*M.fructicola* ve *K.apiculata* %5,4'lük değerle sınnamik aside karşı en dirençli mayalar olarak bulunmuştur. *C.oleophila* bunu takip etmekte olup minimum inhibisyon konsantrasyonu %4.36'dır. En dirençsiz mikroorganizmalar ise *S.pombe* ve *S.uvarum*'dur. Bunların minimum inhibisyon konsantrasyonu %3.84 olarak tespit edilmiştir. Durum disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırıldığında yine herhangi bir paralellik göstermemektedir. Çünkü disk difüzyon yönteminde konsantrasyonlar %3.84-%2.8 arasında değiştirdiğinden değerler hemen hemen aynı olup farklılık sadece mikroorganizmaların dirençlerindeki sıralamadır.

Esansiyel yağların mikroorganizmalar üzerindeki bu etkilerinin ne şekilde olduğu konusunda yapılan bir çalışmada esansiyel yağın mitokondrial DNA'ya zarar verdiği belirlenmiştir. Buradaki zararın DNA içinde bulunan 2 adet genin birleşmesiyle ortaya çıktığı belirtilmiştir. Bu genlerden birinin RNR<sub>3</sub> (DNA metabolizmasında yer alan gen), diğerinin ise RAD<sub>51</sub> (DNA'yı onarmakta görev alan gen) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada esansiyel yağların diğer zararlarının ise stoplazma zarında mutasyon ve mitokondrial yapılarda ve fonksiyonlarında bozukluğa neden olduğu saptanmıştır. *S.cerevisiae* üzerinde yapılan bu çalışmadan elde edilen sonucun tüm mayalar için de geçerli olabileceği ifade edilmiştir (Bakkali ve ark. 2005).

4 *Candida* türü üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise (*C.albicans*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.albicans ATCC 10231*) esansiyel yağın maya hücresi etrafında özel bir duvar oluşturduğu, ardından maya hücresinin duvarının merkeze doğru küçüldüğü ve arada kalan boşlukta büyük vakuoller olduğu saptanmıştır. Daha sonra ise hücre duvarının tamamen deforme olduğu ifade edilmiştir (Nakamura ve ark. 2004).

#### 4.4 İstatistiksel Analiz Sonuçları ve Tartışma

Öjenol konsantrasyonlarının test mayaları üzerine etkisi şekil 4.4.1.'de görülmektedir.

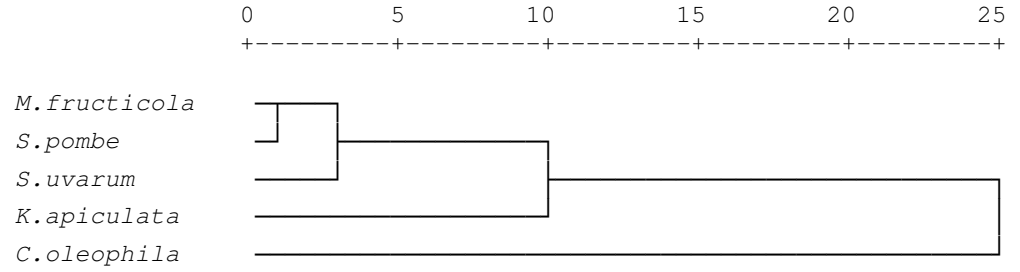


Şekil 4.4.1. Öjenol konsantrasyonlarının test mayaları üzerindeki etki diyagramı

Öjenole ait grafik incelendiğinde, kümeleme analizi ile elde edilen ağaç diyagramındaki gruplaşmanın temel olarak 3 tane olduğu gözlenmektedir. 1.grup sıfır çizgisine en yakın olan grup olup deneme yapılmayan konsantrasyonlar ve en düşük konsantrasyon değerleri bu grupta yer almaktadır. 2.grupta yer alan %9,70 ve %17,78 'lik konsantrasyonlar test mayaları üzerine benzer etkiler gösterirken, %35,56'lık konsantrasyon daha yüksek inhibisyon etki göstermesine rağmen aynı grupta yer almıştır. 3.grupta ise test mayaları üzerine en etkili sonucu veren %53,35'lik konsantrasyon yer almıştır.



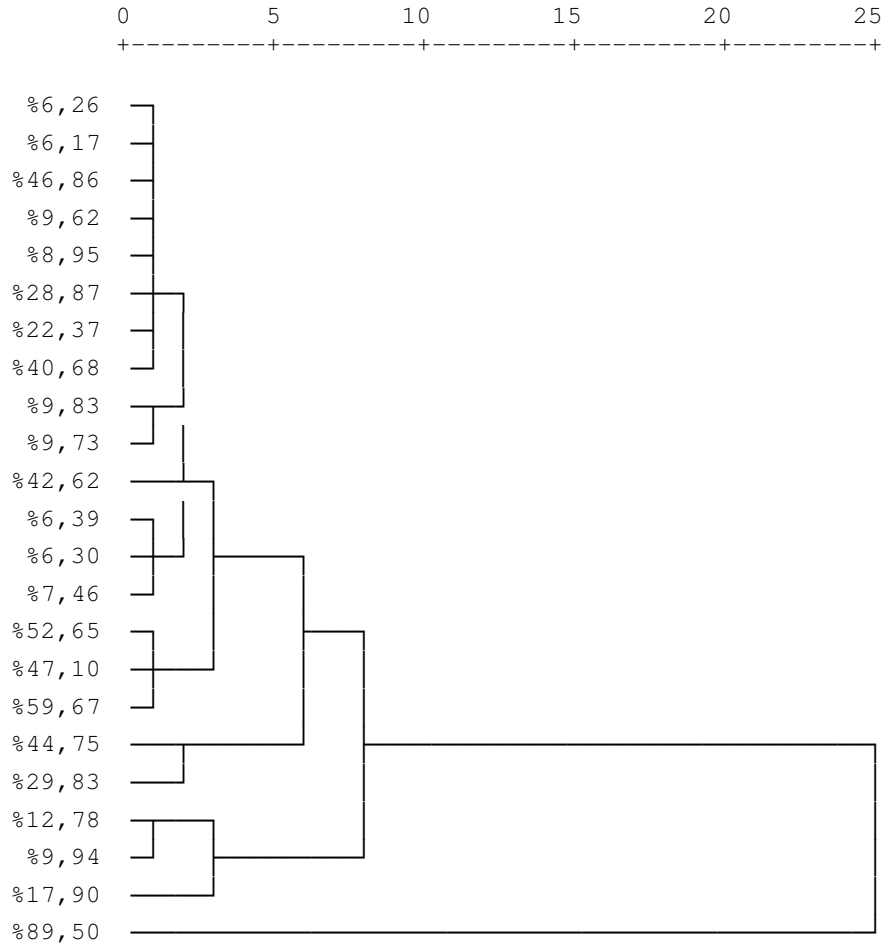
Test mayalarının öjenole karşı duyarlılıkları şekil 4.4.2.'de görülmektedir.



Şekil 4.4.2. Test mayalarının öjenole karşı duyarlılık diyagramı

Test mayalarının öjenole karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde *M. fructicola*, *S. pombe*, *S. uvarum*'un birbirine yakın etki gösterdiği gözlenmiş, öjenolün yüksek konsantrasyonlarında ancak inhibe edildiği görülmüştür. *K. apiculata* ise bu üç mayadan daha az dirençli olup 2. grupta yer almıştır. Öjenolün en etkili olduğu test mayasının ise *C. oleophila* olduğu belirlenmiştir. Bu diyagramdaki değerlendirme disk difüzyon yöntemi ile paralellik göstermektedir.

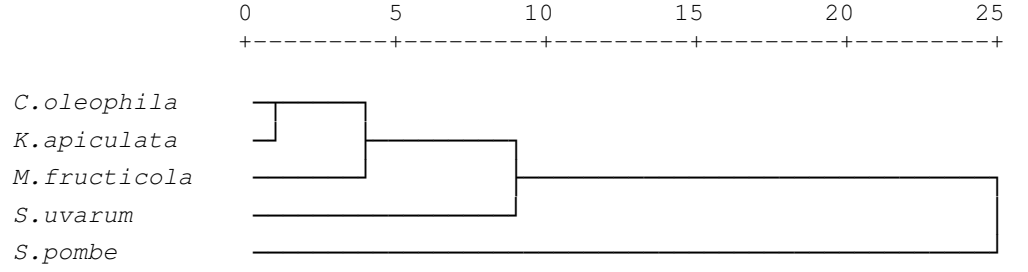
Limonen konsantrasyonlarının test mayaları üzerine etkisi şekil 4.4.3.'te görülmektedir.



Şekil 4.4.3. Limonen konsantrasyonlarının test mayaları üzerindeki etki diyagramı

Limonen konsantrasyonlarının test mayaları üzerindeki etki diyagramında belirgin 3 grup görülmektedir. 1.grup sıfır çizgisine en yakın olan grup olup, deneme yapılmayan konsantrasyonlar ve en düşük konsantrasyon değerleri bu grupta yer almaktadır. 2.grupta ise %52.65, %6.30 ve %9.94'lük konsantrasyonlar yer almaktadır. En fazla etkiyi %89.50'lik konsantrasyon gösterirken buna en yakın değer %44.75'lik konsantrasyon olup 3.grupta yer almaktadır.

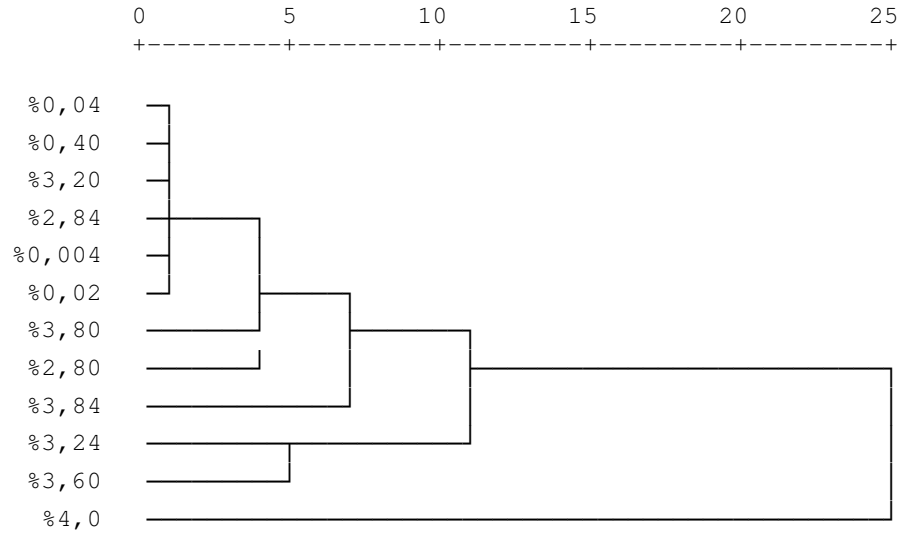
Test mayalarının limonene karşı duyarlılıkları şekil 4.4.4.'te görülmektedir.



Şekil 4.4.4. Test mayalarının limonene karşı duyarlılık diyagramı

Test mayalarının limonene karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde *C.oleophila*, *K.apiculata*, ve *M.fructicola* birbirine en yakın etki göstererek 1.grubu oluşturduğu gözlenmiştir. Bu grup limonene karşı en dirençli gruptur. *S.pombe* ise en duyarlı maya olup 3.grupta yer almaktadır. Bu diyagramdaki değerlendirme disk difüzyon yöntemi ile paralellik göstermektedir.

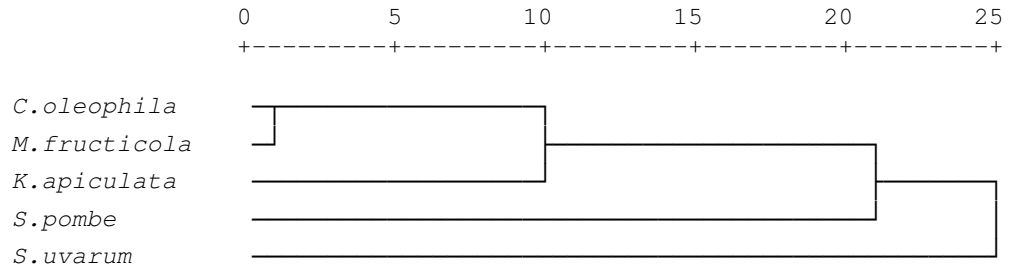
Sinnamik asit konsantrasyonlarının test mayaları üzerine etkisi şekil 4.4.5.'te görülmektedir.



Şekil 4.4.5. Sinnamik asit konsantrasyonlarının test mayaları üzerindeki etki diyagramı

Sinnamik asit konsantrasyonlarının test mayaları üzerindeki etki diyagramında belirgin 3 grup görülmektedir. 1.grup sıfır çizgisine en yakın olan grup olup, deneme yapılmayan konsantrasyonlar ve en düşük konsantrasyon değerleri bu grupta yer almaktadır. 2.grupta ise %3.84, %3.80, %3.60, %3,24 ve %2.80'lik konsantrasyonlar birbirine benzer etki göstererek aynı grupta yer almıştır. En fazlaya etkiyi gösteren konsantrasyon ise %4'lük konsantrasyon olup 3. grupta yer almıştır.

Test mayalarının sinnamik asite karşı duyarlılıkları şekil 4.4.6.'da görülmektedir.



Şekil 4.4.6. Test mayalarının sinnamik asite karşı duyarlılık diyagramı

Test mayalarının limonene karşı gösterdikleri direnç incelendiğinde; en dirençli mayalardan *C.oleophila* ve *M.fructicola*'nın birbirine çok yakın etki gösterdiği, *K.apiculata*'nın ise daha az dirençli olduğu gözlenmiştir. *S.pombe* ve *S.uvarum*'un etkisinin birbirine çok yakın ve en duyarlı mayalar olduğu saptanmıştır.

## 5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu araştırma ile 5 adet test mayasının (*M.fructicola*, *S.uvarum*, *S.pombe*, *C.oleophila*, *K.apiculata*), 3 adet etken madde (öjenol, sinnamik asit ve limonen) üzerindeki antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

- A) Deneme materyali olan 3 etken madde içerisinde sinnamik asitin, gerek disk difüzyon gerekse tüp dilüsyon yönteminde diğer etken maddelere nazaran daha düşük konsanrasyonlarda inhibisyon etkisi göstererek en etkili etken madde olduğu saptanmıştır.
- B) Limonen, tüp dilüsyon yönteminde hiç etki göstermezken, disk difüzyon yönteminde yüksek konsantrasyonlarda engelleyici etki göstererek en az etkili etken madde olduğu belirlenmiştir.
- C) Öjenolün disk difüzyon yöntemindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları oldukça düşükken (%9.20, %7.31, %6.80, %6.51), tüp dilüsyon yönteminde oldukça yüksektir (%71.13, %54.72, %54.44, %54,16).
- D) Sinnamik asitin test mayaları üzerindeki MİK değerleri 2 yöntemde de çok küçük farklılıklar göstermesine rağmen mayaların sıralamasında büyük farklılıklar gözlenmiştir.
- E) Limonenin disk difüzyon yöntemindeki MİK değerleri arasında çok büyük farklılıklar gözlenmiştir (%47.10, %40.68, %29.83, %9.73, %6.30)
- F) Disk difüzyon yönteminde öjenole ve limonene karşı en dirençli maya *M.fructicola* olmuştur. Tüp dilüsyon yönteminde de öjenole ve sinnamik asite karşı yine en etkili maya *M.fructicola* olmuştur. Yalnızca disk difüzyon yönteminde sinnamik asite karşı *M.fructicola* (%3.24) değil, çok az farkla *S.uvarum* (%3.84) en dirençli maya olmuştur.
- G) Genel olarak mayaların farklı etken maddelere karşı dirençleri arasında bir paralellik gözlenmemiştir.

Sonuç olarak bitkisel ekstraktların ve uçucu yağların antimikrobiyel özelliklerinin araştırılmasıyla ilgili olarak yayınlanmış çok sayıda makale olduğu bilinmektedir. Bu çalışmalarda çeşitli uçucu yağlar test mikroorganizmalarına karşı

denenmiş ve antimikrobiyel etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece biyolojik olarak aktif olan bu maddelerin, kimyasal koruyuculara karşı alternatif olarak kullanılması yolunda bir alternatif olabileceği düşünülmekte olup, daha geniş olarak çok sayıdaki mikroorganizmalar üzerindeki etkilerinin de araştırılması önerilmektedir.

**KAYNAKÇA**

ABBASOĞLU, U. 1996. Antimicrobial Aktivite Araştırma Yöntemleri. FABAD J.Pharm. Sci., 22, 111-118.

ANONİM. 1995. The Oxoid Marvel 7th Ed unioqht Ltd. Basingstake.

ANONİM. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Eucast Definitive Document E. Def. 3.1, 6, 509-515.

BADEAA, R.I., SOLİMAN, K.M. 2002. Effect of Oil Extracted From Some Medicinal Plants on Different Mycotoxigenic Fungi, 278-291.

BAKKALİ, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., ZHIRI, A., IDAOMAR, M. 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 1-13, 585.

BASIM, H., YEGEN, O., ZELLER, W. 2000. Antibacterial Effect of Essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on Soma Plant Pathogenic Bacteria, J. Plant Dis. Prot. 3, 279-284.

BAYTOP, T. 1999. Türkiyede Bitkiler ile Tedavi Geçmişten Bugüne, 2. Baskı, Nobel Tıp Basımevi, İstanbul.

BEŞE, M. 1989. Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, Kardeşler Basımevi, İstanbul.

CANNEL, J.P.R. 1998. Natural Products Isolation, Humana Press, New Jersey, USA, 240-241.

COWAN, M.M. 1999. Plant Products As Antimicrobial Agents, Clin. Microbiol. Rev., 12, 564-582.

DAVIS, P.H. 1972. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburg University Press, 4, 265, Edinburg, UK.

DEANS, S.G. 1991. Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (Volatile) Oils, Essential Oils and Waxes, (Eds. LINSKENS, H. F., JACKSON, J. F.), 12, 310-331.

DEANS, S.G., DORMAN, H.J.D 2000. Antimicrobial Agens from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils, J. Appl. Microbiol., 88, 308-316.

DELESPAUL, Q., BILLERBECK, B.G.; ROQUES C.G., MICHEL, G., VINUALES, C.M., BESSIERE, J.M. 2000. The antifungal Activity of Essential Oils as Determined by Screening Methods., J. essent. Oil Res., 12, 256-266.

DUKE, A.J., 1985. Handbook of Medicinal Herbs, CRC Pres, Florida, USA.



EDRIS, A.E., FARRAG, E.S. 2003. Antifungal Activity of Peppermint and Sweet Basil Essential Oils and their Major Aroma Constituents on Some Plant Pathogenic Fungi From the Vapor Phase, 47, 117-121.

ELOFF, J.N. 1998. A Sensitive Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria, *Planta Med.*, 64, 711-713.

EVANS, W. C. 1996. Trease and Evans Pharmacognosy, 14<sup>th</sup> edition, University of Nottingham, WB. Sanders Company, Nottingham, UK.

GUENTHER, E. 1972. The Essential Oils, Vol. 1, ROBERT E. 1972. Kriger Publishing Company, Florida, USA.

HADACEK, F., GREGER, H. 2000. Testing of Antifungal Natural Products: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice, *Phytochem. Anal.*, 11, 137-147.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. 1999. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 985-990.

İŞCAN, G., DEMİRCİ, F., KIRIMER, N., KÜRKÇÜOĞLU, M. , BAŞER, K.H.C. 2001. Antibacterial and Antifungal Effects of Various Plant Extracts, *Pharm. Biol.*, 37, 216-220.

LAMBERT, R.J.W. 2000. Susceptibility testing: Inoculum Size Dependency of Inhibition Using the Colworth MIC Technique, *J. Appl. Microbiol.*, 89, 275-279

JANSSEN, A.M., SCHEFFER, J.J , BAERHEIM, S.A. 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils a Literature Review (1976-1986). Aspects of the Test Methods, *Planta Med.*, 53, 395-398.

LAMBERT, R.J.W. 2000. Susceptibility testing: Inoculum Size Dependency of Inhibition Using the Colworth MIC Technique, *J. Appl. Microbiol.*, 89, 275-279.

LAWRANCE, M.B. 1995. The Isolation of Aromatic Materials from Natural Plants Products, A Manual On The Essential Oil Industry, (Ed: K.T, SILVA), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir.

MARTINI, N. , ELOFF, J.N. 1998. The Preliminary Isolation of Several Antibacterial Compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae), *J. Ethnopharm.*, 62, 255-263.

MEHRABIAN, S., MAJD, A. , MAJD, I. 2000. Antimicrobial Effects of Three plants on Some Airborne Microorganisms, *Aerobiologia*, 16, 455-458.

NAKAMURA, C.V., ISHIDA, K., FACCIN, L.C. 2004. In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. Against four *Candida* species, 579-586.

NOSTRO, A., GERMANO, M.P., D'ANGELO, V., MARINO, A. , CANNATELLI, M.A. 2000. Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of medicinal Plant Antimicrobial Activity, *Lett. appl. microbiol.*, 30, 379-384.

ÖZDAMAR, K. 2004. Paket Programları ile İstatistiksel Veri Analizleri (Çok Değişkenli Analizler). 5. Baskı, Kaan Kitabevi, 528 s.

RAHALISON, L., HAMBURGER, M., HOSTETTMANN,K., MONOD, M. , FRENK, E. 1994. Antifungal Tests in Phytochemical Investigation: Comparison of Bioautographic Methods Using Phytopatogenic and Human Pathogenic Fungi, *Planta Med.*, 60, 41-44.

SNYDER, O.P. 1997. Antimicrobial Effects of Spices and Herbs., 17-20.

SÖKMEN, A., JONES, B.M. , ERTÜRK, M. 1999. The in Vitro Antibacterial Activity of Turkish Medicinal Plants, *J. Ethnopharm.*, 67, 79-86.

STANGE, R. , S.L. MIDLAND, J.J. SİMS, T.G. MCCOLLUM 2002. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Penicillium expansum*, *Physiological and molecular Plant Pathology* 61, 303-311.

VANDEN BERGE, D.A, VLIETINCK, A.J. 1991. Screening Methods in Plant Biochemistry, (Eds: HARBORNE, J.B., DEY, P.M.) Academic Pres, London, 37-53.

<http://www.bitkisagligi.net/karanfil.htm> 2006.

<http://www.bahce.biz.com/bitki/baharat/baharatlar/tarcin.htm> 2006.

<http://www.lokman-hekim.com/limon.htm> 2006.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez konumun seçiminde bana yol gösteren ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Gerek laboratuvar çalışmalarında, gerekse tez yazımı konusunda bilgilerinden faydalandığım ve benden yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Aycan YİĞİT ve Araş. Gör. Yasemin ŞAHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için gerekli olan materyalleri sağlayan değerli hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Ozan GÜRBÜZ'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımında her türlü materyali temin eden Natura Gıda Kalite Güvence ve Arge müdürü Sayın Alican ÖZÇETİN'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Yine tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan nişanlım Cem ŞAŞMAZER'e, bugünlere gelmemde her türlü desteği sağlayan aileme teşekkür, saygı ve sevgilerimi sunarım.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1982 yılında Erzurum'da doğdu. İlköğrenimini Erzurum'da orta ve lise eğitimlerini Adapazarı'nda tamamladı. 1999 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girmeye hak kazandı. 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl yüksek lisansa başladı. Aynı zamanda Natura Gıda Tic. ve A.Ş.de Vardiya Mühendisi olarak göreve başladı. Halen aynı yerde görevine devam etmektedir.