

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇ *THYMUS* L. TÜRÜNE AİT ÖZÜT VE UÇUCU YAĞLARIN BİYOLOJİK**  
**AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ersan BEKTAŞ**

**HAZİRAN 2010**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇ *THYMUS* L. TÜRÜNE AİT ÖZÜT VE UÇUCU YAĞLARIN BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ersan BEKTAŞ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 31.05.2010  
Tezin Savunma Tarihi :22.06.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nurettin YAYLI**

**Enstitü Müdürü: Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2010**

## ÖNSÖZ

“Üç *Thymus* L. türüne ait özüt ve uçucu yağların biyolojik aktivitelerinin araştırılması adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen, çalışmalarımın başlangıcından bitimine kadar çok değerli bilgi birikimlerini, destek ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e, antioksidan aktivite testleri sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e, antiviral aktivite testleri sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Murat ERTÜRK’e, antimikrobiyal testleri sırasında yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Özlem BARIŞ’a, bitkilerin teşhisine yardımcı olan Doç. Dr. Özgür EMİNAĞAOĞLU’na, uçucu yağların GC-MS analizlerini gerçekleştiren Atina Ziraat Üniversitesi (Agricultural University of Athens) Öğretim Üyesi Dr. Dimitra Daferera’ya, arazi çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen Ünal ANLAŞ’a, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, Gönül HATİPOĞLU, Mehmet DEMİRALAY, Mustafa CÜCE, ve Onur TOSUN’a, bana emeği geçen hocalarıma ve K.T.Ü Biyoloji Bölümü Başkanlığına,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, beni her zaman destekleyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ersan BEKTAŞ

Trabzon 2010

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	IX
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>Thymus</i> L. Türleri Hakkında Genel Bilgiler.....	4
1.2.1. Taksonomideki Yeri, Botanik Özellikleri ve Etimolojisi.....	4
1.2.2. Türkiye Florasında <i>Thymus</i> L. Türleri ve Kullanım Alanları.....	5
1.2.3. <i>Thymus</i> L. Türlerinin Sekonder Metabolitleri .....	7
1.3. <i>Thymus</i> L. Türlerinden Elde Edilen Özüt ve Uçucu Yağlarının Tıbbi ve Biyolojik Aktiviteleri .....	9
1.4. Konuya Yaklaşım.....	11
1.5. Tezin Amacı.....	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	16
2.1. Bitkilerin Toplanması ve Teşhisi .....	16
2.2. Test Mikroorganizmaları .....	16
2.2.1 Bakteri Suşları .....	16
2.2.2. Mantar Suşları.....	19
2.3. Bitkilerin Kurutulması ve Özütleme İşlemleri .....	20
2.3.1. Su Distilasyonu Yöntemiyle Uçucu Yağların Hazırlanması .....	20
2.3.2. Özütlerin Hazırlanması.....	21
2.4. Antioksidan Aktivite Testleri .....	22
2.4.1. Bitki Özütlerinin ve Uçucu Yağlarının Antioksidan Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması .....	22
2.4.1.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi İçin .....	22
2.4.1.2. $\beta$ -Karoten Yöntemi İçin .....	22
2.4.2. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi.....	23
2.4.3. $\beta$ -Karoten Renk Açılımı Yöntemi – Spektrofotometrik Yöntem.....	24

2.5.	Antimikrobiyal Aktivite Analizleri.....	25
2.5.1.	Bitki Özütlelerinin Antimikrobiyal Aktivite Testleri İçin Hazırlanması.....	25
2.5.2.	Antimikrobiyal Aktivite Testleri.....	25
2.5.2.1.	Disk Difüzyon Yöntemi.....	25
2.5.2.2.	Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Saptanması.....	25
2.5.2.2.1.	Mikrowell Dilüsyon Yöntemi.....	25
2.5.2.2.2.	MİK Agar Dilüsyon Yöntemi.....	26
2.6.	GK-KS Analizi.....	26
2.6.1.	Gaz Kromatografisi (GK) ile Yapılan Analizler.....	26
2.6.2.	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrik (GK/KS) Analiz.....	26
2.7.	Antiviral Aktivite Testleri.....	27
2.7.1.	Hücrel Toksikite Test Sistemi.....	27
2.7.2.	Antiviral Aktivite Test Sistemi.....	28
2.7.2.1.	Viruslar.....	28
2.7.2.2.	Antiviral Test Sisteminde Kullanılan Hücreler.....	28
2.7.2.3.	Test Maddesinin Hazırlanması.....	28
2.7.2.4.	Sitopatik Etki Azaltma Testi.....	28
3.	BULGULAR.....	30
3.1.	Özüt ve Uçucu Yağ Verimleri.....	30
3.2.	Antioksidan Aktivite Testleri.....	30
3.2.1.	DPPH Yöntemi.....	30
3.2.2.	$\beta$ -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem.....	37
3.3.	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	40
3.4.	Uçucu Yağların Kimyasal İçerikleri.....	43
3.5.	Antiviral Aktivite Testleri.....	48
3.5.1.	Hücrel Toksikite Etki.....	48
3.5.2.	Sitopatik Etki Azaltma Testi.....	49
4.	TARTIŞMA.....	51
4.1.	Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri.....	51
4.2.	Antioksidan Aktivite.....	54
4.3.	Antimikrobiyal Aktivite.....	57
4.4.	Antiviral Aktivite.....	60

5.	SONUÇLAR.....	62
6.	ÖNERİLER.....	64
7.	KAYNAKLAR.....	66
	ÖZGEÇMİŞ	76

## ÖZET

Bu tez; ülkemizde 38 tür ile temsil edilen *Thymus* (Lamiaceae) cinsine ait *Thymus pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost, *Thymus transcaucasicus* Ronniger ve *Thymus praecox* Opiz subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas var. *grossheimii* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütleriyle uçucu yağlarının *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral aktivitelerini çalışmak üzere tasarlandı.

Uçucu yağların kimyasal içerikleri Gaz Kromatografisi (GK) ve Kütle Spektrometrisi (GK-KS) analizleri ile belirlendi. Timol tüm uçucu yağlarda; *T. pseudopulegioides* %58, *T. transcaucasicus* %55 ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* %29,4 oranlarında ana bileşenler olarak belirlendi.

Antioksidan aktviteler, 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) ve  $\beta$ -karoten renk açılım testi- spektrofotometrik yöntem adlı iki tamamlayıcı test sistemi ile belirlendi. DPPH yönteminde tüm su özütleri yüksek oranda radikal temizleyici etki gösterdi. En yüksek aktivite *T. pseudopulegioides* uçucu yağında (IC<sub>50</sub>:2,3  $\mu$ g/ml) gözlemlendi.  $\beta$ -karoten yönteminde hekzan ve kloroform özütleri yüksek aktivite gösterdi. En yüksek aktivite %79,95'lik inhibisyon değeriyle *T. pseudopulegioides*'in kloroform özütünde gözlemlendi.

Antibakteriyal, antikandidal ve antifungal disk difüzyon, mikrowell dilüsyon yöntemi ve MİK agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi ve test mikroorganizmaları olarak 9 bakteri, 1 maya ve 3 mantar suşu kullanıldı. Bu üç *Thymus* türünden elde edilen kloroform, hekzan ve su özütlerinde antimikrobiyal aktivite gözlenmedi. *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* uçucu yağlarının, *P. aeruginosa* mikroorganizması hariç diğer mikroorganizmalar üzerinde etkili antimikrobiyal aktivitesinin olduğu tespit edildi. Bu uçucu yağların etkili antibakteriyal ve antikandidal aktivitelerinin yanında çok güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

Bu *Thymus* türlerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütleri, anti-HSV ve Anti-Influenza A aktivite yönünden 'etkisiz' bulunmuşlardır.

**Anahtar Kelimeler:** *Thymus pseudopulegioides*, *Thymus transcaucasicus*, *Thymus praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan, antiviral, uçucu yağ, GC-MS, GC-FID.

## SUMMARY

### Investigation of Biological Activities of Extracts and Essential Oils Obtained from Three *Thymus* L. Species

This thesis was designed to carry out the *in vitro* antioxidant, antimicrobial and antiviral of hexane, chloroform, water extracts and essential oils of *T. pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost, *T. transcaucasicus* Ronniger and *T. praecox* Opiz subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas var. *grossheimii*, all members of genus *Thymus* L. (Lamiaceae) that is represented by 38 species, in the Turkish flora.

The chemical composition of essential oils were determined by employing Gas Chromatography (GC), Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GS-MS) analyses. Thymol was found as the main components in the oils of *T. pseudopulegioides* 58%, *T. transcaucasicus* 55% ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* 29,4%.

The oils, hexane and water and chloroform subfractions of methanol extract obtained from each plant sample were screened for their possible antioxidant activities by two complementary test systems, namely 2,2- Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and  $\beta$ -Carotene color bleaching test – spectrophotometric methods. In 2,2-DPPH, all polar extracts acted as radical scavengers on high proportions. The highest free radical scavenging activity was observed in the essential oil of *T. pseudopulegioides* (IC<sub>50</sub>: 2,3  $\mu$ g/ml). In  $\beta$ -Carotene color bleaching test – spectrophotometric method, hexane and chloroform extracts have high activity. The highest activity was observed in the chloroform extract of *T. pseudopulegioides*, with 79,95% inhibition rate.

Antibacterial, anticandidal, antifungal activities of all extracts and essential oils were determined by using disc diffusion, microwell dilution and MIC agar dilution methods, and employing 9 bacteria, 1 yeast and 3 fungi as test microorganisms. No activity was found in the hexane, chloroform and water extracts. Essential oils of *T. pseudopulegioides* and *T. transcaucasicus* showed effective antimicrobial activity against all test microorganisms except for *P. aeruginosa*. In addition to antibacterial and antifungal activities, these essential oils have very high antifungal activity.

All extracts, on the other hand, were found to be “ineffective” against HSV and Influenza A viruses.

**Key Words:** *Thymus pseudopulegioides*, *Thymus transcaucasicus*, *Thymus praecox* Opiz subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas var. *grossheimii*, antimicrobial activity, antioxidant activity, antiviral activity, essential oil, GC-MS, FC-FID



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1.	DPPH yönteminde <i>T. praecox</i> ' un kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri .....	31
Şekil 2.	DPPH yönteminde <i>T. trancaucasicus</i> ' un kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri .....	32
Şekil 3.	DPPH yönteminde <i>T. pseudopulegioides</i> ' in kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri .....	32
Şekil 4	DPPH yönteminde <i>T. praecox</i> ' un su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri .....	33
Şekil 5.	DPPH yönteminde <i>T. trancaucasicus</i> ' un su özütü derişimine karşı %inhibisyon değerleri .....	33
Şekil 6.	DPPH yönteminde <i>T. pseudopulegioides</i> ' in su özütü derişimine karşı %inhibisyon değerleri .....	34
Şekil 7.	DPPH yönteminde <i>T. trancaucasicus</i> ' un uçucu yağ derişimine karşı %inhibisyon değerleri .....	34
Şekil 8.	DPPH yönteminde <i>T. pseudopulegioides</i> ' un uçucu yağ derişimine karşı % inhibisyon değerleri.....	35
Şekil 9.	Üç <i>Thymus</i> türünün metanol özütü kloroform fazlarının radikal süpürücü etkilerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 10.	Üç <i>Thymus</i> türünün metanol özütü su fazlarının radikal süpürücü etkilerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 11.	Aktivite gösteren uçucu yağların radikal süpürücü etkilerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil .12.	<i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> ve <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen hekzan özütlerinin % BAA değerlerleri.....	38
Şekil 13.	<i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> ve <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen kloroform özütlerinin % BAA değerleri .....	38
Şekil 14.	<i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> ve <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen su özütlerinin % BAA değerleri .....	39
Şekil 15.	<i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> ve <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen uçucu yağlarının % BAA değerleri .....	40
Şekil 16.	<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri .....	47

Şekil 17. <i>T. pseudopulegioides</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri .....	47
Şekil 18. <i>T. transcaucasicus</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri .....	48

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Türkiye florasından bazı <i>Thymus</i> L. türlerinin uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler .....	8
Tablo 2. Bakteri suşları ve özellikleri .....	17
Tablo 3. Mantar suşları ve özellikleri .....	19
Tablo 4. Tam otomatik soxtherm cihazında yapılan özütleme işlemlerinde programa girilen ekstraksiyon parametreleri .....	21
Tablo 5. <i>T. praecox</i> , <i>T. transcaucasicus</i> ve <i>T. pseudopulegioides</i> türlerinden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların verimi .....	30
Tablo 6. <i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> , <i>T. praecox</i> uçucu yağlarının antibakteriyel aktiviteleri .....	42
Tablo 7. <i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> , <i>T. praecox</i> uçucu yağlarının antifungal aktiviteleri .....	43
Tablo 8. <i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri .....	44
Tablo 9. <i>T. pseudopulegioides</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri... ..	45
Tablo 10. <i>T. transcaucasicus</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri .....	46
Tablo 11. <i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> , <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütlerinin hücre üremesi üzerine etkileri .....	49
Tablo 12. <i>T. pseudopulegioides</i> , <i>T. transcaucasicus</i> , <i>T. praecox</i> bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütlerinin antiviral etkileri.....	50

## SEMBOLLER DİZİNİ

FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SCI	: Bilimsel Atıf Dizini
M.Ö.	: Milattan Önce
SOD	: Süperoksit dismutaz
GP <sub>x</sub>	: Glutasyon peroksidaz
BHA	: Butillenmiş hidroksi anizol
BHT	: Butillenmiş hidroksi toluen
PG	: Propil gallat
MHA	: Muller Hinton Agar
NB	: Nutrient Broth
SDA	: Saboraud Dextrose Agar
SDB	: Saboraud Dextrose Broth
PDA	: Potato Dextrose Agar
DPPH <sup>•</sup>	: 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil radikali
BAA	: Bağlı antioksidan aktivite
DMSO	: Dimetil sülfoksit
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
GK	: Gaz Kromatografisi
GK-KS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GK-AİD	: Gaz kromatografisi-alev iyonlaşma detektörü
FBS	: Fetal Dana Serumu
MDCK	: Madin Darby Canine Kidney
MEM	: Minimum Essential Medium
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
HSV-1	: Herpes Simplex Virüs
H1N1	: Influenza A virüsü
VERO	: Green Monkey Kidney Cells
TCID <sub>50</sub>	: Hücre Kültür Enfektivite Doz 50'si

Cpe	: Sitopatik Etki
HA	: Hemaglutinasyon Testi
CC <sub>50</sub>	: % 50 Etkin Konsantrasyon
EC <sub>50</sub>	: %50 Hücre Toksisitesi
SI	: Selektivite İndeksi
IC <sub>50</sub>	: %50 Radikal Süpürücü Etki
DD	: Disk Difüzyon
OFX	: Ofloxacin
SCF	: Sulbactam + Cefaperazona
NET	: Nitmicin
K.I	: Kovats İndeks
MIC	: Maxipine
a/h	: Ağırlık/hacim

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Yeryüzünde tüm tüketiciler yaşamlarını sürdürebilmek için ihtiyaç duydukları karbonhidrat, yağ ve proteinler gibi temel besinleri bitkilerden karşılarlar. Primer metabolitler olarak tanımlanan bu bileşikler canlılarda enerjinin açığa çıkarılması, kullanımı, nakli ve dönüşümü, sindirim, kalıtsal materyalin aktarılması ve ifadenmesi gibi yaşamsal süreçlerde işlev görürler. Bu önemli bileşiklerin dışında odun, selüloz, zambak ve lastik gibi bazı yararlı maddeler de bitkilerden elde edilir (Harborne, 1984).

Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değerler taşımalarının yanı sıra yüksek bitkiler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele alanlarında yararlanılan doğal ürünleri üretirler. Yaşamsal olarak önem taşımamakla birlikte üretildiği bitkilere bir takım uyumsal değerler ya da avantajlar sağlayan bu bileşiklere ise “sekonder metabolitler” adı verilir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bitkiler bu bağlamda tam anlamıyla canlı “organik kimya fabrikalarıdır”. Bilhassa bitkilerin ürettikleri bu çok amaçlı bileşikler insanoğlunun ilgisini çekmiş, sonuçta *fitokimya* disiplini doğmuştur (Hamburger ve Hostetmann, 1991).

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadır. Bitkilerin, düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. İnsanoğlu ise, bu özellikten faydalanarak, tarihin ilk yıllarından günümüze kadar çok sayıda bitkiyi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. Bu yaklaşım *etnofarmakoloji* adı verilen bir disiplinin oluşmasına yol açmıştır. (lit)

Arkeolojik kazılardan elde edilen kalıntı ve bulgular, bitkilerin ilaç olarak kullanımının antik çağlara kadar uzandığını göstermektedir. Bugünkü Irak sınırları içerisinde 60.000 yıl önce yaşamış olan Neanderthallerin, bugün dünyanın birçok yerinde tedavi edici olarak kullanılan gülhatmi bitkisini kullandıklarına dair kanıtlar bulunmuştur (Cowan, 1999). Anadolu’da ise bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı yüzyıllar öncesine, hatta Hitit uygarlığından da öncesine dayanır (Başer, 2000). Bu konuyla ilgili Şanidar mağarasındaki (Hakkâri) yontma taş dönemine ait mezarlarda bulunan bitki türleri bunun kanıtlarından biridir. Tarih öncesi dönemin yanı sıra Asur, Sümer ve Akad

medeniyetlerinde de bitkiler tedavi amacıyla kullanılmıştır. Adamotu, banotu, haşhaş, kekik, nane, nar kabuğu ve safran gibi 250 kadar bitkinin bu dönemde kullanıldığı bilinmektedir (Baytop, 1999).

Anadolu'da tarih boyunca bitkilerin yaygın kullanımının nedeni şüphesiz ki bu bölgenin sahip olduğu fitocoğrafik özelliklerin bir sonucudur. Çeşitli iklim tiplerinin etkisinde bulunması ve sahip olduğu coğrafik konum, Anadolu'daki flora çeşitliliğinin oluşumunda en önemli etkenlerdir (Başer, 2000). 11.000'in üzerindeki bitki türüyle zengin bir floraya sahip olan Anadolu'da yaklaşık 3000 adet endemik bitki türü bulunmaktadır (Coşkun ve Özkan, 2005). Endemik oranının Avrupa'ya kıyasla çok daha fazla olması Anadolu'nun ekolojik önemi ve flora zenginliğinin bir göstergesidir. (lit)

İnsanoğlunun çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanma biçimi etken madde'den ziyade, bitkinin kendisine ya da çeşitli yollarla elde edilen özütlerine dayanır. Böyle bir bitkisel tedavi holistik'tir. Günümüzde de, özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta tıbbi bitkilerden sağlamaktadırlar. Dünya nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı olarak kullanmaktadır (Fransworth, 1990). Diğer taraftan gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli ilaçlardır (Principe, 1989). Bitkilerden izole edilen ve tüm dünyada ilaç ham maddesi olarak kullanılan 119 bileşikten söz edilmektedir. Bitkiler, bu nedenle, ilaç endüstrinin AR-GE programlarında ciddi bir öneme sahiptir (Nair vd., 2005).

Özütlerden hazırlanan merhemlerin mikrop öldürücü ve yara iyileştirici etkisi, bitkilerin tedavi edici özellikleri bakımından akla gelen en önemli ve tarihi bir işlevleridir. Öyle ki; savaşta yaralanan Roma askerlerinin tedavisi için Latince *salveo* (iyileştirmek, kurtarmak), *Salvia* (adaçayı) cinsine verilmiştir. Aynı durum Troya savaşında yaralanan Aşil ve askerlerinin tedavisi için kullanılan *Achillea* (civanperçemi) türleri için de geçerlidir (Könemann, 1999 ve Lis-Balchin, 2006).

Yara iyileştirici ve mikrop öldürücü aktivite, büyük ölçüde, kokulu (aromatik) bitkilere dayanır. Bu özellik *aromaterapi* adı verilen tedavinin önemli bir bölümünü oluşturur. Aromaterapi çok çeşitli bedensel ve ruhsal hastalıkların tedavisi için kullanılan tarihi yöntemler bütünüdür ve bu amaçla uçucu yağ içeren bitkilerden yararlanır.

Uçucu, aromatik yada eterik yağ “oda sıcaklığında sıvı, bazen donabilen, buharlaştığında damlatıldığı kağıt üzerinde leke bırakan ve bitkilerden su buharı veya su distilasyonu ile elde edilen, kokulu karışım” olarak tanımlanabilir (Tanker, vd., 1990). İlk

kez İsveçli Paracelcius von Hohenheim tarafından “*Quintia essentia*” olarak adlandırılmıştır (Guenther, 1948). Ancak uçucu yağın elde edilmesinde kullanılan distilasyon yöntemi yaklaşık 2000 yıl öncesinde, Mısırlılar ve Persler ve Hintliler tarafından kullanılmıştır (Bauer, 2001). Avrupada distilasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ise Paracelcius’un uçucu yağ tanımıyla başlar (Guenther, 1948).

Çiçekli bitkilerin bulunduğu bazı familyalarda çok sayıda türün uçucu yağ içerdiği iyi bilinmektedir. Bu familyalar arasında ballıbabagiller olarak bilinen Lamiaceae (Labiatae) türleri; *Mentha* L. (nane), *Lavandula* L. (lavanta), *Thymus* L. (kekik) *Origanum* Tourn. ex L. (kekik, mercanköşk vb.), *Salvia* L.(adaçayı), *Sideritis* L. (dağ çayı), *Rosmarinus* L.(biberiye), *Melisa* L.(oğulotu), *Ocimum* L. (fesleğen, reyhan) gibi cinslerde sınıflandırılmıştır. Bu bitkilerin uçucu yağları ekonomik açıdan çok değerlidir (Bayramoğlu, vd., 2009). Uçucu yağlar parfüm ve kozmetik, gıda, meşrubat ve ilaç sanayinde ham madde olarak değerlendirilmektedir (Hammer, 1999; Zeybek, vd., 2002). Günümüzde uçucu yağların ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden önem taşımaktadır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri incelenerek tıp, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanılabilme olanakları güncelliğini korumaktadır (Kırbağ ve Bağcı, 2000).

Lamiaceae türlerinin ürettiği “terpen” sınıfına giren kimyasallar bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların ana bileşenidir. Ancak bu bitkilerin ürettiği ekonomik açıdan değerli bileşikler uçucu terpenlerle sınırlı değildir. Uçucu olmayan diterpenler; karnosik asit, karnozol ve türevlerinin güçlü antioksidatif aktivite gösterdiği ve bu familyadan *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinde bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir (Frankel vd, 1996). Bu bitkinin ekstreleri, gıda ürünlerinin muhafazası amacıyla kullanılır. Ayrıca, çeşitli kanser türlerini ve lösemi’yi önlediği gösterilmiştir (Ho vd., 2000).

Fenolik bileşikler adı verilen kimyasallar da bu bitkilerin ürettiği ve esasen patojen, böcek ve herbivor saldırılarına karşı savunma amaçlı üretilen ürünlerdir (Taiz ve Zeiger, 2002). Bu grupta özellikle rozmarinik asit *Lamiaceae* familyasının *Nepetoideae* alt familyası üyelerinde görülür (Litvinenko, vd., 1975). Bu kimyasalın anti-inflamatuar, antimutajenik, antimikrobiyal, antioksidan ve antiviral aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Parnham ve Kesselring, 1985; Exarchou, vd., 2002; Güllüce, vd., 2003). Rozmarinik asit’in gıda sektöründe doğal antioksidan olarak kullanılma ve gıdaların muhafazası sağlanmaktadır (Başer, 2004). Labiatik asit ve diğer fenolik asitler, flavonoidler ve



polifenoller, Lamiaceae türlerinde sıklıkla rastlanan nutrasötik ve biyoaktif kimyasallardır (Exarchou vd., 2002; Mastelic ve Jerkovic, 2003).

## 1.2. *Thymus* L. Türleri Hakkında Genel Bilgiler

### 1.2.1. Taksonomideki Yeri, Botanik Özellikleri ve Etimolojisi

*Thymus*, yaklaşık 220 cinsi barındıran *Lamiaceae* familyası içinde tür sayıları göz önüne alındığında en önemli sekiz cinsten biridir. Ancak bu sayı taksonomik bakış açısına göre değişebilir. Dünya genelinde bir kaynağa göre 300' den fazla (Könemann, 1999), diğer bir kaynağa göre ise 215 tür (Morales, 2002) *Thymus* cinsi altında sınıflandırılmıştır. *Thymus* türleri bu familyanın tipik özelliklerini yansıtır, kozmopolittirler ve tipik Akdeniz elemanlarıdır (Seçmen vd., 2000). Uçucu yağ içerikleri bakımından zengin önemli türler ihtiva etmekle beraber, tüm türlerin kayda değer uçucu yağ içerdikleri söylenemez. Her dem yeşil, otsu ve/veya çalimsı formdadırlar ve Güney Akdeniz ve Asya'nın tipik bitkileridir. Ayrıca Kuzey Afrika'da da yayılış gösterirler (Könemann, 1999).

Aromatik, çok yıllık yastık oluşturan, tabanda odunlu küçük çalimsı ya da sürünücü otsu bitkiler. Gövde tabanda otsu olup üstte dallanma gösterir, dallar sık uzun, enine kesitte dört köşeliden yuvarlağa kadar değişen şekillerde, her tarafı veya karşılıklı iki yüzeyi tüylü. Yaprak ayasının kenarları tam, revolut ya da değil, sapsız ya da kısa saplı, çoğunlukla saptan ayanın kenarlarına doğru silli. Yapraklar, brakteler ve kaliks sapsız salgılı (yağ damlacıklı), salgı renksizden koyu kırmızıya kadar değişir. Vertisillatlar floral yapraklarla desteklenen 2 - çok çiçekli, bazen sık başçık durumunda ya da uzamış ayrı vertisillatlarda. Brakteler yapraklara benzer ya da farklı. Brakteoller genellikle küçük. Kaliks belirgin bilabiata; tüp silindirikten, kampanulata kadar değişen şekillerde, 10 - 13 damarlı, boğaz kısmı sık beyaz tüylü, üst dudak 3 dişli, tüpten geniş, düz ya da yukarı doğru kıvrık, dişler dudağın 1/10 - 1/2 'ne kadar, alt dudak dar uzun 2 dişli, dişler subulat, siliat, yukarı doğru kıvrık. Korolla beyaz, ya da açık pembeden mora kadar değişen renklerde, tüp şeklinde, kaliksten daha uzun, üst dudak emarginat ±düz, alt dudak 3 loplulu. Stamenler 4, hermafrodit çiçeklerde korolladan dışarı çıkar. Anterler birbirine paralel veya divergent tekah. Nutlet küçük, tüsüz. Bitki genellikle ginodioiktir (Davis, P.H., 1982)

*Thymus* isminin etimolojisi hakkında da çeşitli rivayetler mevcuttur. Buna göre Latince *Thymus* eski Yunanda *thyo* (parfüm, koku, buhur) anlamına gelmektedir. Diğer bir etimolojik yaklaşımda ise *thymos* (cesaret, güç, zindelik) kelimesinden köken aldığı varsayılmaktadır (Morales, 2002).

### 1.2.2. Türkiye Florasında *Thymus* L. Türleri ve Kullanım Alanları

Avrupa'da yaygın olan *Thymus* Türkiye'de 20'si endemik 38 tür ve 64 takson ile temsil edilir (Davis, 1988). Avrupa ülkelerinde tıbbi amaçlı kullanılan *Thymus vulgaris* Türkiye'de doğal olarak yetişmemektedir (Çubukçu, vd., 2002).

Ülkemizde *Thymus* türleri halk arasında genelde "kekik" olarak bilinir. Osmanlı dönemi kitaplarında ise *sater-i berri* (kara zahteri) olarak bahsedilir. Bazı türler baharat ve çay olarak değerlendirilmektedir (Baytop, 1997). Kekik baharat olarak daha çok et, çorba ve soslarda kullanılır. Van çevresinde bazı türler taze olarak "otlu peynir"de kullanılır. Kısa boylu olmaları ve az uçucu yağ içermeleri nedeniyle, yabani türleri piyasada yaygın olarak bulunmaz (Akgül, 1993). Bununla beraber ülkemizde halk arasında *Origanum*, *Thymus*, *Thymbra* ve *Satureja* cinsine ait türler kekik olarak bilinir ve isimlendirilir. Baharatçılarda kekik adı altında genellikle *Origanum* (mercanköşk) türleri satılmaktadır. Kekik ülkemizin önemli bitkisel ihrac kalemi olmakla beraber, ihracatı yapılan kekiğin çok büyük bir bölümü *Origanum* L. cinsine ait türlerdir. İzmir kekiği (*Origanum onites* L.) ihracata konu olan ve en çok talep edilen kekik türüdür. (Sarı ve Oğuz, 2002 ).

Ülkemizde yetişen *Thymus* türleri aşağıda liste halinde verilmiştir. Bunlardan endemik olanlar (\*) ile belirtilmiştir (Yıldız vd., 2004).

- \*1. *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. (Güney batı, Güney Anadolu, Adalar)
- \*2. *T. revolutus* Celak (Doğu Akdeniz)
- \*3. *T. pulvinatus* Celak (Marmara Bölgesi)
- 4. *T. cherlerioides* Vis. (Batı ve Güney Anadolu)
- 5. *T. parnassicus* Halacsy. (Doğu Anadolu)
- 6. *T. leucotrichus* Hal. (İç ve Güney Anadolu)
- \*7. *T. convolutus* Klokov. (Doğu Anadolu)
- \*8. *T. argaeus* Boiss. & Bal. (İç Anadolu)
- \*9. *T. brachyphilus* Jalas (Güney ve İç Anadolu)
- \*10. *T. cappadocicus* Boiss. (İç ve Doğu Anadolu)

- \*11. *T. haussknechtii* Velen. (Doğu Anadolu)
- \*12. *T. pectinatus* Fisch. & Mey. (İç Anadolu)
- \*13. *T. canoviridis* Jalas (Doğu Anadolu)
- \*14. *T. spathulifolius* Haussk. & Velen. (Doğu Anadolu)
- 15. *T. eigii* (M. Zohary & P.H. Davis) ( Güney Anadolu)
- 16. *T. syriacus* Boiss. (Gaziantep)
- \*17. *T. cariensis* Hub. – Mor. & Jalas (Güney Batı Anadolu)
- 18. *T. atticus* Celak. (Kuzey Batı Anadolu)
- 19. *T. striatus* Vahl. (Marmara Bölgesi)
- \*20. *T. samius* Ronniger & Rech. (Adalar)
- 21. *T. zygioides* Griseb. (Batı, İç ve Güney Batı Anadolu, Adalar)
- \*22. *T. aznavourii* Velen. (Marmara Bölgesi)
- 23. *T. roegneri* C. Koch. (Kuzey Batı Anadolu)
- 24. *T. comptus* Friv. (Marmara Bölgesi)
- 25. *T. fallax* Fisch. & Mey. (İç ve Doğu Anadolu)
- 26. *T. transcaucasicus* Ronniger (Kuzey Doğu Anadolu)
- 27. *T. kotschyanus* Boiss. & Hohen. (Güney ve Doğu Anadolu)
- 28. *T. eriocalix* (Ronniger) Jalas (Güney Batı Anadolu)
- \*29. *T. fedtschenkoi* Ronniger (Doğu Anadolu)
- 30. *T. ararati-minoris* Klokov & Shost (Doğu Anadolu)
- 31. *T. migricus* Klokov & Des. – Shost. (Doğu Anadolu)
- \*32. *T. sipyleus* Boiss. (Batı, Güney, İç, Güney Batı ve Kuzey Doğu Anadolu)
- \*33. *T. leucostomus* Hausskn. & Velen. (İç ve Kuzey Anadolu)
- 34. *T. pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak. (Doğu Anadolu)
- \*35. *T. bornmuelleri* Velen. (Kuzey Batı Anadolu)
- 36. *T. praecox* Opiz (Batı, İç, Kuzey, Kuzey Doğu ve Güney Doğu Anadolu)
- 37. *T. longicaulis* C. Presl (Kuzey, İç, Marmara, Kuzey Doğu, Kuzey Batı, Batı ve Güney Batı Anadolu)
- 38. *T. pseudopulegioides* Klokov & Des.- Shost. (Kuzey Doğu Anadolu)

### 1.2.3. *Thymus* L. Türlerinin Sekonder Metabolitleri

Familiyanın çoğu mensubunda olduğu gibi, *Thymus* türleri de iki farklı sınıfta değerlendirilen sekonder ürünler üretirler. Bunlar uçucu (esansiyel) yağlar ve fenolik bileşiklerdir (polifenoller, özellikle flavonoidler). Hem uçucu yağlar hem de flavonoidler bu bitkilerde gözlenen çeşitli farmakolojik aktivitelerin esas sorumlusudurlar (Simeon de Bouchberg, vd., 1976, Van den Broucke, 1983).

Parfümeri ve kozmetik sektörlerinde büyük talep gören uçucu yağlar bitkinin salgı tüylerinde depolanır. Çok sayıda *Thymus* türünün uçucu yağ profilleri çalışılmış ve dolayısı ile çok sayıda makale literatürde yer almıştır. 2002 yılı sonuna kadar uçucu yağlarının profilleri ortaya çıkarılmış 270 *Thymus* türünden bahsedilmektedir (Stahl-Biskup, 2002). Bu derlemeye göre, *Thymus* türlerinin elde edilen uçucu yağlarda saptanan terpenoid uçucu bileşikler büyük ölçüde monoterpenlerdir. Seskiterpenler de uçucu yağlarda genellikle mevcut olmakla beraber, miktarları %10'u geçmemektedir. Timol ve karvakrol hem değeri hem de miktarı bakımından en çarpıcı fenolik terpenlerdir (Stahl-Biskup, 2002). Bazı Lamiaceae türlerinin (*Origanum* L., *Satureja* L. türleri) uçucu yağlarında da timol ve karvakrol bulunmasına rağmen *Thymus* türlerinin bu bileşikler bakımından kaynak bitki olduğu söylenebilir. Yine uçucu yağlarda iki monoterpen hidrokarbon; para simen (*p*-simen) ve gama-terpinen ( $\gamma$ -terpinen) timol ve karvakrolden ayrı düşünülmemektedir. Zira  $\gamma$ -terpinen aromatik monoterpenlerin başlangıç materyalidir ve sonrasında anahtar ara ürün *p*-simen oluşur. Timol ise bu yolda son üründür. Özetle bu dört monoterpenin biyogenetik yollarda birbirleriyle ilişkili olduğu ve *Thymus* uçucu yağlarının ana bileşenleri olduğu söylenebilir (Kokkini vd., 1997). Ancak bu genellemeye uymayan uçucu yağlar da görülebilir (Tablo 1). Türkiye florasında yabani olarak yetişen bazı *Thymus* türlerinin uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Türkiye Florasındaki Bazı *Thymus* L. Türlerinin Uçucu Yağlarında Bulunan Ana Bileşenler

Kaynak Bitki	Uçucu Yağın Ana Bileşenleri	Kaynak
<i>T. argaeus</i> Boiss. ve Bal.	Linalool %26.6, Linalil asetat %19.5, Borneol %15.0, Geraniol, Nerol	Sezik ve Basaran, 1986
<i>T. aznavourii</i> Velen.	Germakren D 22.8%, (E)- $\beta$ -Farnesen 16.1%, $\alpha$ -Pinen 11.1%, $\beta$ -Karyofillen, Limonen	Tümen vd., 1998
<i>T. canoviridis</i> Jalas	Karvakrol %29.5, Geraniol %13.3, Timol, $\beta$ -Karyopfillen, Geranil asetat	Baser vd., 1998
<i>T. fallax</i> Fisch. ve Mey.	Karvakrol %68.1, Timol, <i>p</i> -Simen, $\beta$ -Karyofillen, $\gamma$ -Terpinen	Tümen vd., 1999
<i>T. eigii</i> M. Zohary ve P.H. Davis	Timol %30.6, Karvakrol %26.1 ve <i>p</i> -Simen %13.0	Tepe vd., 2004
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>sipyleus</i>	Borneol %11.2, $\alpha$ -Muurolol %9.2, $\beta$ -Karyofillen %7.6, Geranial %7.3 ve Neral %5.4.	Tepe vd., 2005
<i>Thymus sipyleus</i> subsp. <i>sipyleus</i> var. <i>rosulans</i>	Karvakrol %58.1, Timol %20.5, <i>p</i> -Simen %4.1 ve $\gamma$ -Terpinen %4.4.	Tepe vd., 2005
<i>Thymus pectinatus</i> Fisch. ve Mey. var. <i>pectinatus</i>	Timol %49.8, $\gamma$ -Terpinen %16.1, <i>p</i> -Simen %14.8, Karvakrol %3.7	Vardar-Ünlü vd., 2003
<i>Thymus spathulifolius</i>	Timol %36.5, Karvakrol %29.8, <i>p</i> -Simen %10.0 ve <i>c</i> -Terpinen %6.3	Sökmen vd., 2004
<i>T. praecox</i> Opiz subsp. <i>grossheimii</i> (Ronn.) Jalas var. <i>grossheimii</i> <sup>1</sup>	Timol %26.6, <i>p</i> -Simen %24.9, $\alpha$ -Pinen, $\alpha$ -Terpinil asetat, $\beta$ -Karyofillen	Baser vd., 1996
<i>Thymus praecox</i> subsp. <i>caucasicus</i> var. <i>caucasicus</i>	Timol %47.45, $\gamma$ -Terpinen %8.7, <i>p</i> -Simen %8.30, Terpinil asetat %4.88 ve Karvakrol %4.60	Sekeroğlu vd., 2007
<i>T. pseudopulegioides</i> Klokov et Des.-Shost. <sup>1</sup>	Timol %50.1, Karvakrol %10.7, <i>p</i> -Simen %10.7, $\gamma$ -Terpinen, Karvakrol ve Linalool %21.6, $\alpha$ -Terpinil asetat %16.7, Geraniol %11.2,	Baser vd., 1999
<i>T. transcaucasicus</i> Ronn. <sup>1</sup>	Timol %36.6, <i>p</i> -Simen %15.7, Karvakrol, $\gamma$ -Terpinen, Borneol	Kasumov ve Gavrenkova, 1985

<sup>1</sup> Bu çalışmada uçucu yağ içerikleri araştırılan *Thymus* türleri ile ilgili daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen verilerdir.

Doğal fenolik bileşiklerin iki ana grubunu oluşturan flavonoidler ve polifenollere *Thymus* türlerinde de rastlanır. Yukarıda da bahsi geçtiği gibi, bu bileşikler *Thymus* özütlerinde görülen biyolojik-farmakolojik aktivitelerden sorumludur. Ancak flavonoidlerin bir başka işlevi kemotaksonomik işaretler olmalarıdır. Nitekim bazı *Thymus*

türleri yapılarında luteolin ve 6-hidroksi luteolin bulundurmalarına göre ayırt edilmişler ve adlandırılmışlardır (Harborne ve Williams, 1971). *Thymus* türlerinde aglikon yani şeker grubu içermeyen çok sayıda flavonoid tanımlanmıştır, başlıca fenolik asitleri içeren polifenoller ise nispeten azdır. Aglikon flavonoidler arasında en fazla bulunanlar luteonin, apigenin ve skutellarein'dir. Kamferol ve kuersetin ise bu türlerde tespit edilen flavonollerdir. *Thymus* L. türlerinden 9 farklı fenolik asit rapor edilmiştir. Bunlar içerisinde en yaygın bulunanlar kafeik asit ve rozmarinik asittir (Vila, 2002).

Bu çalışmada değerlendirilen üç *Thymus* türünden birisi olan *T. praecox* Opiz bitkisi ile yapılan çalışmalarda fenolik bileşikler olarak apigenin ve 6-hidroksi luteonin (Adzet ve Martinez, 1981), sirsilineol ve türevleri, luteolin, timozin ve timolin (Hernandez vd., 1987) ürettiği rapor edilmiştir. Diğer tür *T. transcaussicus* Ronniger'in fenolikleri ise apigenin, luteolin ve skutallarein'di (Simonyan ve Litvinenko, 1971). Literatür çalışması doğrultusunda, bu çalışmada değerlendirilen diğer tür, *T. pseudopulegioides* hakkında herhangi bilgiye ulaşılmamıştır.

### **1.3. *Thymus* L. Türlerinden Elde Edilen Özüt ve Uçucu Yağlarının Tıbbi ve Biyolojik Aktiviteleri**

*Thymus* türlerinin tıbbi ve biyolojik olarak kullanımları dünya çapında bilinen ve eski tarihlere kadar uzanan bir olgudur. Son zamanlardaki gelişmeler, yani *in vitro* farmakoloji aktivite deneyleri ve birkaç klinik test, bu bitkileri "geleneksel" halk ilacı olmaktan çıkarmış, rasyonel bir ilaca dönüştürmüştür (Zarzuelo ve Crespo, 2002). Ancak bu bağlamda bu bitkilerden elde edilen etken madde(ler)den ziyade, karışımları "tamamlayıcı tıp" olarak değerlendirilmekte ve bu durum ülkeden ülkeye değişmektedir. Örneğin, Almanya'da bu tür şifalı bitkilerin statüsünü belirlemek amacıyla Sağlık Bakanlığı 1998 yılında bir komisyon toplamış ve sonuç olarak yayınladıkları monografıta, *Thymus vulgaris* dahil, 300 bitkinin nerede ve nasıl kullanılacaklarına dair bilgiler verilmiştir. Monograf Alman Federal Gazetesinde yayınlanmıştır (Zarzuelo ve Crespo, 2002). Bunu Amerikan Gıda ve İlaç dairesi (Food and Drugs Administration, FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) izlemiştir.

*Thymus* türlerinin en önemli, belirgin ve tarihi biyolojik aktivitesi, içerdiği uçucu yağlarından gelmektedir. Uçucu yağların en çok çalışılan özellikleri ise antibakterial etkileridir. Bir *Thymus* türü (tür adı verilmemiştir) "buharının" antraks basili (*Bacillus*

*anthracis*) üzerindeki “öldürücü” etkisi bundan yaklaşık 139 yıl önce ilk kez Chamberlain tarafından (1887) gözlenmiştir. Dolayısı ile tüm aromatik bitkilerin mikrop öldürücü (antimikrobiyal) etkilerinin çıkış yeri de *Thymus* bitkileridir. Literatürde bu bitkilerin uçucu yağlarının antibakteriyal etkileri üzerine çok sayıda makale mevcuttur. Sadece son 30 yılda *Thymus* bitkilerinin antibakterial/antimikrobiyal etkileri üzerine 300’e yakın literatüre ulaşılabilir. Ancak bu etki daha çok Gram-pozitif bakteriler üzerinedir (Zarzuelo ve Crespo, 2002). Yine genel bir yaklaşım olarak uçucu yağlarda bulunan bileşiğin türüne, enantiyomerik özelliklerine göre aktivitelerde farklılıklar görülmektedir (Marino vd., 1999; Lis-balchin, vd., 1999). Buna göre çoktan aza doğru aktivite sıralaması timol >karvakrol> $\alpha$ -terpineol>terpinen-4-ol şeklindedir (Dorman ve Deans, 2000). Uçucu yağın bu bileşenleri de mevsimsel, iklimsel ve bölgesel değişikliklere göre değişkenlik gösterdiğinden, bitkinin hasat zamanı da önem kazanmaktadır. Bitkilerden, hasat zamanı ya da çiçeklenme döneminden hemen sonra elde edilen uçucu yağların, genellikle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Moldao-martins vd., 1999).

Uçucu yağların özellikle gıdalarda bozunma ve zehirlenmelere yol açan bakterilere karşı antibakterial aktivite göstermesi, besinlerin uzun süre saklanması, raf ömrünün uzatılması bakımından büyük önem taşır. Bu bağlamda *Thymus vulgaris* L. uçucu yağının *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi gıdalarda taşınan bakterilere karşı aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Smithpalmer, vd., 1998).

Fungal hastalıklara karşı özellikle uçucu yağların taramalarının yapıldığı araştırmalarda da öncelikle *Thymus* türlerinden yararlanılmıştır (Roussel vd., 1973). Ayrıca, *T. vulgaris* uçucu yağıyla başlatılan bu süreçte özellikle gıdalarda bozunmaya yol açan mayalara ve *Aspergillus* türlerine, çeşitli dermatofitlere (Janssen, vd., 1988) ve *Fusarium solani* gibi bitki patojenlerine karşı (Zambonelli vd., 1996) diğer *Thymus* uçucu yağlarının etkileri araştırıldı ve pozitif sonuçlar elde edildi. Antifungal aktivitede de timol ve karvakrol’ün esas etken bileşikler olduğu gösterilmiştir (Agarwal ve Mathela, 1979).

*Thymus* türleri uçucu yağlarının antiviral aktivite gösterdiğine dair bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak bu özütlerin antiviral aktivite gösterebileceğine dair bazı bulgular mevcuttur. *Thymus serpyllum* L. özütünün Newcastle hastalığı virusuna karşı aktivite göstermesi bu hususta ilk bulgudur. Aktivitenin, taninlerin ve bu bileşiklerin öncüllerinin bulunduğu polifenol fraksiyonunda olduğu rapor edildi (Herman ve Kucera, 1967).

İnsan vücudunun metabolik faaliyetler sonucu sürekli serbest radikaller, yani “zararlı” oksijen türleri, ürettiği ve bu ürünlerin bir dizi antioksidan savunma mekanizması ile bertaraf edildiği gerçeği 1970’lerde ortaya çıkarılmıştır. Kansere, dolaşım bozuklukları, yaşlanma gibi olumsuz etkileri olan serbest radikallerin oluşumunu önleyecek veya ortadan kaldıracak doğal veya sentetik ürünler arayışına gidilmiştir (Zaruelo ve Crespo, 2002). Bu konudaki ilk literatür bilgilerinde “fenolik” içeriği olan bitkisel özütlerin güçlü radikal süpürücü etki gösterdiği rapor edilmiştir (Alscher ve Hess, 1993). *Thymus vulgaris* özütünün de güçlü radikal “süpürücü” olduğu diğer bir çalışmada gösterilmiştir (Chung, vd., 1997). Günümüzde aromatik bitkilerin uçucu yağları ve özütlerinin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çok sayıda araştırmanın gerçekleştirildiği söylenebilir. Sadece *Thymus* türleri değerlendirildiğinde SCI, SCI-EXPANDED dergilerde yayımlanmış makale sayısı 200’ü geçmektedir (Al-Fatimi vd., 2010; Viuda-Marcos vd., 2010; Amarowicz vd., 2009; Tepe vd., 2004a; Tepe vd., 2004b; Sökmen vd., 2004). Bu makalelere her geçen gün yenileri eklenmektedir.

Aromatik bitkilerin böcek öldürücü (insektisidal), caydırıcı (deterant) ve uzaklaştırıcı etkileri de rapor edilmiştir. Bu hususta en meşhur bitkiler de yine Lamiaceae familyası üyeleridir (Regnaultroger ve Hamraoui, 1997). Örneğin, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvalarına karşı 22 aromatik bitkiden elde edilen uçucu yağlar denemiş ve en etkin larvisidal etki *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis* ve *Thymus satureoides*’den elde edilmiştir (Pavela, 2009).

#### 1.4. Konuya Yaklaşım

Günümüz dünyasında sağlıklı yaşam sürdürebilmek için olabildiğince doğal ürünlerin kullanılması adeta bir slogan haline gelmiştir. Günlük yaşamda karşılaşılan “organik”, “doğal” tanımları insanoğlunun tabii kaynaklara dönüşünü simgeler. Zira yaklaşık 60 yıl öncesinden başlayan “sentetik” ürünlerin potansiyel zararlı etkileri son yıllarda giderek artan tartışma konularının başında gelmektedir.

Bitkilerden farklı amaçlarla yararlanma biçimi insanoğlunun tarihi kadar eskidir. Mikrop öldürücü ve dezenfektan olarak kullanılan, ancak insanoğlunun, mikroorganizmaların keşfine kadar, farkına varamadıkları birçok bitki türünden bahsedilebilir. Daha önce de belirtildiği gibi bazı bitkilerin Latince ikili adlandırmalarında ya cins ya da tür isimleri tedavi edici özelliklerinden, mitolojik geçmişlerinden dolayı



verilmiştir (Könemann, 1999; Liz-Balchin, 2006). Yeryüzünde 250.000 ila 750.000 bitki türünün olduğu genel kabul görmektedir (Borris, 1996). Ancak bu bitkilerin sadece %1-10'u insan ve hayvanlar için besin kaynağıdır (Moerman, 1996). Çok daha fazlasından ise tıbbi (tedavi edici) olarak yararlanılır. Hatta M.Ö. 5. yüzyılda yaşamış Hipokrat 400'e yakın tıbbi bitkiden bahsetmiştir (Cowan, 1999).

Binlerce yıl mikrop öldürücü, dezenfektan veya yara iyileştirici olarak kullanılan ve çeşitli bitkilerden elde edilen özüt ve uçucu yağlar 2. Dünya Savaşı yıllarından sonra önemlerini yitirmişlerdir. Zira bu yıllarda tanıtılan fungal antibiyotikler, sonrasında yarı-sentetik ve sentetik ürünlerin mikroorganizmalara karşı çok daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak son 10 yıllık süreçte bakterilerde meydana gelen antibiyotik direnci büyük bir sorun oluşturmuştur. Özellikle piyasaya sürülen her üç antibiyotikten ikisinin bu nedenle ömrü kısa olmaktadır. Dolayısı ile mikrobiyologların bitkisel özüt ve uçucu yağları bu hususta tercih etmelerinin ilk sebebi mikroorganizmaların doğal ürünlere direnç geliştirememesidir. Şimdiden çok sayıda bitkisel ürün klinik testlerden geçmiştir. Bitkisel kökenli doğal antibiyotiklere (özüt ve uçucu yağlar, karışımlara) yönelik tercihin ikinci nedeni ise günümüzde kullanılmakta olan antibiyotiklerin, özellikle sentetik olanların, aşırı ve yanlış kullanımları sonucu ortaya çıkan yan etkileridir. Sonuçta, bitkisel kökenli tedavi artık tamamlayıcı tıbbın bir parçası haline gelmiş olup, patentli ürünler halinde eczanelerde satışa sunulmaktadır (Cowan, 1999).

Besin zehirlenmelerine yol açan ve gıdalarda taşınan patojenik mikroorganizmaların sebebiyet verdiği hastalıklar da tüm dünyanın başlıca sorunlarından biridir (Mead, vd., 1999). Ayrıca mikroorganizmalardan kaynaklı besin bozulmaları ve besin ürünlerinin bu nedenle raf ömürlerinin kısalması gıda sanayinin önemli bir sorunudur. Bugüne kadar *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter jejuni*, *Candida spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.*, ve *Penicillium spp.* gibi patojenik mikroorganizmaların besin kaynaklı hastalıklara ve besin bozulmalarına yol açtığı rapor edilmiştir (Betts, Linton, ve Betteridge, 1999; Deak ve Beuchat, 1996). Bu nedenle mikroorganizmaların besinlerde büyümesini engellemek üzere özellikle kimyasal koruyucular kullanılır. Son yıllarda tüketicilerin sentetik kimyasallar üzerindeki olumsuz düşünceleri, üretici firmaları "doğal" koruyuculara yöneltmiştir (Alzoreky ve Nakahara, 2003; Hsieh, Mau ve Huang, 2001). Sonuç olarak bitkisel kökenli uçucu yağların gerek antibiyotik ve gerekse besinlerde bakteri ve funguslara karşı doğal koruyucu olarak kullanılması bazında çok sayıda

araştırma literatürde yerini almıştır (Sökmen vd., 2004; Tepe vd., 2004a; Tepe vd., 2004b; Alzoreky & Nakahara, 2003).

Antiviral ve antifungal ajanların yanı sıra, virüslere karşı da güvenli ve etkili bitkisel kaynaklar da önemini artırmıştır. Dünya genelinde artan Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (AIDS) hastalığının önüne geçilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1990'lı yılların başından itibaren dünya genelinde çok sayıda bitkisel özütün kullanıldığı bir "tarama-screening" süreci başlatmıştır (Cowan, 1999). Antiviral aktivite ile ilgili çok sayıda literatür bilgisine ulaşılabilir (Örn. Arouma vd., 1996; Lin vd., 2002; Serkedjieva ve Hay, 1988; Sökmen vd., 2005).

Bitkisel özüt ve uçucu yağların antioksidan aktiviteleri de çok önemlidir. Zira hücrel metabolik faaliyetler sürekli zararlı serbest radikaller üretir ve bu radikalleri bertaraf edecek hücrel mekanizmalar mevcuttur. Ancak bu savunma mekanizmasının da bir kapasitesi vardır. Kapasite aşıldığında oksidatif stres açığa çıkar. Nihayetinde serbest radikaller reaktif oksijen türevleridir ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein ve karbonhidratların oksidasyonuna yol açacak hücrel yaşlanma, kanser, inflamasyon, romatoid artrit'e yol açmakta ve hatta hücre ölümü gerçekleşmektedir (Mantle ve ark., 1998; Eryılmaz, 2001). Dolayısı ile dış kaynaklı antioksidanlarla bu savunma mekanizmasını güçlendirme gereği duyulur. Antioksidanlar etkilerini dört yolla gösterirler. Bunlar;

a. Süpürücü/temizleyici (Scavenging) etki gösterenler: Yeni radikal oluşumunu engellerler ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz ( $GP_x$ ) gibi enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinleri verilebilir,

b. Giderici (Quencher) etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, vitaminler (Vit A-beta karoten, Vit C-askorbat, Vit E-alfa tokoferol), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.

c. Zincir kırıcı (Chain breking) etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.

d. Tamir edici (Repair) etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksid redüktaz sayılabilir.

Antioksidanlar maddeler serbest radikallerin neden olduğu bu zararlı etkilere karşı oksidasyonun çeşitli aşamalarında, yukarıda özetlenen mekanizmalar yoluyla koruyucu özellik gösterirler.

Antioksidanların sağlık açısından değer ve önemlerinin yanı sıra yukarıda değinilen besinlerde koruyuculuk özelliği de gıda sektörü için çok önemlidir. Yukarıda belirtildiği gibi, gıdalarda bulunan mikroorganizmaların besinlerde bozulmaya yol açmalarının en önemli nedeni oksidatif aktiviteleridir. Bunun önüne geçmek için günümüzde besin sektöründe, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanlar kullanılır. Ancak bu maddelerin kararsız doğaları, uçucu özellikleri ve parçalanmaları sonucu oluşan bozunma ürünlerinin mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri olduğuna dair bilgiler rapor edilmiştir (Koleva ve ark., 2002). Örneğin bu kimyasalların akciğerde hasara, karaciğerde nekroz ve kanamaya bağlı ölümlere neden olduğü bildirilmiştir (Candan ve Sökmen, 2004). Bu kısıtlayıcı nedenlerden dolayı sentetik antioksidan ajanların yerini alabilecek doğal antioksidan maddeler ile ilgili araştırmalarda bitkiler çok önem kazanmıştır. Sonuçta bitkisel özüt ve uçucu yağların antioksidan etkileri hakkında araştırmalar büyük ivme kazanış ve *Thymus* türlerinin uçucu yağ ve özütleri dahil konu ile ilgili çok sayıda makale literatürde yerini almıştır (Al-Fatimi vd., 2010; Babovi vd., 2010; Viuda-Martos vd., 2010; Sökmen vd., 2004; Tepe vd., 2004a; Tepe vd., 2004b; Eryılmaz, 2001; Harput vd., 2006).

Bitkisel kökenli antioksidanlar genellikle fenolikler sınıfında toplanır ve bu kimyasalların antioksidan etkileri redoks özelliklerine dayanır. Bu yüzden indirgeyici ajanlar, hidrojen vericiler, tekli oksijen önleyiciler ve metal kelasyonu yapıcılar olarak etki ederler. Bitki fenolikleri, fenolik asitler, fenil propanoitler, monoterpenik fenoller, flavonoitler, tanenler, vs. gibi maddelerdir (Başer, 2004).

### 1.5. Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı *Lamiaceae* familyasına mensup *Thymus pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost., *Thymus transcaucasicus* Ronniger. ve *Thymus praecox* Opiz subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas var. *grossheimii* bitkilerinden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral aktivitelerinin araştırılmasıdır. Doğada yetişen bu bitkilerin özelliklerinin ve nasıl değerlendirilebileceğinin bilinmesi insanoğlu için çok önemlidir. Bu özellikleri ve diğer etkilerinden dolayı bu bitkilerin kullanım amaçları ve kullanım şekillerine olan ilgi artmıştır. İlginin artması, buna bağlı olarak da araştırmaların artmasına, çalışma kapsamında yer alan bitkilerde dahil olmak üzere bitkilerin hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmasına neden olmuştur.

Araştırma kapsamında çalışılan bitkilerden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütleriyle uçucu yağlarının antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral etkilerine ilişkin herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Bu nedenle adı geçen bitkilerle ilgili veri ve sonuçlar orijinal değer taşımaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen veri ve sonuçların ileride yapılacak olan çalışmalara temel oluşturacağı kanaatindeyiz.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkilerin Toplanması ve Teşhisi

Araştırmamızda Doğu Karadeniz bölgesinde doğal olarak yetişen *Thymus* L. cinsine ait *Thymus praecox* Opiz subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas var. *grossheimii*, *Thymus transcaucasicus* Ronniger ve *Thymus pseudopulegioides* Klokov&Des-Shost. bitkilerinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Tez kapsamında çalışılacak olan bitkilerin lokaliteleri ve toplanma zamanları sırasıyla; A8 Rize: Anzer, 1200m, Haziran 2009, 40° 33' 04.4" E, 40° 39' 29.8" N; A8 Bayburt: Soğanlı Dağı, 1500m, Temmuz 2009, 40° 14' 0.09" E, 40° 32' 50.8" N; A8 Bayburt: Soğanlı Dağı, 1700m, Temmuz 2009, 40° 14' 42.16" E, 40° 33' 11.36" N. olarak belirlendi. Toplanan bitkilerin teşhisi Artvin Çoruh Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özgür EMİNAĞAOĞLU ve Arş. Gör. Mehmet DEMİRALAY tarafından "Flora of Turkey and the Aegean Islands (Davis, P. H., 1965-1988)." adlı eserden yararlanılarak yapılmıştır.

### 2.2. Test Mikroorganizmaları

Çalışma kapsamındaki antimikrobiyal aktivite deneylerinde 9 adet bakteri ve 4 adet fungus olmak üzere toplam 13 adet mikroorganizma kullanılmıştır (Tablo 2 ve 3).

#### 2.2.1. Bakteri Suşları

Aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

Tablo 2. Bakteri Suşları ve Özellikleri

Bakterinin Adı	Suş Numarası	Morfolojik Görünüm	Gram Özelliği	Deney Besiyeri
<i>Acinetobacter baumannii</i>	A8	Kokobasil	(-)	MHA <sup>a</sup> NB <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	A57	Basil	(-)	MHA NB
<i>Enterobacter cloacae</i>	A296	Kok	(-)	MHA NB
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC-29122	Kok	(+)	MHA NB
<i>Escherichia coli</i>	A1	Basil	(-)	MHA NB
<i>Proteus vulgaris</i>	KUKEM1329	Basil	(-)	MHA NB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	Basil	(-)	MHA NB
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC-29213	Kok	(+)	MHA NB
<i>Streptococcus pyogenes</i>	KUKEM-676	Kok	(+)	MHA NB

<sup>a</sup> Mueller Hinton Agar

<sup>b</sup> Nutrient Broth

*Escherichia coli*; Belirli koşullar altında insan ve hayvanlar için patojen olup, gerek yangı, gerekse sürgün şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına etken olur.

Aslında memelilerin ve kuşların bağırsak florası konusudur. Normal insan bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge altında kaldığı sürece hastalık yapmaz. Bağırsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardır. Özellikle idrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve menenjlere ulaşan *E. coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açar (Bilgehan, 2000).

*Staphylococcus aureus*; İnsan ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda enfeksiyonlara neden olurlar. Deride apseler, fronkül (sivilce), sikozis (sakal-kıl kökleri yangısı), kan çıbanı, hidroadenit (ter bezi yangısı), arpacık, deri döküntüleri gibi hastalıklar meydana getirirler. Pasta, süt, krema, et ve benzeri karbonhidrat ve proteinli besin maddeleri içerisinde üreyerek yaptıkları enterotoksinlerin ağız yolu ile alınması sonucunda da besin zehirlenmeleri ve enteritlere yol açarlar (Bilgehan, 2000).

*Acinetobacter baumani*: Doğada ve hastane ortamında *Pseudomonas aureginosa*'dan sonra ikinci sıklıkla izole edilen nonfermentatif bir bakteridir ve hem nemli hem kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilir, besin maddeleri ve sağlıklı insan derisinde bulunabilir. Ayrıca sindirim sisteminde koloni oluşturabilir. Sağlıklı kişilerde non-patojen olmasına rağmen immün sistemi zayıflamış kişilerde enfeksiyon etkeni olabilmektedir (Bilgehan, 2000).

*Bacillus subtilis*: Oksijenli solunum yapan ya da geçici oksijenli solunum yapan, 20-30 °C'de çoğalabilen bir bakteridir. Su, toprak, toz gibi temel alanlara yerletiklerinden besin maddelerine kolaylıkla bulaşabilirler. Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar (Bilgehan, 2000).

*Enterobacter cloacae*: Gram negative, fakültatif anaerob bir bakteridir. Üreme ve solunum sistemlerinde enfeksiyona neden olur. Ellerin yıkanmaması durumunda kişilere kolaylıkla bulaşabilir (Bilgehan, 2000).

*Enterococcus faecalis*: Gram pozitif kok bakterilerdendir. Zayıf hijyen, iyi işlenmemiş gıda, çapraz bulaşma başlıca enfeksiyon nedenleridir. İshal, karın krampları, bulantı, kusma, ateş, üşüme ve baş dönmesine neden olur (Bilgehan, 2000).

*Proteus vulgaris*: Bağırsak florasında bulunur. İdrar yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, abdominal enfeksiyonlar ve yara enfeksiyonları yaparlar. Ayrıca taş oluşumundan da sorumlu tutulurlar (Bilgehan, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa*: Çoğu toprak ve suda bulunur. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan fakat fermentasyon yapmayan bakterilerdir. Bağışıklık yetersizliği olan hastalarda solunum ve idrar yollarının, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojenidir. Aynı zamanda kanda da enfeksiyon yapabilir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların çoğuna bu bakteri neden olmaktadır (Bilgehan, 2000).

*Streptococcus pyogenes*: Gram pozitif, kok bakterilerdendir. Oksijenli solunum yapar, hareketsizdir, spor üretmez. Normalde insan florasında boğaz ve burunda bulunur.

Sayısı arttığında farenjite neden olur. Deri enfeksiyonlarına da neden olur (Bilgehan, 2000).

### 2.2.2. Mantar Suşları

Antifungal aktivite deneylerinde kullanılan mantarlar Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Tablo 3. Mantar Suşları ve Özellikleri

Mantarın Adı	Suş Numarası	Morfolojisi	Deney Besiyeri
<i>Candida albicans</i>	A117	Maya	SDA <sup>a</sup> SDB <sup>b</sup>
<i>Aspergillus sp.</i>	-	Küf	PDA <sup>c</sup>
<i>Fusarium sp.</i>	-	Küf	PDA
<i>Rhizopus sp.</i>	-	Küf	PDA

<sup>a</sup> Sabouraud Dextrose Agar

<sup>b</sup> Sabouraud Dextrose Broth

<sup>c</sup> Potato Dextrose Agar

*Candida albicans*; Fırsatçı ve patojen bir mayadır. 2-3 x 4-6 µm boyutlarında oval şeklindedir. Tomurcuklanarak ürerler. *Candida* lar insan ve hayvan mukozalarında kommensal olarak bulunur. Kandidiyasis denen bir enfeksiyona yol açar. Enfeksiyon genital organlarda, bunun yanında, ağız mukozası ve dilde, vücudun nemli olan bölgelerinde, deri katmanlarının olduğu bölgelerde görülür. *C. albicans* enfeksiyonun olduğu bölgeden kan ve lenf yoluyla yayılarak, ulaştığı başka bölgeleri de etkisi altına alabilir. *C. albicans* enfeksiyonu, genellikle direnci zayıflamış, özellikle hücrel bağışıklık sistemi tahrip olmuş hastalarda görülür. Tedavi amacıyla nistatin ve imidazol kullanılır (Bilgehan, 2000).

*Aspergillus sp.*; Dünya üzerinde geniş bir yayılış gösteren küflerdir. Oksijen bakımından zengin ortamlarda kolaylıkla çoğalabilirler. Genellikle monosakkarid, polisakkarid gibi karbon bakımından zengin substratlar üzerinde çoğalırlar. Besin zinciri



yoluyla insalara bulaşabilir ve enfeksiyona yol açabilir. İnsanlarda dış kulak enfeksiyonları, deri lezyonları ve ülsere yol açar. Hem toksik hem kanserojen olan aflatoksin üretirler (Bilgehan, 2000).

*Fusarium sp.*; Filamentli mantarların geniş bir cinsidir. Toprakta geniş bir yayılım gösterirler ve bitkilerle ilişki içindedirler. Tahıllarda kontaminasyona yol açarlar ve mikotoksinleri üretirler ve besin zinciri yoluyla hayvan ve insalara ulaşarak enfeksiyonlara yol açarlar. En önemli toksinleri fumonisinler ve trichothecenelerdir. Bağışıklık sistemi kuvvetli olan insanların tırnak ve kornealarında enfeksiyona neden olurlar. Bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda ise nötropeniye neden olabilir ve bütün vücuda yayılarak kan dolaşımını olumsuz yönde etkiler (Bilgehan, 2000).

*Rhizopus sp.*; Olgun meyve ve sebzelerde parazit olarak bulunurlar. İnsanlarda ciddi hastalıklara neden olurlar. Çok hızlı çoğalırlar ve yüksek sıcaklıklarda yaşayabilirler. Bazıları bitkilerde patojen olarak bulunurlar (Bilgehan, 2000).

### **2.3. Bitkilerin Kurutulması ve Özütleme İşlemleri**

Araziden toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları gölge ve iyi havalandırılan ortamda kurutuldu. Kurutulan bitkilerin çiçek ve yaprakları ayrıldı ve karışım halinde öğütücüyle ( ARÇELİK Auto Valso) toz haline getirildi. Toz halindeki bitkisel materyaller aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan uçucu yağ çıkarma ve özütleme işlemlerine tabi tutuldu.

Çalışma kapsamında tüm deneysel çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **2.3.1. Su Distilasyonu Yöntemiyle Uçucu Yağların Hazırlanması**

Clevenger aparatında (British Type-İldan/ANKARA) 4 saat su distilasyonu sonucunda bitkilerin uçucu yağları elde edildi (Moldao-Martins vd., 1999). Uçucu yağlara susuz sodyum sülfat eklendi, filtre edildi ve aktivite çalışmaları yapılmaya kadar buzdolabında, karanlıkta ve + 4 °C'de saklandı.

### 2.3.2.Özütlerin Hazırlanması

Kurutulan ve toz haline getirilen bitkisel materyallerin özütleri, tam otomatik Soxtherm Manager cihazında (Gerhardt Soxtherm Manager SX PC) bitkisel materyalin iki farklı çözücüyle (hekzan ve metanol) muamelesiyle elde edildi. Toz materyalden 5'er gr tartılarak ekstraksiyon kartuşlarına yerleştirildi. Hazırlanan kartuşlar içinde çözücü olarak 100 ml hekzan bulunan ekstraksiyon beherlerine yerleştirildi. Hekzan ile özütleme (ekstraksiyon) için en uygun değerler bilgisayar yardımıyla programdan seçilerek özütleme işlemi başlatıldı. Hekzan ile özütleme yaparken programa girilen değerler Tablo 4'te verilmiştir.

Hekzan ile muamele edilen materyal daha sonra metanol ile özütleme için kullanıldı. 140 ml metanol konulan ve boş ağırlığı ölçülen ekstraksiyon beherlerine bu örnekler yerleştirildi. Uygun değerler programdan seçilerek metanol ile özütleme işlemi başlatıldı. Özütleme işlemi bittikten sonra ekstraksiyon beherinde kalan metanol uçurulup elde edilen özüt miktarı hesaplandı. Metanol ile özütleme işlemi için programa girilen uygun değerler Tablo 4'te verilmiştir.

Metanol ekstarksiyonuyla elde edilen özütler daha sonra 1:1 oranında kloroform ve su ile muamele edildi ve suda çözünen kısım ve kloroformda çözünen kısım olmak üzere iki farklı faz elde edildi. Kloroform ve su fazı ayırma hunisiyle boş ağırlıkları ölçülen beherlere alınarak birbirinden ayrıldı. Su fazı  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu ve daha sonra liyofilizatörde (CHRIST ALPHA 1-2 LD plus - ALMANYA) suyu uzaklaştırıldı. Kloroform fazı ise oda sıcaklığında bırakılarak kloroformu tamamen uçuruldu. Son olarak beherlerin ağırlıkları ölçülerek su ve kloroform fazlarının özüt verimleri hesaplandı.

Tablo 4. Tam otomatik soxtherm cihazında yapılan özütleme işlemlerinde programa girilen ekstraksiyon parametreleri

PARAMETRELER	HEKZAN	METANOL
T- Sınıflandırma	200 °C	200 °C
Eksraksiyon Sıcaklığı	120 °C	140 °C
Azaltma Aralığı	1 dk. 30 s.	1 dk. 30 s.
Azaltma Şiddeti	3 s	4 s.
Sıcak Ekstraksiyon	0 sa. 30 dk.	2 sa. 30 dk.
Evaporasyon A	9xinterval	8xinterval
Ekstraksiyon Zamanı	0 sa. 40 dk.	2 sa. 30 dk.
Evaporasyon B	3xinterval	5xinterval
Evaporasyon C	10 dk.	10 dk.
Program Uzunluğu	1 sa. 43 dk.	5 sa. 25 dk.

#### 2.4. Antioksidan Aktivite Testleri

Bitki özütleri gibi pek çok kompleks içeriğin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu çeşitli yöntemlerden sadece bir tanesini uygulayarak özütün veya kompleks karışımın olası antioksidan aktivitesini belirlemek mümkün değildir. Çünkü sadece bir yöntem antioksidan aktivite gösteren bir maddenin tüm olası etki mekanizmalarını belirlemek için yeterli değildir. Bu doğrultuda bitkilerden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların antioksidan aktiviteleri iki komplementer yöntem olan DPPH (2,2-Difenilpikrilhidrazil) ve  $\beta$ -Karoten Renk Açılımı Yöntemi – Spektrofotometrik Yöntem ile belirlendi.

#### 2.4.1. Bitki Özütlerinin ve Uçucu Yağlarının Antioksidan Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması

##### 2.4.1.1. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi İçin

Elde edilen metanol, su ve hekzan özütlerinden içeriği 30 $\mu$ g/ml olacak şekilde stoklar hazırlandı. Uçucu yağlar ise ya doğrudan ya da aktivitesine bağlı olarak çözücü ile

seyreltilerek kullanıldı. DPPH testi için hazırlanan stoklarda çözücü olarak metanol kullanıldı.

#### 2.4.1.2. $\beta$ -Karoten Yöntemi İçin

Elde edilen metanol, su ve hekzan özütlerinden ve uçucu yağlardan içeriği  $2\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde stoklar hazırlandı. B-karoten yöntemi için hazırlanan stoklarda çözücü olarak etanol kullanıldı.

#### 2.4.2. 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

Hazırlanan tüm özütlerin antioksidan aktiviteleri literatürde tanımlanan yöntem izlenerek yapılmıştır (Cuendet vd., 1997; Kirby ve Schmidt, 1997, Burits ve Bucar, 2000; Burits, ve ark. 2001).

Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahipse metanolik DPPH çözeltisinin rengini o kadar çok açması beklenir. Bu yöntemde test edilecek olan özütlerin, çeşitli derişimlerde hazırlanan  $50\ \mu\text{L}$ 'lik metanol içinde hazırlanan çözeltisi  $\%0.004$ 'lük (a/h) DPPH çözeltisinin  $5\ \text{mL}$ 'si ile karıştırılır. 30 dakikalık karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin absorbansı  $517\ \text{nm}$ 'de ölçüldü. Özütlerin absorbans değeri boş kontrole ( $50\ \mu\text{L}$  metanol) karşı değerlendirildi. Her bir özütün ve boş kontrol testlerinin absorbans değerleri kullanılarak özüt  $\%$  inhibisyon değerleri aşağıda verildiği şekliyle hesaplandı (Bucar ve Burits, 2000).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri özüt derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek her bir özütün %50 renk açılımını sağlayan derişimleri %50 inhibisyon ( $IC_{50}$ ) değeri olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit kullanıldı. Aktivite belirlenen özütlerin içeriklerine uygun saf maddelerle aynı testler tekrarlanarak aktiviteden sorumlu bileşenler belirlenmeye çalışıldı.

### 2.4.3. $\beta$ -Karoten Renk Açılımı Yöntemi – Spektrofotometrik Yöntem

Görsel olarak değerlendirilen özütler daha anlamlı olması yönünden spektrofotometrik olarak da çalışıldı. Bütün özütler ve pozitif kontrol BHT çözeltileri 2 g/L olacak şekilde etanolde çözümlenerek test örnekleri hazırlandı. Spektrofotometride kullanılacak olan  $\beta$ -karoten-linoleik asit karışımı şu şekilde hazırlandı: 0,5 mg  $\beta$ -karoten 1mL kloroformda çözüldü. 25  $\mu$ L linoleik asit, 200 mg Tween 80 ile emülsiyon haline getirilerek  $\beta$ -karoten çözeltilisine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra evaporatörde 50 °C’de kuvvetli vakum uygulanarak kloroformu uçuruldu. Karışım üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak olan önceden 30 dakika boyunca oksijenle doyurulmuş (akış hızı 100 mL dak<sup>-1</sup>) distile sudan 100 mL eklendi ve 1 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sonunda berrak, sarı renkli  $\beta$ -karoten-linoleik asit test karışımı elde edildi. Bu karışımdan 250  $\mu$ L’lik kısımlar, çoklu otomatik okuyucu tabaklarına (mikrotiter plate) alındı. Her bir özüt ve kontrol için üç tekrarlı seriler hazırlandı. 35  $\mu$ L’lik test çözeltileri, ilgili serilere ilave edildi. Aynı miktar etanol kontrol serisine uygulandı. Daha sonra, çoklu tabaklar ağızları kapatılarak oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi ve belli zaman aralıklarında hazırlanan serilerin absorbansı Mikrotiter okuyucuda (Bio-Kinetics EL312) 490 nm’de ölçüldü. Yine BHT’nin ve özütlerin absorbans değeri (üç tekrarın ortalaması) karşılaştırılarak bağlı antioksidan aktivite (BAA) değerleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı.

$$BAA = \frac{\text{Özütün Absorbansı}}{\text{BHT' nin Absorbansı}}$$

## **2.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizleri**

### **2.5.1. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Testleri İçin Hazırlanması**

Çeşitli yöntemlerle hazırlanıp buzdolabında bekletilen özütler dimetilsülfoksit (DMSO) içinde 30µg/ml olacak şekilde seyreltilerek, uçucu yağlar ise doğrudan kullanıldı.

### **2.5.2. Antimikrobiyal Aktivite Testleri**

#### **2.5.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi**

Petri plaklarındaki standart besiyerlerine (nutrient agar, sabouraud dextrose agar ve potato dextrose agar) test mikroorganizmaları ekildi ve sonra her birinde 300 µg özüt içeren (10 µl özüt+DMSO çözeltisi) 6 mm çapındaki standart diskler agar üzerine yerleştirildi. Bakteriler ve maya 24 saat, mantarlar 72 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bu işlemin ardından petri plaklarında gözlemlenen inhibisyon zon çapları (mm) kaydedildi (Şahin vd., 2004).

#### **2.5.2.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Saptanması**

##### **2.5.2.2.1. Mikrowell Dilüsyon Yöntemi**

Disk difüzyon yöntemi ile özütlere hassasiyeti belirlenen mikroorganizmalara (bakteriler ve maya) uygulandı. 12 saat sıvı kültürlerde yetiştirilen mikroorganizmalar 0,5 McFarland standart türbiditeye ayarlandı. Özütler %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde konsantrasyonu 500 µg/ml olacak şekilde ayarlandı. 96 kuyucuk (well) içeren pleytlerin her bir kuyucuğuna 95 µl sıvı besiyeri ve türbiditesi ayarlanmış mikroorganizmalardan 5µl eklendi. Daha sonra ilk kuyucuğa konsantrasyonu 500 µg/ml olacak şekilde ayarlanan özütler ve/veya uçucu yağlardan 100 µl eklendi ve pipetleme işlemiyle karıştırıldı. Daha sonra ilk kuyucuktan ikinci kuyucuğa 100 µl, 2'den 3'e ve bu işlem 7. Kuyucuğa kadar 100'er µl alınarak devam ettirildi. Böylece ilk kuyucuktan itibaren 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5µg/ml, 31,25g/ml, 15,625 µg/ml ve son olarak altıncı kuyucukta 7,8125 µg/ml olacak şekilde dilüsyon kullanılmış oldu. 7. kuyucuğa 195 µl sıvı

besiyeri ve türbiditesi ayarlanmış mikroorganizmalardan 5 µl eklendi. Pleytin sütunundaki 8. ve son kuyucuk ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Pleyt 300 rpm'de 20 saniye kadar karıştırıldıktan sonra 24 saat uygun sıcaklıkta inkübe edildi (Güllüce vd., 2003).

#### **2.5.2.2.2. MİK Agar Dilüsyon Yöntemi**

Antimikrobiyal çalışmada kullanılan mantarların MİK değerlerinin saptanması için agar dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Özütler % 0,5 Tween 20 içeren steril potato dextrose agara aseptik koşullarda, konsantrasyonu 7,8-500 µg/ml olacak şekilde eklendi. Uçucu yağ veya özüt eklenen besiyerleri hemen vortekslendi. Bu işlemlerden sonra katılaştıran petri plaklarına 5µl ( $10^4$  spor/ml) mantar ilave edilerek 37 °C'de 72 saat inkübe edildi. Daha sonra gelişmenin olmadığı en düşük konsantrasyon kaydedildi (Şahin vd., 2004).

### **2.6. GK-KS Analizi**

Bu çalışma için izlenen GK, GK-MS veya GK-AİD analizleri için izlenen yöntemler;

#### **2.6.1. Gaz Kromatografisi (GK) ile Yapılan Analizler.**

Bir AİD detektör ve bir HP-5MS kapiller kolon ile donanımlı (30 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm) Hewlett Packard 5890 II GK kullanıldı. Enjektör ve detektör sıcaklıkları sırasıyla 20 °C ve 290 °C'ye ayarlandı. Kolon sıcaklığı kademeli olarak 50 °C den 240 °C'ye 3 °C/dk'lık bir hızla artırıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Helyumun akış oranı mL/dk'ya ayarlandı. Aseton ile 1/100 oranında seyreltilen örneklerden 1.0 µL enjekte edildi.

#### **2.6.2. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrik (GK/KS) Analiz.**

Uçucu yağların GK-KS analizi, 70 eV'de EI modunda çalışan bir Hewlett Packard 5972 MSD ile donanımlı Hewlett Packard 5890 II GK cihazında yapıldı. Kolon olarak non-polar Rtx-5MS kapiller kolon kullanıldı (boyutlar; 30 m x 0.25 mm, film kalınlığı; 0.25 µm). Kolon sıcaklığı dakikada 3 °C artan bir otomatik programı ile 60 °C'den 250 °C'ye çıkarıldı. Enjektör ve MS transfer hattı sıcaklıkları sırasıyla 220 °C ve 290 °C'ye ayarlandı.

Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı ve gaz basıncı 2.5 psi'ye ayarlandı. Asetonda 1/100 oranında seyreltilen örnekler (v/v) 1.0 µL hacminde ve splitless modunda enjekte edildi. Örneklerin deneysel olarak adlandırılmaları için göreceli alıkonma endeskleri ve kütle spektrumları ile GK/KS sisteminde bulunan NIST 98, Wiley 275 kütüphane verileri ve ayrıca daha önce yayınlanmış literatür verileri karşılaştırıldı. Örneklerin göreceli yüzde oranları elektronik olarak alan yüzde verilerinden hesaplandı. Kovats Endekslerin hesaplanması için her örneğe n-oktan ve n-eikozan eklendi (Adams, 2007).

## **2.7. Antiviral Aktivite Testleri**

### **2.7.1. Hücresel Toksikite Test Sistemi**

Antiviral test sistemlerinde kullanılan hücreler üzerine test maddelerinin toksik etkisi Vero ve MDCK hücreleri kullanılarak değerlendirildi. Bu maksatla 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarına % 10 Fetal Dana Serum (FBS), penisilin/streptomisin içeren Minimum Essential Medium (MEM) besi yerinde (MEM %10 FBS) hazırlanan hücreler  $5 \times 10^3$ /kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra MEM %10 FBS içerisinde 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ve 1.56 µg/ml yoğunluklarda ikişer kat sulandırılarak hazırlanan test maddelerinin her bir yoğunluğundan üçer kuyucuğa (0.1 ml/kuyucuk) ilave edildi. Hücreler son yoğunlukları 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 ve 0.78 µg/ml olan test maddesi varlığında 72 saat süre ile 37<sup>0</sup> C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda üremeye bırakıldı. Test maddesi içermeyen kontrol kuyucuklarını da içeren kültür kapları inkübasyon süre sonunda hücre üreme yoğunluğunu belirlemek için kristal viole ile boyandı. Bu maksatla önce kuyucuk içeriği atıldı ve hücreler 2 kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra hücreler % 1 glutaraldehit ile sabitlendi. PBS ile tekrar yıkandıktan sonra kuyucuklara % 0.02 lik kristal viole boyasından 0.1 ml eklendi. Kültür kapları 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra çeşme suyu ile 3 kez yıkanarak kurumaya bırakıldı. Hücreler tarafından tutulan boya daha sonra % 70 alkol ile çözündürülüp renk yoğunluğu Versamax Microplate Reader (Molecular Devices, USA) cihazında 570 nm dalga boyunda ölçüldü. % 50 sitotoksite oluşturan test madde konsantrasyonu (cell cytotoxicity50, CC<sub>50</sub>) GraphPad yazılım programı kullanılarak doğrusal olmayan doz-yanıt eğrisi (non-linear dose-response curve) ile hesaplandı.



## **2.7.2. Antiviral Aktivite Test Sistemi**

### **2.7.2.1. Viruslar**

Bu çalışmada Herpes Simplex Virus Tip (HSV-1) wal suşu ve Influenza A (H1N1) virusu (Domuz Gribi Pandemisi sırasında izole edilen saha suşu olan A/Trabzon/01/2009: Gen Bankası Accession No: GU991379) kullanılmıştır. HSV-1 Vero (Green Monkey Kidney Cells) Influenza A ise MDCK (Madin Darby Canine Kidney) hücre kültüründe yüksek titrelerde çoğaltılarak -80 C de stok olarak saklanmıştır.

### **2.7.2.2. Antiviral Test Sisteminde Kullanılan Hücreler**

Vero ve MDCK hücreleri, Vircell Laboratories, Inc. İspanya'dan temin edilmiştir. Kültürler, 36-37<sup>0</sup> C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli bir ortamda pasajlanarak master stok olarak saklanmıştır; T75 hücre kültür kaplarında % 10 Fetal Dana Serum (FBS), penisilin/streptomisin içeren Minimum Essential Medium (MEM) besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Antiviral etkinlik testleri için hücreler 96 kuyucuklu pleytlere ekilerek kullanılmıştır.

### **2.7.2.3. Test Maddesinin Hazırlanması**

Test maddelerinin antiviral aktivitelerinin HSV-1 için test ortamı % 2 FBS içeren MEM, Influenza A için ise 0.1 % albumin, 1 µg/ml TPCK-tripsin ve penisilin, streptomisin ve fungizon antibiyotiklerini içeren MEM kullanarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 ve 0.78 µg/ml yoğunluklarda 2 kat sulandırılarak test edilmişlerdir.

### **2.7.2.4. Sitopatik Etki Azaltma Testi**

Özet olarak, 24 saat önceden Vero veya MDCK hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Kuyucuklarda % 80-90 oranında hücre üremesi gerçekleşen hücreler 'hücre kültür enfektivite doz 50'si (tissue culture infectivity dose 50; TCID<sub>50</sub>) HSV-1 için

$1 \times 10^8$ , Influenza A' için  $8 \times 10^7$ /ml olan stok süspansiyonlardan hazırlanan  $100 \text{ TCID}_{50}$  miktarında virus ile  $37^\circ \text{C}$  de 1 saat enfekte edildi. İnkübasyon sonunda 2 iki kat yoğunlukta (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ve 1.56  $\mu\text{g/ml}$ ) hazırlanan test maddelerinden her bir yoğunluk için 3 kuyucuk olacak şekilde virus ile enfekte edilen hücreler üzerine eklendi. Test maddesi ve virus içermeyen hücreler ile enfekte fakat test maddesi içermeyen hücreler sırası ile 'hücre kontrol ve 'virus kontrol' kuyucuklar olarak kullanıldı. Kültür kapları anti-HSV-1 testi için 72 saat, anti-Influenza A testi için 48 saat süre ile  $37^\circ \text{C}$ , % 5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda HSV-1 için invert mikroskop altında viral sitopatik etki (cpe), Influenza A üremesi ise kuyucuklardan alınan örneklerle yapılan Hemaglutinasyon testi (HA) ile değerlendirildi. CPE inhibisyon verileri % 50 etkin (viral CPE-inhibisyon ) konsantrasyon ( $\text{EC}_{50}$ ), % 50 hücre toksisitesi (cell cytotoxicity) konsantrasyon ( $\text{CC}_{50}$ ) doz-yanıt eğrisinde GraphPad yazılım programı, selektivite indeksi (SI) ise  $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$  sonucu olarak verildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Özüt ve Uçucu Yağ Verimleri

Materyal ve Metod kısmında ayrıntılı olarak verilen yöntemleri ile *T. praecox subsp. grossheimii var. grossheimii*, *T. transcaucasicus* ve *T. pseudopulegioides*'den çeşitli özütler ve uçucu yağlar edildi. Tüm özüt ve uçucu yağlara ait verimler Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. *T. praecox*, *T. transcaucasicus* ve *T. pseudopulegioides* Türlerinden Elde Edilen Özütlerin ve Uçucu Yağların Verimi

	Metanol özütleri		Hekzan özütleri (%)	Uçucu yağ (%)
	Kloroform fazı (%)	Su fazı (%)		
<i>T. praecox subsp. grossheimii var. grossheimii</i>	4,66 ± 0,55	11,85 ± 1,0	2,86 ± 0,17	0,49 ± 0,04
<i>T. transcaucasicus</i>	4,29 ± 0,41	10,03 ± 0,87	3,12 ± 0,21	0,8 ± 0,06
<i>T. pseudopulegioides</i>	2,43 ± 0,17	11,63 ± 1,06	2,4 ± 0,17	0,98 ± 0,09

Özüt ve uçucu yağların biyolojik aktiviteleri, ayrı başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

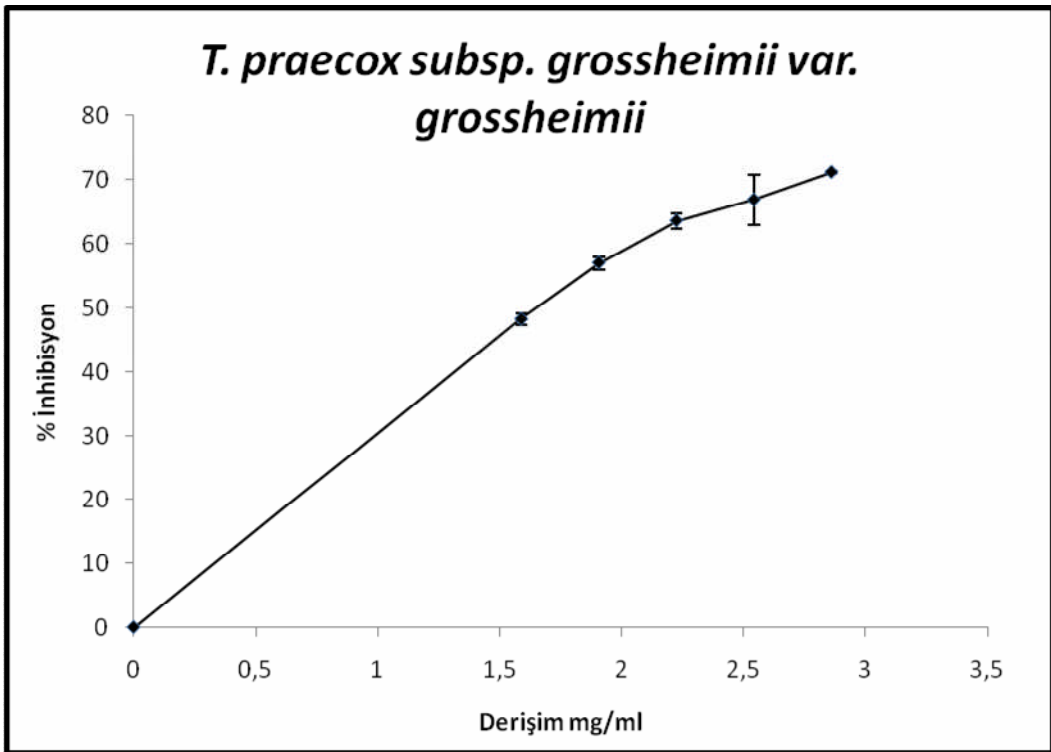
#### 3.2. Antioksidan Aktivite Testleri

##### 3.2.1. DPPH Yöntemi

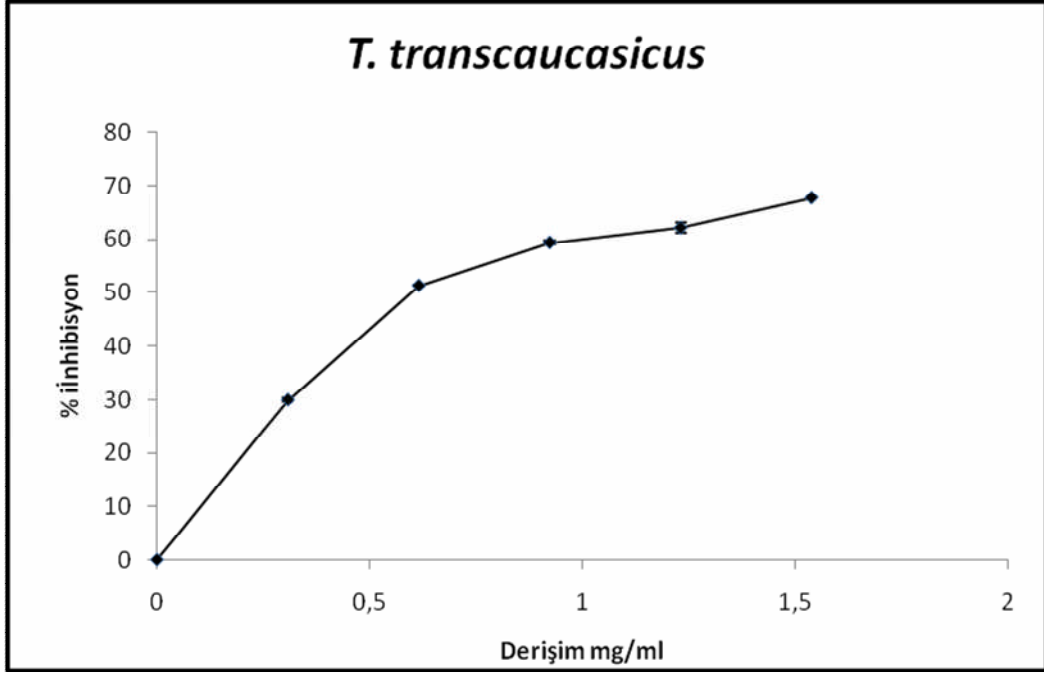
Yapılan çalışmalar bölümünde ayrıntılarıyla anlatılan yöntem izlenerek (Bölüm 2); kararlı DPPH radikalinin *T. praecox*, *T. transcaucasicus* ve *T. pseudopulegioides* bitkilerinden elde edilen hekzan, ve metanol özütlerinin iki alt fraksiyonu (buradan itibaren

kloroform ve su özütü olarak bahsedilecektir) hazırlanan ve uçucu yağlarının varlığındaki davranışı incelendi. Stokları hazırlanan örneklerin ardışık seyreltme yoluyla elde edilen farklı derişimlerinin %0,004'lük DPPH çözeltisinde renk açma kapasiteleri % inhibisyon olarak belirlendi.

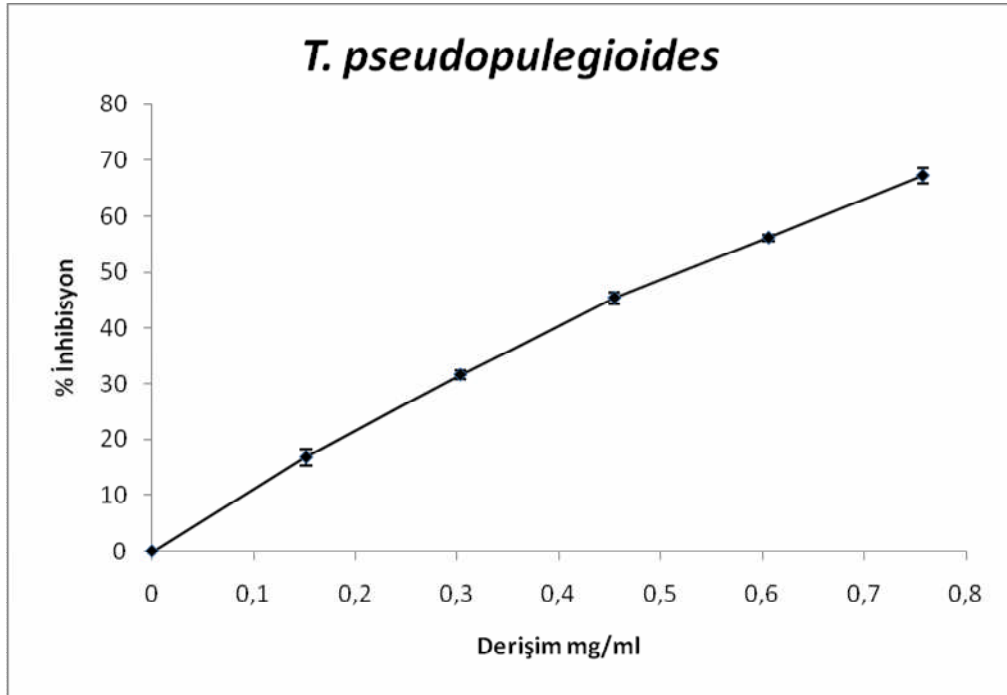
Çalışılan bitkilerin hekzan özütlerinde ve *Thymus praecox subsp. grossheimii var. grossheimii* bitkisinin uçucu yağında aktivite gözlenmedi. Her üç bitkinin bu yöntemde aktivite gösteren kloroform özütlerinin derişimlerine karşı % inhibisyon değerleri Şekil 1, 2 ve 3' de verilmiştir.



Şekil 1. DPPH Yönteminde *T. praecox*' un Kloroform Özütü Derişimine Karşı % İnhibisyon Değerleri

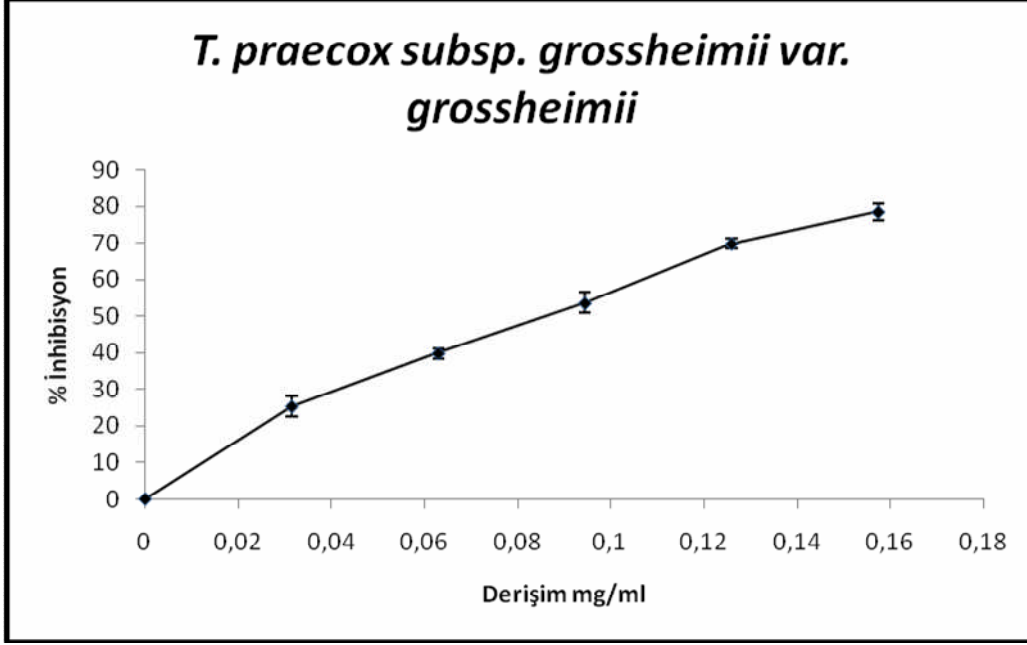


Şekil 2. DPPH Yönteminde *T. transcaucasicus*'un Kloroform Özütü Derişimine Karşı % İnhibisyon Değerleri

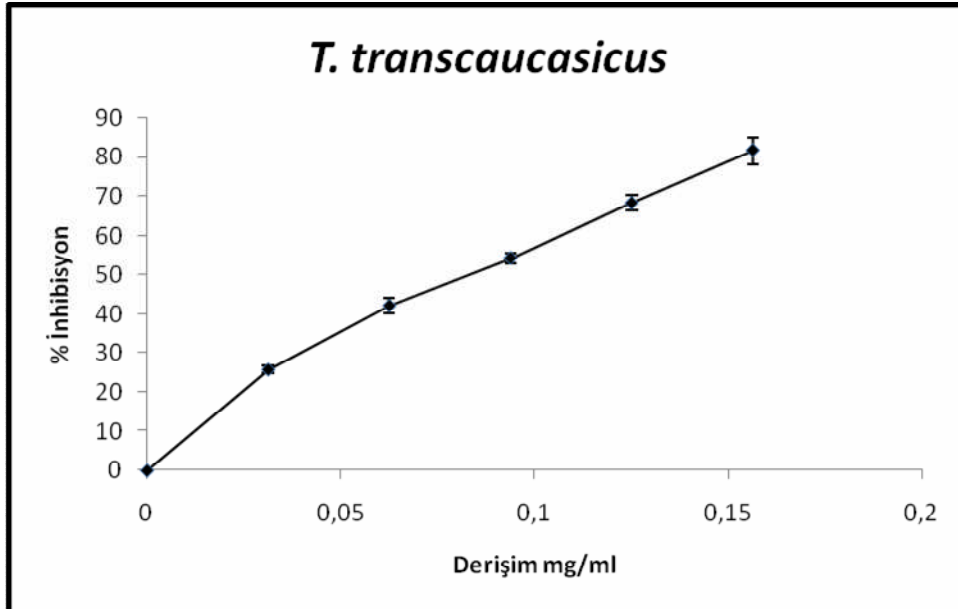


Şekil 3. DPPH Yönteminde *T. pseudopulegioides*'in Kloroform Özütü Derişimine Karşı % İnhibisyon Değerleri

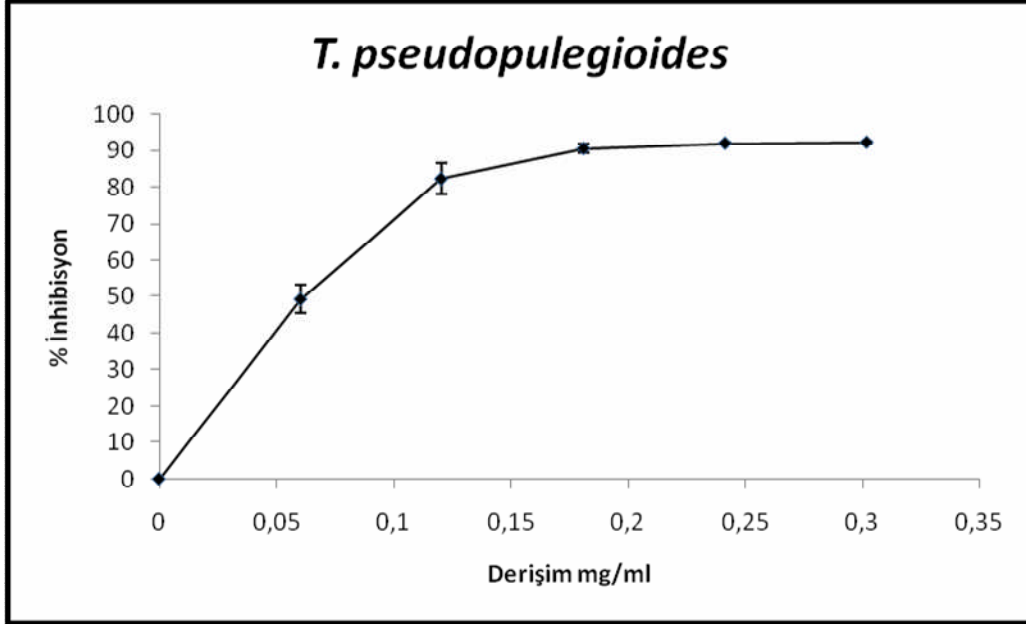
Her üç bitkiden elde edilen su fazı özütleri de aktivite göstermiş ve her bir özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri Şekil 4,5 ve 6' da verilmiştir.



Şekil 4. DPPH Yönteminde *T. praecox*'un Su Özütü Derişimine Karşı %İnhibisyon Değerleri

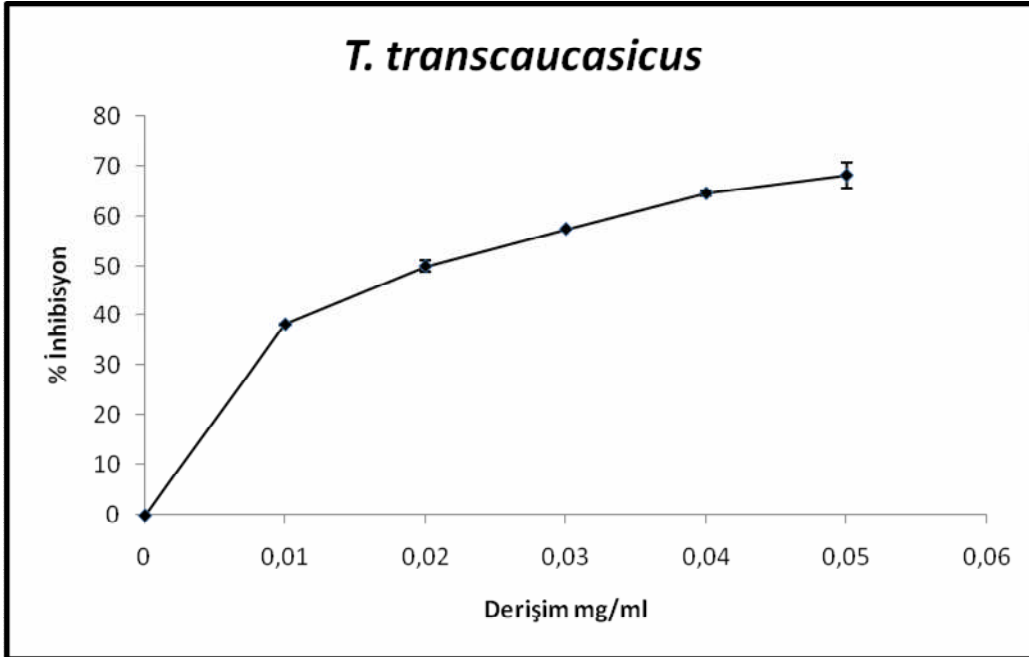


Şekil 5. DPPH Yönteminde *T. trancaucasicus*'un Su Özütü Derişimine Karşı %İnhibisyon Değerleri

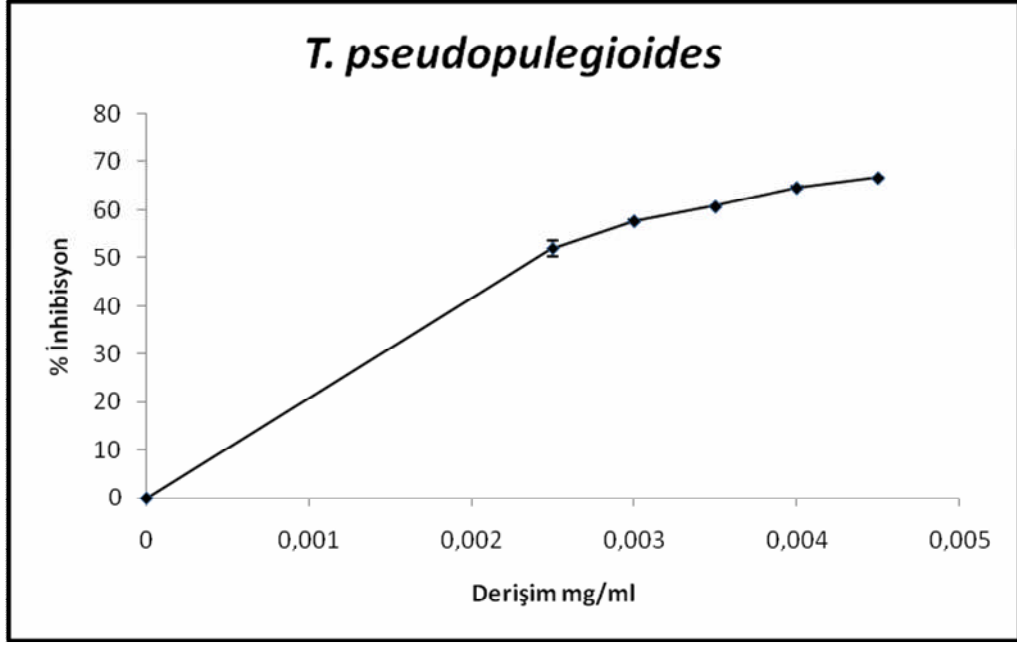


Şekil 6. DPPH Yönteminde *T. pseudopulegioides*'in Su Özütü Derişimine Karşı %İnhibisyon Değerleri

Bu yöntemde aktivite gösteren iki uçucu yağın her birinin derişimine karşı % inhibisyon değerleri Şekil 7 ve 8' de verilmiştir.



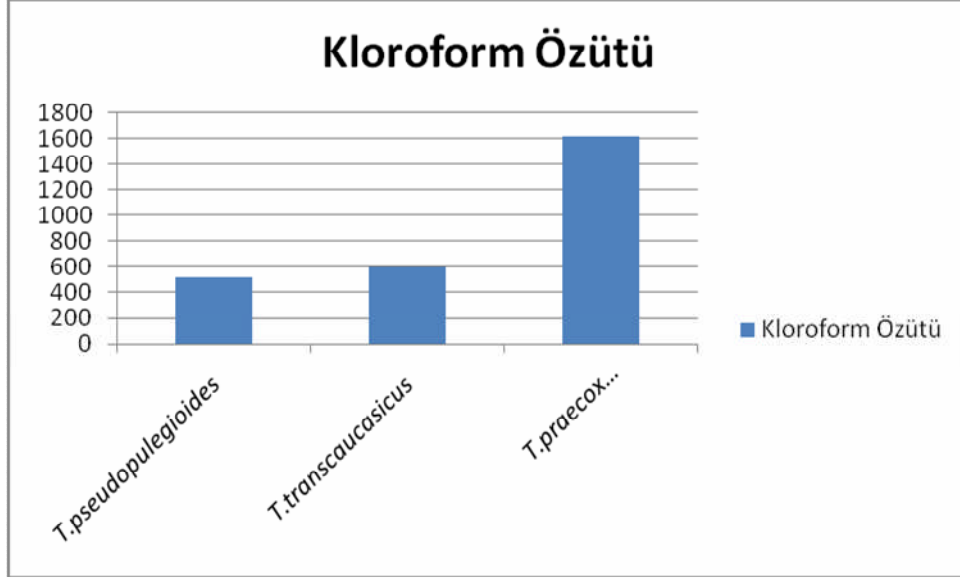
Şekil 7. DPPH Yönteminde *T. trancaucasicus*'un Uçucu Yağ Derişimine Karşı %İnhibisyon Değerleri



Şekil 8. DPPH Yönteminde *T. pseudopulegioides*'un Uçucu Yağ Derişimine Karşı % İnhibisyon Değerleri

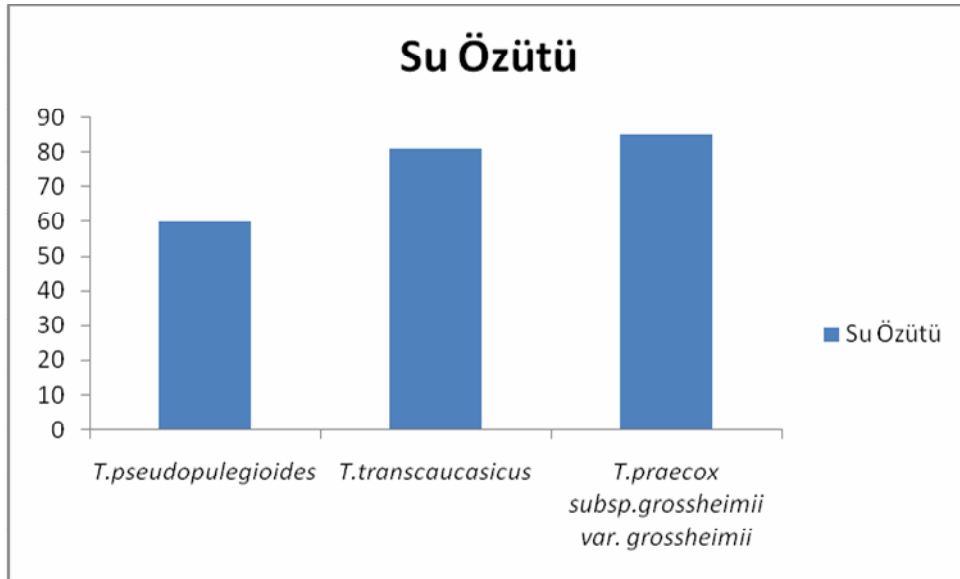
Grafiklerden de görüleceği gibi, çalışılan bitkilerin su özütleri (metanol-polar faz) ve uçucu yağlarının serbest radikal temizleme yetenekleri, kloroform özütlerine (metanol-nonpolar faz) göre daha yüksektir. Şekil 1, 2 ve 3'te verilen grafiklerden bitkilerin bu yöntemde en zayıf aktivite gösteren kloroform fazlarının  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Buna göre; *T. praecox*' dan elde edilen kloroform fazının  $IC_{50}$  değeri 1700  $\mu\text{g/ml}$  olup, bunu *T.transcaucasicus* ( $IC_{50}$  :603 $\mu\text{g/ml}$ ) ve *T. pseudopulegioides*'in kloroform fazları ( $IC_{50}$ : 515  $\mu\text{g/ml}$ ) izlemektedir. Çalışılan üç bitkinin kloroform fazlarının  $IC_{50}$  değerleri esas alınarak hazırlanan karşılaştırmalı grafik Şekil 9'da verilmiştir.





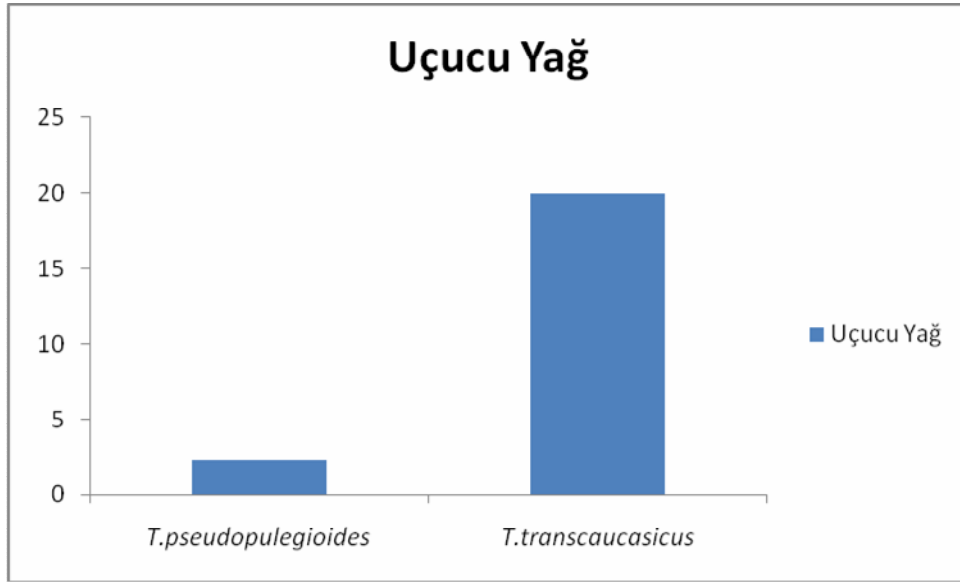
Şekil 9. Üç *Thymus* Türünün Metanol Özütü Kloroform Fazlarının DPPH Yöntemiyle Radikal Süpürücü Etkilerinin Karşılaştırılması.

DPPH testlerinde güçlü aktivite gösteren su fazlarının Şekil 4, 5 ve 6'da verilen grafikten  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Buna göre, *T. pseudopulegioides* su fazının  $IC_{50}$  değeri  $60\mu\text{g/ml}$ , *T. transcaucasicus*'un  $81\mu\text{g/ml}$ , *T. praecox* un ise  $85\mu\text{g/ml}$ ' dir. Çalışılan üç bitkinin su fazlarının  $IC_{50}$  değerleri esas alınarak hazırlanan karşılaştırmalı grafik Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Üç *Thymus* Türünün Metanol Özütü Su Fazlarının DPPH Yöntemiyle Radikal Süpürücü Etkilerinin Karşılaştırılması.

Son olarak uçucu yağların DPPH testlerinden elde edilen verileri değerlendirildi. Yukarıda da bahsedildiği gibi *T. praecox* uçucu yağı aktivite göstermedi. Diğer iki türe ait uçucu yağların IC<sub>50</sub> değerleri grafiklerden (Şekil 7 ve 8) hesaplandı. Buna göre, *T. pseudopulegioides*'in uçucu yağı en yüksek aktiviteye sahiptir (IC<sub>50</sub> 2,3 µg/ml). *T. transcaucasicus*'un uçucu yağı ise yine yüksek aktivite göstermiştir (IC<sub>50</sub> 20 µg/ml). Karşılaştırma amacıyla, her iki uçucu yağın IC<sub>50</sub> değerlerinden elde edilen grafik Şekil 11' de verilmiştir.



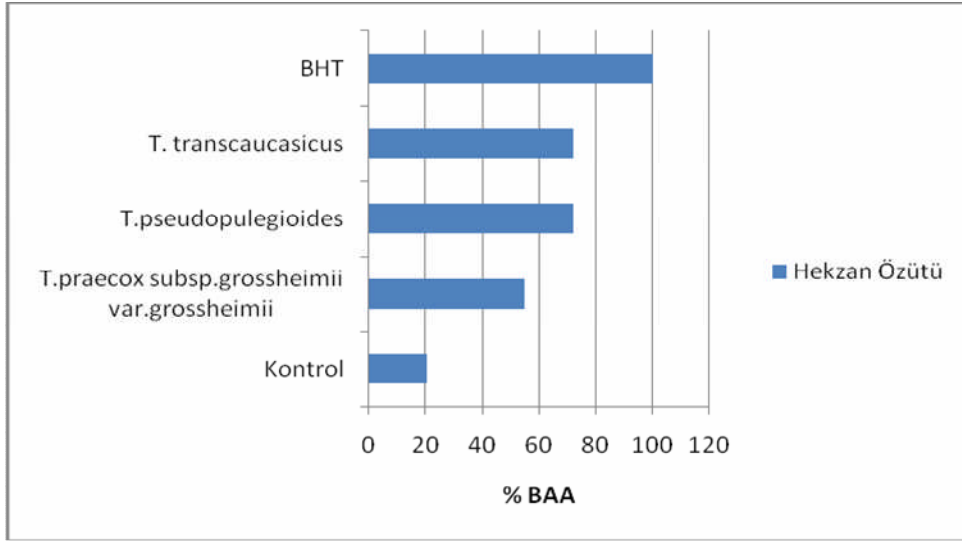
Şekil 11. Aktivite Gösteren Uçucu Yağların DPPH Yöntemiyle Radikal Süpürücü Etkilerinin Karşılaştırılması.

IC<sub>50</sub> değerinin düşük olması aktivitenin yüksek olduğunu gösterir. Buna göre en yüksek radikal süpürücü etki 2,3 µg/ml ile *T. pseudopulegioides*'in uçucu yağına aittir.

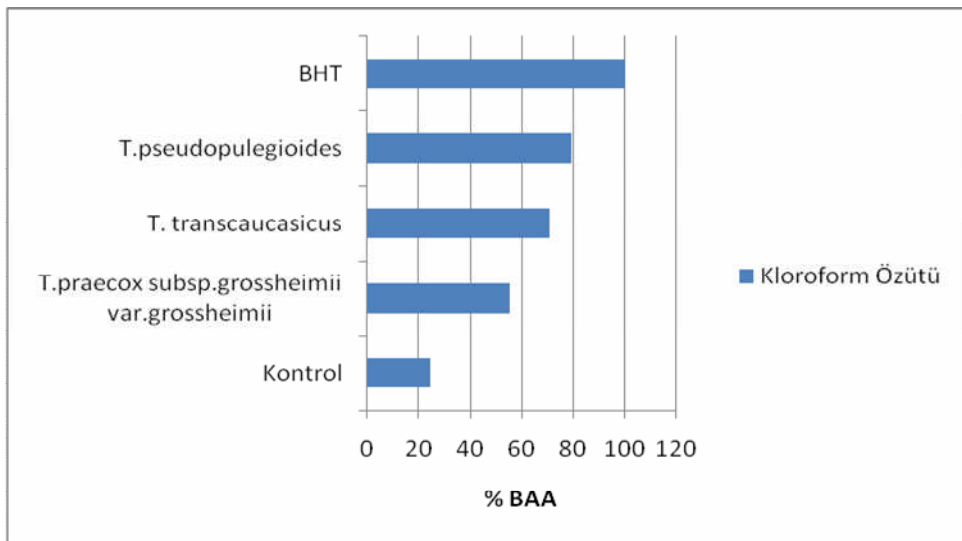
### 3.2.2. β-Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Antioksidan aktivitesinde uygulanan diğer bir test yöntemi de β-karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemidir. Bu yöntemde β-karoten'in karakteristik sarı renginin belli bir periyotta korunumu esas alındı. 24 saatlik zaman süresinde ölçülen absorbans değerleri BHT nin absorbansına karşı değerlendirildi, % inhibisyon değerleri hesaplandı ve % BAA değerleri rapor edildi. Sonuçlar Şekil 12, 13 ve 14'de verildi.

*T. transcaucasicus*, *T. pseudopulegioides* ve *T. praecox* bitkilerinin elde edilmiş sırasına göre öncelikle hekzan özütleri değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 12’de grafik halinde sunuldu. Bu özütler değerlendirildiğinde en yüksek aktivite %72,32 ‘lik inhibisyon değeriyle *T. transcaucasicus* ve % 72,11’lik inhibisyon değeriyle *T. pseudopulegioides* hekzan özütlerine aittir. % 54,83’lük inhibisyon değeriyle *T. praecox* subsp. *grossheimii* *grossheimii* var. *grossheimii* hekzan özütünün daha zayıf aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi.



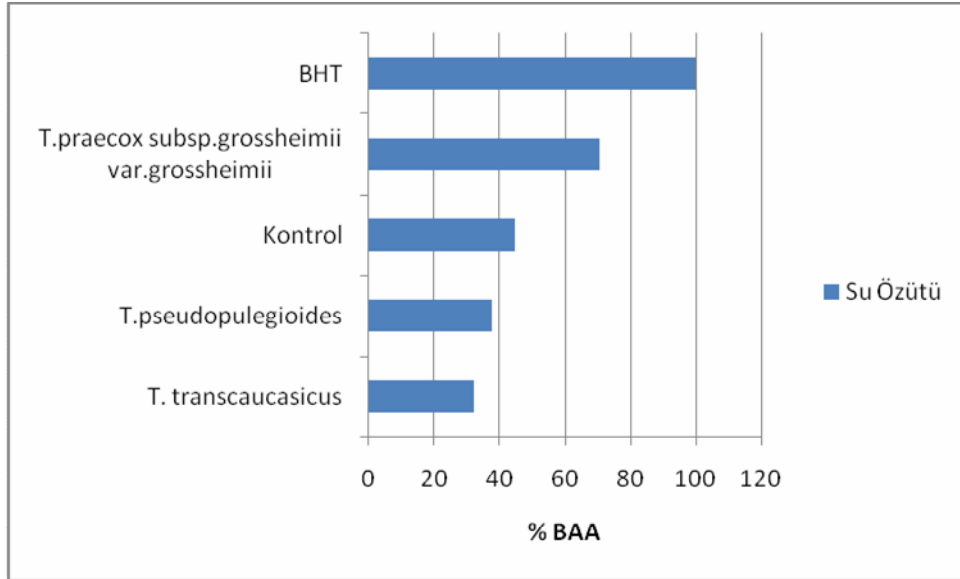
Şekil 12. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen Hekzan Özütlerinin % BAA Değerleri



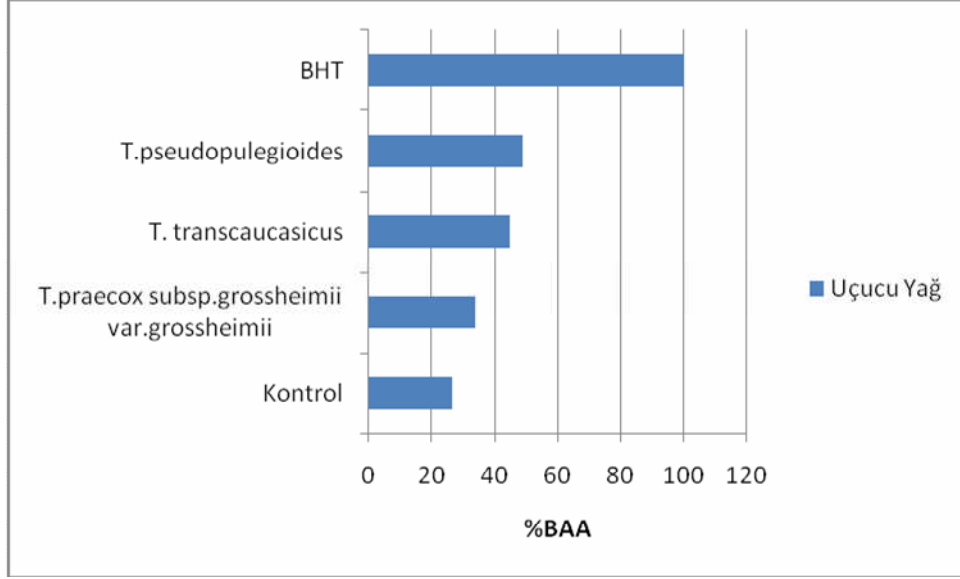
Şekil 13. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen Kloroform Özütlerinin % BAA Değerleri

Şekil 13'te *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* bitkilerinin aktiflik sırasına göre sıralanmış kloroform fazları değerlendirildiğinde %79,45 'lik inhibisyon değeriyle *T. pseudopulegioides* ve % 70,92'lik inhibisyon değerine *T. transcaucasicus*'un kloroform fazlarının yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. % 57,58'lik inhibisyon değeriyle *T. praecox* burada da daha zayıf bir aktivite göstermiştir.

*T. praecox*, *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* bitkilerinin metanol özütlerinden kısımlandırmayla elde edilmiş su fazları değerlendirildiğinde daha farklı bulgulara rastlanmıştır (Şekil 14). Bu na göre, su fazları içinde en yüksek önleyici etki %70,75 'lik inhibisyon değeriyle *T. praecox* su özütünün en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus*'un su fazları, kontrolden de düşük, aktiviteye sahiptir (inhibisyon değerleri, sırasıyla, % 32,26 ve %37,54 dir).



Şekil 14. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen Su Özütlerinin % BAA Değerleri



Şekil 15. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen uçucu yağlarının % BAA Değerleri

Şekil 15'te *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* bitkilerinin aktiflik sırasına göre sıralanmış uçucu yağları değerlendirildiğinde, %49,07'lik inhibisyon değeriyle *T. pseudopulegioides*'in en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *T. transcaucasicus* uçucu yağının % 44,94 ve *T. praecox* un ise %34,02'lik inhibisyon değeri verdiği hesaplanmıştır.

### 3.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Örneklerin antimikrobiyal (antibakteriyal, antikandidal ve antifungal) aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi için öncelikle Yapılan Çalışmalar (Bölüm 2) kısmında yer verilen disk difüzyon yöntemi uygulandı. Üç bitkiden elde edilen hekzan ve metanol özütlerinin su fazlarında aktiviteye rastlanmadı. Kloroform fazlarının bazı test mikroorganizmalarına (*Acinetobacter baumannii* ve *Bacillus subtilis*) karşı 8 mm den küçük zon çapları oluşturduğu gözlemlendi. Ancak, mikrokuyucuk (microwell) dilüsyon yöntemi uygulandığında, herhangi bir Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) değeri elde edilemedi. Sonuçta antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları sonucuna varıldı.

*Pseudomonas aureginosa* bakterisi ile ilgili bulgular hariç, *Thymus* türlerinden elde edilen uçucu yağların (özellikle *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus*) güçlü antibakteriyal ve antifungal aktivite gösterdiği gözlemlendi. Antibakteriyal aktivite test

sonuçları Tablo 6 ve antikandidal-antifungal aktivite test sonuçları ise Tablo 7’ de verilmiştir. Antimikrobiyal testler üç farklı bitki türüyle gerçekleştirildiğinden, her bir bitki türünden elde edilen sonuçlar ayrı değerlendirildi.

*T. pseudopulegioides* uçucu yağının denendiği disk difüzyon testlerinde, *Pseudomonas aureginosa* hariç, 12-3 ila 42 mm arasında değişen zon çapları ölçüldü. Böylelikle anılan mikroorganizma hariç, tüm bakterilerin bu bitkinin uçucu yağına hassas olduğu anlaşıldı ve mikrokuyucuk yöntemiyle her mikroorganizmaya karşı MİK değerleri bulundu. Sonuçta, bilhassa *A. baumannii* ve *P. vulgaris*’in en hassas bakteriler olduğu görüldü (MİK değerleri sırasıyla, 12,5-25 µg/ml). 50 µg/ml MİK değeri ile *B. subtilis* ve *S. aureus*’ un da söz konusu uçucu yağa karşı hassas oldukları bulundu. Test bakterileri arasında *Str. pyogenes* ve *E.coli* daha dirençli bakterilerdir (MİK: 400 µg/ml).

Disk difüzyon yönteminde, *T. pseudopulegioides* uçucu yağı test funguslarına karşı yaklaşık 50 mm.’lik çapında büyük zonlar meydana getirdi. Akabinde, agar dilüsyon yöntemine başvuruldu ve sonuçta, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.* ve *Fusarium sp.* karşı güçlü aktivite gözlemlendi (MİK: 3,125 µg/ml). Ayrıca uçucu yağın yüksek antikandidal aktiviteye sahip olduğu saptandı. *Candida albicans* üzerinde 28 mm’lik zon çapı gözlemlendi ve 50 µg/ml MİK değerine ulaşıldı.

*T. transcaucasicus* bitkisinin uçucu yağı da *Pseudomonas aeruginosa* hariç diğer test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteye göstermiştir. Disk difüzyon yönteminde test mikroorganizmalarına göre değişen 16.2 ile 32.3 mm arasında değişen zon çapları saptandı. Bu örneğe karşı da en hassas bakterilerin, 12,5 µg/ml MİK değeri ile *B. subtilis* ve *Acinetobacter baumannii* olduğu gözlemlendi (Tablo 6). 25-400 µg/ml arasında değişen MİK değerleri ile uçucu yağın diğer mikroorganizmalara karşı da etkili olduğu görüldü (Tablo 6 ).

*T. transcaucasicus* uçucu yağının da antifungal aktivite gösterdiğini disk difüzyon testleri ortaya koymuştur. Buradaki testlerde üç test fungusuna karşı 20 mm (*Aspergillus sp.*) ve 40 mm (*Fusarium sp.* ve *Rhizopus sp.*) zon çapları ölçüldü. MİK agar dilüsyon yöntemi sonucunda ise 6,25 µg/ml MİK değerleri elde edildi.

Bu bitkiden elde edilen uçucu yağın, test edilen tüm uçucu yağlar içinde en yüksek ve güçlü antikandidal aktiye sahip olduğu bulundu. 32 mm’lik zon çapı görüldü ve 25 µg/ml MİK değerine ulaşıldı.

*T.praecox* uçucu yağının ise test edilen uçucu yağlar içinde en zayıf antimikrobiyal aktivite gösteren örnek olduğu gözlemlendi. Zira, test edilen 13 mikroorganizmadan sadece

*Bacillus subtilis* (10 mm'lik zon çapı ve 2000 µg/ml MİK değeri), *A. Baumanii* (16.2 mm'lik zon çapı ve 1000µg/ml MİK değeri), *Candida albicans* (8 mm'lik zon çapı ve 2000 µg/ml MİK değeri), *Fusarium sp.* (18 mm'lik zon çapı ve 1000 µg/ml MİK değeri) ve *Rhizopus sp.* (18 mm'lik zon çapı ve 500 µg/ml MİK değeri) mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Tablo 6. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus*, *T. praecox* Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Aktiviteleri

Bakteriler/ Kaynak bitkiler	<i>T. pseudopulegioides</i>		<i>T. transcaucasicus</i>		<i>T. praecox</i>		Kontrol <sup>a</sup>
	DD <sup>b</sup>	MİK <sup>c</sup>	DD <sup>b</sup>	MİK	DD <sup>b</sup>	MİK	DD
<i>A. baumanii</i>	28.3 ± 1.0	25	30.3 ± 2.0	12,5	16.2 ± 1.5	1000.00	18(NET)
<i>B. subtilis</i>	28.0 ± 0.0	50	32.3 ± 0.7	12,5	10.5 ± 0.5	2000.00	20(NET)
<i>E. cloacae</i>	22.5 ± 1.0	100	18.0 ± 0.0	200	8.0 ± 0.0	-	14(NET)
<i>E. faecalis</i>	16.3 ± 0.7	200	18.5 ± 0.5	200	10.2 ± 0.5	-	12(NET)
<i>E. coli</i>	14.0 ± 0.0	400	16.2 ± 1.0	400	-	-	18(NET)
<i>P. vulgaris</i>	42.0 ± 1.0	12,5	24.0 ± 2.0	25	8.0 ± 0.0	-	20(NET)
<i>Ps. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	22(NET)
<i>St. aureus</i>	26.0 ± 0.0	50	14.0 ± 0.3	200	8.0 ± 0.0	-	16(NET)
<i>Str. pyogenes</i>	12.3 ± 1.7	400	14.0 ± 0.0	200	-	-	10(NET)

<sup>a</sup>DD=OFX=Ofloxacin (10µg/disk); SCF=sulbactam (30µg)+cefoperazona (75µg) (105 µg/disk) ve NET=Netilmicin, (30µg/disk) pozitif referans standart antibiyotik diskleri olarak kullanıldı (Oxoid);

<sup>b</sup>300µg/disk = özütün oluşturduğu inhibisyon zonu çapı (mm)

<sup>c</sup> Minimal İnhibitör Derişimi (µg/ml)

Tablo 7. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus*, *T. praecox* Uçucu Yağlarının Antifungal Aktiviteleri

Mantarlar/ Kaynak bitkiler	<i>T. pseudopulegioides</i>		<i>T. transcaucasicus</i>		<i>T. praecox</i>		Kontrol <sup>a</sup>
	DD <sup>a</sup>	MIK <sup>b</sup>	DD <sup>a</sup>	MIK	DD <sup>a</sup>	MIK	
<i>C. albicans</i>	28.2 ± 1.9	50	32.0 ± 1.0	25	8.0 ± 0.0	2000	-(NET)
<i>Aspergillus sp.</i>	48.5 ± 1.5	3,125	20.0 ± 0.5	100	-	-	-(NET)
<i>Fusarium sp.</i>	48.7 ± 2.0	3,125	40.0 ± 0.0	6,25	18.7 ± 1.0	1000	-(NET)
<i>Rhizopus sp.</i>	50.7 ± 2.2	3,125	40.0 ± 2.3	6,25	18.5 ± 2.3	500.00	-(NET)

<sup>a</sup>DD=OFX= Ofloxacin (10µg/disc); SCF= sulbactam (30µg)+cefoperazona (75µg) (105 µg/disk) ve NET= Netilmicin, (30µg/disk) pozitif referans standart antibiyotik diskleri olarak kullanıldı (Oxoid);

<sup>b</sup> Minimal İnhibitör Derişimi (µg/ml)

### 3.4. Uçucu Yağların Kimyasal İçerikleri

Tez kapsamında değerlendirilen üç *Thymus* türü; *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*, *T. transcaucasicus* ve *T. pseudopulegioides*'in uçucu yağları toprak üstü kısımlarından, Bölüm 2'de verilen yöntemle elde edildi. Bu üç bitkiye ait uçucu yağların verimleri sırasıyla % 049, % 0.80 ve % 0.98 olarak hesaplandı (Bkz. Bölüm 3, Tablo 5).

Uçucu yağ profilleri Gaz Kromatografisi (GK), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GK-KS) ve Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Detektörü (GK-AİD) teknikleri (Bkz. Bölüm 2) ile saptandı.

*T. praecox* uçucu yağ örneğinin GK-KS analizleri sonucunda toplam 33 pik saptandı. Bu piklerin uçucu yağın % 99.0'unu oluşturan 33 bileşene ait olduğu görüldü (Tablo 8). Uçucu yağın ana bileşenlerinin sırasıyla timol (%29.4), karvakrol (%13.8),  $\gamma$ -Terpinen (%13.1) ve *p*-simen (%11.7) olduğu sonucuna varıldı ve Şekil 16'da grafik halinde sunuldu.



Tablo 8. *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşenleri

Pik No	K.I.*	Bileşen	%
1.	886	$\alpha$ -Tuyen	0.9
2.	984	$\alpha$ -Pinen	5.7
3.	909	Kamfen	0.1
4.	933	1-Okten-3-ol	5.0
5.	940	3-Oktanon	0.8
6.	944	$\beta$ -Mirsen	2.5
7.	950	3-Oktanol	2.0
8.	960	$\alpha$ -Fellandrene	0.2
9.	971	$\alpha$ -Terpinen	3.2
10.	980	<b><math>p</math>-Simen</b>	<b>11.7</b>
11.	1004	( <i>E</i> )- $\beta$ -Osimen	0.1
12.	1016	<b><math>\gamma</math>-Terpinen</b>	<b>13.1</b>
13.	1030	cis-Sabinen hidrat	0.5
14.	1052	Terpinolen	İz
15.	1063	Linalool	0.8
16.	1146	Borneol	0.4
17.	1157	Terpinen-4-ol	5.0
18.	1174	$\alpha$ -Terpineol	0.1
19.	1222	Timol metil eter	0.2
20.	1234	Karvakrol metil eter	0.9
21.	1292	<b>Timol</b>	<b>29.4</b>
22.	1313	<b>Karvakrol</b>	<b>13.8</b>
23.	1367	Timol asetat	0.1
24.	1445	$\beta$ -Karyofillen	1.1
25.	1467	Aromadendren	0.1
26.	1507	$\gamma$ -Muurolen	İz
27.	1514	D-Germakren	İz
28.	1529	Viridifloren + Bisiklogermakren	0.4
29.	1539	$\beta$ -Bisabolen	0.2
30.	1557	$\delta$ -Kadinen	0.1
31.	1574	$\alpha$ -Bisabolen	0.4
32.	1618	Spathulenol	0.2
	1626	Karyofillen oksit	İz
<b>Toplam</b>			<b>99.0</b>

\* K.I.: Kovats İndeks, n-oktan ve n-eikosan referans alınarak ve Rtx-5MS non-polar kolon kullanılarak elde edildi.

& İz miktarda: %0,07'den düşük değerler.

*T. pseudopulegioides* uçucu yağ örneğinde ise 34 pik saptandı ve bu piklerin 34 bileşene ait olduğu ve uçucu yağın %98,5'ini temsil ettiği saptandı (Tablo 9 ). Bu uçucu yağın ana bileşenleri; timol (%58),  $\gamma$ -Terpinen (%10), p-simen (%8,5) ve karvakrol metil eter (%2,9) olduğu belirlendi (Şekil 17).

Tablo 9. *T. pseudopulegioides* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşenleri

Pik No	K.I.	Bileşen	%
1.	886	$\alpha$ -Tuyen	0.6
2.	984	$\alpha$ -Pinen	2.3
3.	933	1-Okten-3-ol	1.0
4.	940	3-Oktanon	0.4
5.	944	$\beta$ -Mirsen	1.2
6.	950	3-Oktanol	0.3
7.	960	$\alpha$ -Fellandren	1.2
8.	980	<b>p-Simen</b>	<b>8.5</b>
9.	1016	<b><math>\gamma</math>-Terpinen</b>	<b>10.0</b>
10.	1031	<i>cis</i> -sabinen hidrat	0.1
11.	1052	Terpinolen	İz <sup>&amp;</sup>
12.	1062	Linalool	1.3
13.	1146	Borneol	0.2
14.	1157	Terpinen-4-ol	0.3
15.	1174	$\alpha$ -Terpineol	İz
16.	1222	Timol metil eter	1.9
17.	1234	<b>Karvakrol metil eter</b>	<b>2.9</b>
18.	1291	<b>Timol</b>	<b>58.0</b>
19.	1313	Karvakrol	2.7
20.	1367	Timol asetat	İz
21.	1406	$\beta$ -Burbonen	İz
22.	1445	$\beta$ -Karyofillen	2.0
23.	1456	$\beta$ -Copaen	İz
24.	1467	Aromadendren	0.2
25.	1484	$\alpha$ -Karyofillen	İz
26.	1507	$\gamma$ -Murolen	0.3
27.	1514	D-Germakren	0.1
28.	1527	Viridifloren + bisiklogermakren + $\alpha$ -Muurolen (çakışma)	0.6
29.	1539	$\beta$ -Bisabolen	1.2
30.	1549	$\gamma$ -Kadinen	0.2
31.	1557	$\delta$ -Kadinen	0.4
32.	1574	$\alpha$ -Bisabolen	0.2
33.	1618	Spatulenol	0.4
34.	1625	Karyofillen oksit	0.2
<b>Toplam</b>			<b>98.5</b>

\* K.I.: Kovats Indeks, n-oktan ve n-eikosan referans alınarak ve Rtx-5MS non-polar kolon kullanılarak elde edildi.

<sup>&</sup> İz miktarda: %0,07'den düşük değerler.

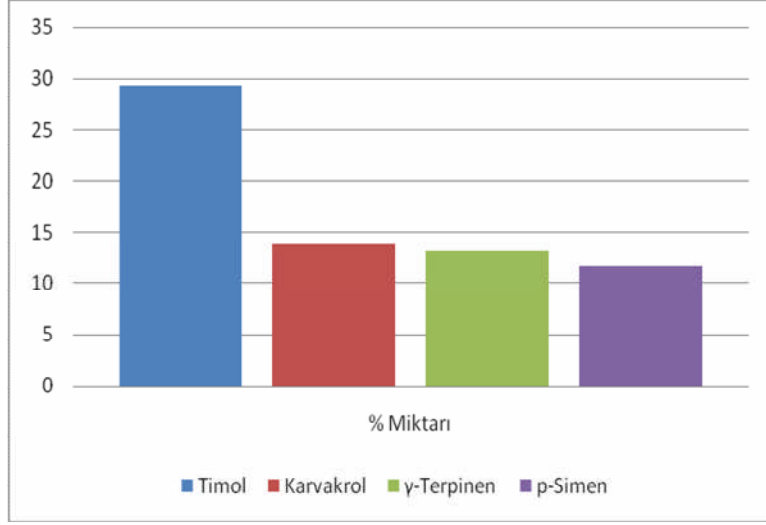
Çalışma kapsamındaki son tür, *T. transcaucasicus* uçucu yağının 30 bileşen içerdiği ve bu bileşenlerin uçucu yağın %98.6'sını temsil ettiği saptandı (Tablo 10). Uçucu yağın ana bileşenlerinin; timol (%55), karvakrol (%19,7),  $\gamma$ -Terpinen (%6,7) ve *p*-simen (%5.5) olduğu belirlendi (Şekil 18).

Tablo 10. *T. transcaucasicus* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Kimyasal Bileşenleri

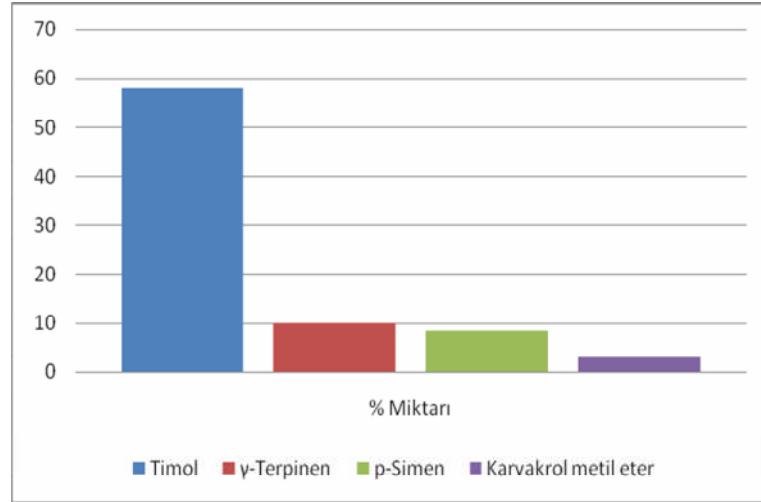
Pik No.	K.I.*	Bileşen	%
1.	886	$\alpha$ -Tuyen	0.5
2.	984	$\alpha$ -Pinen	0.9
3.	933	1-Okten-3-ol	1.0
4.	940	3-Oktanon	0.3
5.	944	$\beta$ -Mirsen	0.7
6.	950	3-Oktanol	0.4
7.	960	$\alpha$ -Fellandren	0.1
8.	971	$\alpha$ -Terpinen	1.1
9.	980	<b><i>p</i>-Simen</b>	<b>5.5</b>
10.	1016	<b><math>\gamma</math>-Terpinen</b>	<b>6.7</b>
11.	1031	cis-Sabinen hidrat	0.2
12.	1062	Linalool	0.3
13.	1146	Borneol	0.3
14.	1157	Terpinen-4-ol	0.9
15.	1222	Timol metil eter	0.1
16.	1234	Karvakrol metil eter	0.5
17.	1291	<b>Timol</b>	<b>55.0</b>
18.	1313	<b>Karvakrol</b>	<b>19.7</b>
19.	1445	$\beta$ -Karyofillen	1.5
20.	1467	Aromadendren	0.3
21.	1484	$\alpha$ -Karyofillen	İz
22.	1507	$\gamma$ -Muurolen	0.1
23.	1514	D-Germakren	İz
24.	1529	Viridifloren	0.5
25.	1539	$\beta$ -Bisabolen	0.3
26.	1549	$\gamma$ -Kadinen	0.1
27.	1557	$\delta$ -Kadinen	0.2
28.	1574	$\alpha$ -Bisabolen	0.6
29.	1618	Spathulenol	0.6
30.	1625	Karyofillen oksit	0.2
<b>Toplam</b>			<b>98.6</b>

\* K.I.: Kovats Indeks, n-oktan ve n-eikosan referans alınarak ve Rtx-5MS non-polar kolon kullanılarak elde edildi.

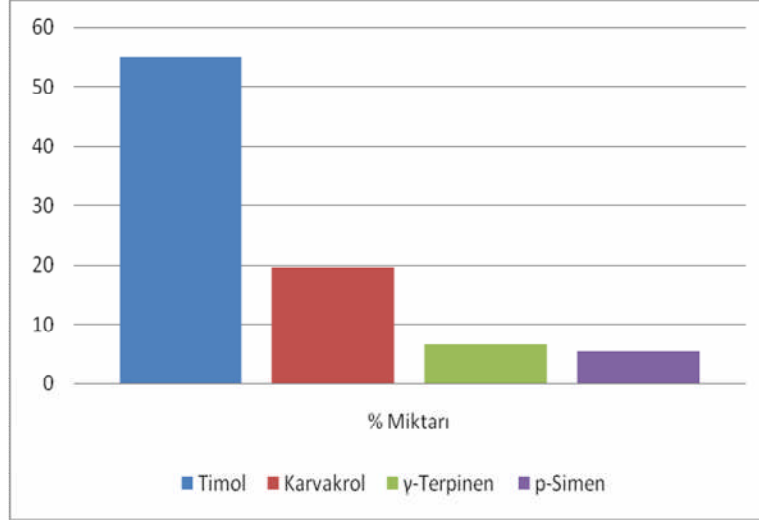
<sup>α</sup> İz miktarda: %0,07'den düşük değerler.



Şekil 16. *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Ana Bileşenleri



Şekil 17. *T. pseudopulegioides* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Ana Bileşenleri



Şekil 18. *T. transcaucasicus* Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarından Elde Edilen Uçucu Yağın Ana Bileşenleri

### 3.5. Antiviral Aktivite Testleri

#### 3.5.1. Hücresel Toksisite Etki

Bu çalışmada *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütlerinin hücre üremesi üzerine etkileri araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 11' de verilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların hücre üremesi üzerine etkileri çalışılmamıştır.

Tablo 11. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus*, *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen Hekzan, Kloroform ve Su Özütlerinin Hücre Üremesi Üzerine Etkileri

Test Maddesi		CC <sub>50</sub> değerleri (µg/ml)	
		Vero Hücresi <sup>1</sup>	MDCK hücresi <sup>2</sup>
<i>T. pseudopulegioides</i>	Hekzan	75,34	75,31
	Kloroform	72,95	32,92
	Su	> 100	> 100
<i>T. transcaucasicus</i>	Hekzan	> 100	66,64
	Kloroform	48,73	66,26
	Su	> 100	> 100
<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>	Hekzan	66,17	64,86
	Kloroform	65,1	41,19
	Su	> 100	> 100

<sup>1</sup> Green Monkey Kidney Cells

<sup>2</sup> Madin Darby Canine Kidney

Bitkilerin hekzan, kloroform ve su özütlerinin Vero ve MDCK hücrelerinin üremeleri üzerindeki etkilerine bakıldığında (Tablo 11), su özütlerinin toksisitesinin diğer özütlerle göre daha düşük olduğu gözlemlendi (CC<sub>50</sub>>100 µg/ml). En yüksek toksisiteye sahip özütün *T. pseudopulegioides*'e ait kloroform özütü olduğu tespit edildi (CC<sub>50</sub>: 32,92 µg/ml).

### 3.5.2. Sitopatik Etki Azaltma Testi

Bu çalışmada *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütlerinin antiviral etkileri araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 12'de verilmiştir. Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların antiviral etkileri çalışılmamıştır.

Tablo 12. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus*, *T. praecox* Bitkilerinden Elde Edilen Hekzan, Kloroform ve Su Özütlerinin Antiviral Etkileri

Test Maddesi		Anti-HSV aktivite		Anti-Influenza A aktivite	
		EC <sub>50</sub> (µg/ml)	SI	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	SI
<i>T. pseudopulegioides</i>	Hekzan	> 100	< 1	38.2	1.9
	Kloroform	> 100	< 1	> 100	< 1
	Su	> 100	< 1	50.0	2
<i>T. transcaucasicus</i>	Hekzan	> 100	< 1	28.13	2.3
	Kloroform	> 100	< 1	> 100	< 1
	Su	> 100	< 1	> 100	< 1
<i>T. praecox</i> subsp. <i>grossheimii</i> var. <i>grossheimii</i>	Hekzan	> 100	< 1	24.54	2.5
	Kloroform	> 100	< 1	> 100	< 1
	Su	> 100	< 1	> 100	< 1

Tablo 12'ye göre, bitkilere ait hekzan, kloroform ve su özütlerinin HSV virüsü üzerinde antiviral etkilerinin olmadığı tespit edildi (EC<sub>50</sub>>100 µg/ml). Bunun yanında, bu özütlerin bazılarının (tüm bitkilerin hekzan özütleri ve *T. pseudopulegioides*'in kloroform özütünde) Influenza virüsü üzerinde antiviral etkiye sahip olduğu görüldü.

## 4.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Doğu Karadeniz Bölgesinin farklı lokalitelerinden toplanan, üç *Thymus* türünün, *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* olmak üzere hekzan, kloroform ve su özütleriyle uçucu yağlarının bazı biyolojik aktiviteleri araştırıldı. Uçucu yağları, bitkilerin toprak üstü kısımlarından su distilasyonu yoluyla elde edildi ve GC ve GC-MS yöntemiyle kimyasal bileşenleri belirlendi (Tablo 8, 9 ve 10). Yine çalışılan bitki örneklerinin toprak üstü kısımlarının farklı çözücülerle (Hekzan, Metanol) muamele edilerek hekzan, su ve kloroform özütleri elde edildi (Tablo 4). Çalışılan bitkilerden elde edilen özüt ve uçucu yağ verimleri Tablo 5'te verildi. Elde edilen bu özütlerin ve uçucu yağların antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteleri araştırıldı.

Tüm örneklerin biyolojik aktivite sonuçları değerlendirildiğinde uçucu yağların daha etkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu bölümde öncelikle çalışma kapsamındaki bitkilerden elde edilen uçucu yağların özellikleri tartışılacaktır.

### 4.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenleri

Uçucu yağlar bitkilerin otsu kısımlarından ve genellikle toprak üstü kısımlarından elde edilir. Bunun için genellikle su veya buhar distilasyonuna başvurulur. Bitki türüne bakılmaksızın elde edilen uçucu yağda çok sayıda kimyasal bileşik bulunur. Bu bileşikler; terpenler (mono-, seski- ve az da olsa di-terpenler), alifatik hidrokarbonlar, asitler, alkoller, aldehytler ve laktonlar başlıkları altında sınıflandırılırlar. Bu bileşiklerin karışımından oluşan uçucu yağlara geçmişte bitkilerin “toksik” atık ürünleri olduğu ve bitkileri için hiç bir pratik değeri olmadığı düşünülüyordu. Oysa bu kimyasalların böcek uzaklaştırıcı ve mikrop öldürücü etkileri ile bitkilerin vazgeçilmez unsurları olduğu günümüzde iyi bilinen bir gerçektir. Bunun yanı sıra uçucu yağların allelopatik etki gösterdiği, yapraklardan su kaybını önlediği ve böceklerle tozlaşan bitkiler için cezbedici özellikleri de ortaya konmuştur (Stahl-Biskop, 2002).

Halk arasında “kekik” olarak bilinen Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait *Thymus*, *Origanum* ve *Satureja* türleri ülkemizin en önemli aromatik bitkileridir. Bu bitkiler arasında *Origanum* türleri, özellikle daha yüksek uçucu yağ verimleriyle, bitkisel ham



madde olarak ülkemizin başlıca ihraç ürünüdür. Burada anılan aromatik bitkiler ilaç, parfümeri, kozmetik, deterjan, tatlandırıcı, aromatik yağ sanayinde ve ayrıca baharat olarak kullanılmaktadır (Mulas, 2006).

*Thymus* türlerinde daha az uçucu yağ verimi olduğundan ihraç ürünü olmaktan ziyade, ülkemizin çeşitli yörelerinde baharat ve çay olarak tüketilmektedir (Baytop, 1997). Araştırma kapsamında değerlendirilen *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*, *T. transcaucasicus* ve *T. pseudopulegioides* türlerinin uçucu yağ verimi de buna paralel olarak (% 1.0 v/w) den azdır (sırasıyla % 0.49, % 0.80 ve % 0.98, v/w). Türkiye florasında değişik bölgelerden, lokalitelerden toplanan *Thymus* türlerinin uçucu yağ verimleri de değişiklik göstermektedir. Uçucu yağ verimleri % 0.01'den % 3.4' e kadar değişkenlik arz etmektedir. Uçucu yağ verimi % 0.01 civarında olanlar zayıf, % 0.01 ila 1.0 olanlar orta, % 1.0 den büyük onlalar ise zengin olarak sınıflandırılmıştır (Yıldız, 2004). Bu kriterlere göre bu araştırmanın konusu bitkilerin uçucu yağları verim bakımından “orta derecede zengin” olarak kabul görebilir.

Burada bahsedilen ilk tür, *T. praecox*, çiçeklenme döneminin hemen başında toplanmıştır ve toplanan populasyonlarda çiçekli bitki sayısı çok azdır. Diğer *Thymus* türlerine göre daha az uçucu yağ içermesi, uçucu yağ bileşenlerinin farklı olması ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitede gözlenen ve aşağıda değerlendirilen söz konusu biyolojik aktivitelerin bu bitkide güçlü olmamasının nedeni bu faktöre dayandırılabilir.

*Thymus* türlerine ait uçucu yağların GK, GK-KS analizleri monoterpenlerin zenginliğine işaret etmektedir. Genellikle uçucu yağların % 90'ı monoterpenlerden ibarettir. Daha az sıklıkta seskiterpenlere de rastlanır. Bilinen tüm monoterpenler farklı türlerde saptanmıştır (Stahl-Biskop, 2002). Fenolik monoterpenler, timol ve karvakrol, bu türlerin uçucu yağlarında en bol bulunan bileşenlerdir. Ancak bu bileşenlerin her *Thymus* uçucu yağında bulunacağı anlamına gelmez. Timol ve karvakrol içeren uçucu yağlarda *p*-simen ve  $\gamma$ -terpinen de mutlaka yer alır. Zira anılan bu monoterpenlerin tümü biyogenetik olarak birbirleriyle çok yakın ilişkilidir. Ayrıca bu tip uçucu yağlara fenolik karakterli demek de yanlış olmaz (Stahl-Biskop, 2002).

Araştırma kapsamında yer alan bitkilerin uçucu yağları da bu niteliktedir. Bu kapsamda çalışılan ilk tür *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii*'un uçucu yağlarının bileşenleri sırasıyla timol (%29.4), karvakrol (%13.8),  $\gamma$ -Terpinen (%13.1) ve *p*-simen' dir (%11.7). Bu türle yapılan önceki çalışmada, balaban Köyü-Hamsiköy-Trabzon civarından toplanan örneklerden % 0.67 uçucu yağ verimi elde edilmiş, uçucu yağ

içeriğinin ana bileşeninin timol olduğu saptanmıştır (% 26.6). Bunu *p*-simen (% 24.9) izlemiştir.  $\alpha$ -pinen, terpinil asetat ve  $\beta$ -karyofillen az miktarda bulunmuştur (Başer, vd., 1996). Esas içerik bakımından uyum göstermekle beraber, önceki çalışmada karvakrole rastlanmaması, *p*-simen'nin ikinci ana bileşen olması ve terpinil asetat varlığı ile burada sunulan bulgulara göre farklılık göstermektedir.

*T. praecox*'un bir diğer alt türü olan ve halk arasında "Anzer çayı" *T. praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* uçucu yağları ile yapılan bir çalışmada ana bileşenlerin timol (%47.45),  $\gamma$ -terpinen (%8.73), *p*-simen (%8.30), terpinil asetat (%4.88) ve karvakrol (4.66%) olduğu rapor edilmiştir (Şekeroğlu, vd., 2007).

Araştırma kapsamındaki diğer tür *T. pseudopulgioides* uçucu yağında ana bileşenler olarak timol (%58),  $\gamma$ -Terpinen (%10), *p*-simen (%8,5) ve karvakrol metil eter (%2,9) saptandı. Bu bitkinin uçucu yağı ile ilgili tek veri olan makalede farklı lokalitelerden toplanmış bitkilerde üç farklı kemotip gözlenmiştir. Soğanlı dağından toplanan ve uçucu yağ verimi % 1.06 (v/w) olan örnek timol kemotipi göstermiştir. Uçucu yağda %23.1 timol, % 20.1 linalool, ve az miktarlarda  $\gamma$ -terpinen, *p*-simen, karvakrol bulunmuştur. Bayburt-Çaykara arasından toplanan ikinci örnek de timol kemotipi olup, % 50.1 timol, % 10.7 karvakrol, % 10.7 *p*-simen, az miktarda,  $\gamma$ -terpinen, metil karvakrol içerdiği rapor edilmiştir. Son örnek ise (linolool kemotipinde) ise % 21.6 linalool, % 16.7 terpinil asetat, % 11.2 geraniol ve az miktarlarda *p*-simen ve timol içermektedir (Başer, vd., 1999). Dolayısı ile bu çalışmada değerlendirilen *T. pseudopulgioides* örneğinin uçucu yağı timol kemotipindedir ve önceki çalışmalarla paralellik arz etmektedir.

*Thymus transcaucasicus* uçucu yağ içeriği de benzer şekilde timol ağırlıklıdır (%55 timol, %19,7 karvakrol, %6,7  $\gamma$ -terpinen ve %5,5 *p*-simen). Literatürde bitkinin uçucu yağı ile ilgili nispeten eski araştırmalara rastlanmıştır. Bu araştırmalardan birinde Ermenistan'dan toplanan örneklerde yağın ana bileşenleri olarak % 33.6 timol, % 12.8 linalool, % 11.7 karvakrol, daha az oranlarda terpinolen,  $\gamma$ -terpinen ve  $\beta$ -karyofillen'e rastlanmıştır (Kasimov, 1988). Araştırmacının aynı bitki ile yaptığı daha önceki çalışmalarına bakıldığında bu bitki türünün de kemotiplerinden bahsedilebilir (Stahl-Biskop, 2002). *T. transcaucasicus* bitkinin uçucu yağının da timol kemotipine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatürlerden elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde, aynı türe ait uçucu yağların içeriğinin az-çok farklılık gösterdiği görülmektedir. Aynı bitki türünden elde edilen uçucu yağlarda kimyasal kompozisyon yönünden farklılıkların bulunması iki ana sebebe dayanır.

Birinci sebep bitkinin genetik yapısından kaynaklanır. Buna göre *Thymus* türleri ürettikleri uçucu yağlar bakımından genetik polimorfizm gösterirler. Sonuçta farklı kemotipler ortaya çıkar. Uçucu yağların baskın bileşenlerinin epistatik kalıtım gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bulgulardan hareketle *Thymus* türleri uçucu yağında altı farklı kemotipten söz edilebilir. Bunlar geraniol (G),  $\alpha$ -terpineol (A), *tr*-sabinen hidrat ya da tujanol-4 (U), linalool (L), karvakrol (C) ve timoldür (T) (Thompson, 2002).

Aynı türün uçucu yağlarındaki kompozisyon farklılığı üzerindeki ikinci etken yağın elde edilme yöntemine (buhar distilasyonu, su distilasyonu, distilasyon cihazının tipi, uçucu bitkisel materyale) ve çevresel etmenlerin değişimine (yükseklik, sıcaklık, toprak yapısı, nem, toplama zamanı v.b.) bağlanabilmektedir (Perry vd., 1999; Karaman vd., 2001).

Ayrıca *Thymus* uçucu yağlarının kemotaksonomik işaretler olarak değerlendirilemeyeceği ve morfolojik benzerlik gösteren türlerin farklı uçucu yağ kompozisyonlarına sahip olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada numerik taksonomi sonuçları ile gösterilen dendrogramda, *T. praecox* ile *T. pseudopulegioides*'in bu cins içinde uzak akraba oldukları öne sürülmüştür (Akçin, 2006).

#### 4.2. Antioksidan Aktivite

Örneklerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili çalışmalar Bölüm 2'de açıklanan DPPH (2,2-difenilpikrilhidrazil) ve  $\beta$ -Karoten renk açılımı yöntemleri izlenerek gerçekleştirildi.

DPPH testlerinde hekzan özütlerinin ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* uçucu yağının süpürücü etkilerinin olmadığı tespit edildi. Aktivite gösteren özütlerin % inhibisyon değerlerinden yararlanılarak IC<sub>50</sub> değerleri Şekil 9, 10 ve 11'de verildi. En düşük derişimde IC<sub>50</sub> değerini sağlayan örneğin en yüksek aktivite gösterdiği olgusundan hareketle; *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus*'dan elde edilen uçucu yağların en yüksek aktivite gösterdiği sonucuna varıldı (sırasıyla; IC<sub>50</sub>: 2,3  $\mu$ g/ml ve IC<sub>50</sub> 20 $\mu$ g/ml). Ancak diğer tür *T. praecox* uçucu yağ örneğinde herhangi bir aktivite gözlenmedi.

Lamiaceae familyası üyelerinin baharat olarak yararlanılan çok sayıda türünün uçucu yağlarında serbest radikal giderici etkileri rapor edilmiştir. Bu hususta biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), adaçayı (*Salvia officinalis* L.), kekik (*Origanum spp.* ve *Thymus spp.*) bitkilerine dair ayrıntılı bir derleme literatürde mevcuttur (Yanishlieva, 2006).

Genel bir değerlendirme yapıldığında uçucu yağlardaki fenolik tabiiatta monoterpenlerin güçlü radikal temizleyici aktivite gösterdiği söylenebilir (Barrata, vd., 1998). Başta timol ve karvakrol olmak üzere oksijenlenmiş monoterpenlerin bu etkiden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Aeschbach, 1994). Timol ve karvakrolun test edildiği benzer bir çalışmada, her iki bileşiğin DPPH testlerinde güçlü aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Tepe vd. 2005). Ancak aynı makalede başta  $\alpha$ - ve  $\gamma$ -terpinen ile terpinolen olmak üzere diğer monoterpen hidrokarbonların da bu aktivitede göz önünde bulundurulması gerektiği vurgulanmıştır. (Tepe vd., 2005). Ancak monoterpen hidrokarbonlar, oksijenlenmiş olanlar kadar güçlü değildir. Aktivitede görülen bu davranış, moleküllerin aktive edilmiş metilen gruplarının varlığı ile açıklanabilir (Ruberto ve Barrata, 2000).

Çalışılan *Thymus* türünün uçucu yağları için de aynı durum geçerlidir. *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* uçucu yağlarında timol miktarı oldukça yüksektir (% 58 ve % 55). Karvakrol miktarı ise sırasıyla % 2.7 ve % 19.7. Ancak, burada anılan ilk türde daha yüksek radikal süpürücü etki ( $IC_{50}$ : 2,3  $\mu$ g/ml) tek başına bu bileşiklerin varlığı ile açıklanamaz. Dolayısı ile diğer bileşiklerin varlığı veya miktarları da aktiviteyi artırıcı veya azaltıcı etkide bulunabilir. Örneğin burada anılan ilk türde diğer ana bileşenler *p*-simen ve  $\gamma$ -terpinen miktarları sırasıyla, % 8.5 ve % 10 iken, *T. transcaucasicus* uçucu yağlarında bu bileşenler sırasıyla, % 5.5 ve % 6.7 dir. Buradaki bulgulardan hareketle artan monoterpen hidrokarbon miktarı, bir ölçüde radikal süpürücü etkiyi artırmaktadır ve daha önceki literatür bulgularıyla uyum içindedir (Ruberto ve Barrata, 2000, Tepe vd., 2005). Benzer durum aktivite tespit edilemeyen *T. praecox* uçucu yağı için de geçerlidir.

DPPH yöntemi ile radikal süpürücü etkileri değerlendirilen diğer örnekler arasında metanol özütü polar fazları da (su fazları) yüksek aktivite göstermiştir. Bir *Thymus* türü, *T. eigi* ile yapılan çalışmada da benzer özütleme yöntemi kullanılmış, hekzan ve su özütlerinin gallik asit eşdeğeri fenolik miktarları sırasıyla 110,0 ve 165  $\mu$ g/mg olarak hesaplanmıştır. Radikal süpürücü etkinin hekzan fazında yüksek olması beklenirken ( $IC_{50}$  144,60  $\mu$ g/ml), su fazının çok daha güçlü aktivite gösterdiği ( $IC_{50}$  16.80 $\mu$ g/ml ) rapor edilmiştir. Bu araştırmada da yorumlandığı gibi, fenolik içeriğin tek başına yeterli olmadığı, radikal süpürücü etkide polar (suda çözünen) fenoliklerin çok daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Tepe vd., 2004). Polar tabiatlı fenolik bileşiklerin serbest radikaller üzerinde güçlü süpürücü etkileri çeşitli makalelerde vurgulanmıştır (Komali vd., 1999; Moller vd., 1999; Vardar-Ünlü, 2002; Sökmen vd., 2004). Özellikle *T. vulgaris*' te ilk kez

gösterilen polifenollerin, rozmarinik asitin ve metoksillenmiş flavonoidlerin varlığı bu tip özütlerde güçlü antioksidatif etkinin sorumlusu olduğu rapor edilmiştir (Adzet vd., 1988; Lu ve Foo, 2001; Sökmen vd., 2004).

DPPH yöntemiyle yapılan test sonuçlarına göre çalışma kapsamındaki bitkilerin antioksidan özellikleri kıyaslandığında;

DPPH yöntemi sonucunda metanol özütü kloroform kısmı da radikal süpürücü aktivite göstermiş olsa da, uçucu yağ ve su fazları kadar güçlü değildir. Hekzan özütlerinde görülmeyen aktivite ile birlikte değerlendirildiğinde polar olmayan özüt ya da fraksiyonların radikal süpürücü etkilerinin ya hiç olmadığı ya da daha zayıf olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bazı *Origanum* ve *Thymus* türleri ile yapılan önceki çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir (Ünlü vd., 2002; Sökmen vd., 2004; Tepe vd., 2004a; Tepe vd., 2004b).

Diğer taraftan, lipid oksidasyonun önlenme derecesini göstermede önemli bir gösterge olan  $\beta$ -karoten renk açılım testi-spektrofotometrik yönteminde non-polar (hekzan ve kloroform) özütleri (fazları), uçucu yağ ve su örneklerine göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Çalışılan bitki özütlerinde en yüksek aktivite %79,45'lik inhibisyon değeriyle *T. pseudopulegioides*'in kloroform özütüne, en düşük aktivite ise %34,02'lik inhibisyon değeri ile *T. praecox* uçucu yağında tespit edilmiştir. Ancak burada hekzan ve kloroform özütlerinin sarı-yeşil renklerinin girişim yapma olasılığının da göz ardı edilmemesi gerekir. Besinlerde bozunmaya, dolayısı ile ciddi kayıplara yol açan lipid oksidasyonu gıda sektörünün ciddi bir sorunudur. Besinlerde kaliteyi ve güvenliği bozmadan, ikincil olarak ortaya çıkabilecek toksik yan ürünlerin oluşumuna sebebiyet vermeden güvenilir, sağlıklı ve doğal koruyuculara gerek duyulmaktadır. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere, araştırma kapsamındaki *Thymus* türlerinin lipofilik karakterdeki özütlerinde görünen oksidasyonu engelleyici özellik besin sektörü için bu bitkileri güçlü adaylar haline getirmiştir.

Literatürde diğer *Thymus* türlerinin antioksidan özellikleriyle ilgili birçok çalışma mevcuttur. Ancak, çalışma kapsamında değerlendirilen *Thymus* türlerinin antioksidan aktivitelerine dair herhangi bir literatür verisine ulaşılamamıştır. Dolayısı ile bu çalışmadan elde edilen antioksidan aktivite sonuçlarına dair verilerin yeni ve literatüre kazandırılabilir nitelikte olduğu söylenebilir.

### 4.3. Antimikrobiyal Aktivite

Çalışmanın bu kısmında, bitkilerden elde edilen özüt ve uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde Yapılan çalışmalar kısmında ayrıntılarıyla anlatılan yollar izlendi. Örneklerle ilgili, antimikrobiyal (antibakteriyal, antikandidal, antifungal) aktivitenin belirlenmesinde ilk olarak nitel bir test (agar kuyucuk difüzyon, disk difüzyon testleri) uygulanır. Bu çalışmada da özüt ve uçucu yağlar için disk difüzyon yöntemi uygulanarak, örneklerin antimikrobiyal aktiviteleri hakkında kabaca bilgi elde edilir. Elde edilen bu verilerin nicel olarak hesaplanması ve antibiyotiklerle karşılaştırılabilmesi için ilk basamakta aktivite gösteren özüt ve uçucu yağların minimum inhibe edici derişimi (MİK) hesaplanır. Bunun için özüt ve uçucu yağlara mikrowell dilüsyon yöntemi ya da agar dilüsyon yöntemi uygulanır. İlk yöntem bakterilere ve *Candida albicans*'a, ikinci yöntem ise mantarlara uygulanır. Bu çalışmada disk difüzyon yönteminde aktivite gösteren uçucu yağların MİK değerleri hesaplandı.

Literatürde çalışma kapsamındaki üç *Thymus* türünün antimikrobiyal (antibakteriyal, antikandidal, antifungal) aktiviteleriyle ilgili verilere rastlanmamıştır. Ancak diğer *Thymus* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleriyle ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, Marino ve arkadaşları (1999) *Thymus vulgaris* bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve bu yağın çalışıldığı bütün bakterilerde, özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde yüksek bakteriyostatik etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Şekeroğlu ve arkadaşları (2007) *T. praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisinin uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesini araştırmış ve bu uçucu yağın *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı güçlü antibakteriyal etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada *T. algeriensis* ve *T. ciliatus* bitkilerinin uçucu yağlarının antibakteriyal aktiviteleri araştırılmış ve *T. ciliatus* uçucu yağının güçlü antibakteriyal ve antifungal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu iki türün antibakteriyal etkisi arasındaki farkında *T. ciliata* uçucu yağındaki timol miktarının fazlalığından kaynaklandığını rapor etmişlerdir ( Amarti, vd., 2010).

Bulgular kısmında sunulan veriler değerlendirildiğinde çalışılan *Thymus* türlerinin non-polar (hekzan ve kloroform) özütlerinin ve polar (su) özütlerinin antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür. Antimikrobiyal ajanların hücre içinde aktivite gösterebilmeleri için hücre içine alınmaları gerektiği bilinmektedir. Hücre zarının yapısı dikkate alındığında, yağda çözünün bileşikler zardan daha kolay geçebilecek ve hücre içine

alınmaları daha kolay olacaktır (Özban, 1994). Uçucu yağların ve bu yağların monoterpen içeriklerinin mikroorganizma membran yapısı üzerindeki etki mekanizmasını aydınlatmak için yapılan araştırmalar, yağların lipofilik karakterlerinden dolayı hücre membranlarından kolaylıkla geçebildiğini ve membrana bağlı enzimleri inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Andrews, vd., 1980; Uribe, vd., 1985).

Çalışma kapsamındaki uçucu yağların antimikrobiyal testlerinden elde edilen veriler incelendiğinde (Bölüm 3), *T. pseudopulegioides* uçucu yağının mikroorganizmalara karşı daha etkili olduğu ve *Pseudomonas aeruginosa* haricinde bütün mikroorganizmaların bu uçucu yağa karşı duyarlı olduğu görülmektedir. *T. transcaucasicus* uçucu yağında *T. pseudopulegioides*'in uçucu yağı gibi *P. aeruginosa* haricindeki tüm mikroorganizmalara karşı aktivite göstermiştir fakat bu aktivite daha düşüktür. *T. praecox* uçucu yağı ise en zayıf aktiviteyi göstermiştir. *T. pseudopulegioides* uçucu yağı tüm test mantarlarına karşı (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*) çok güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. (MİK:3,125 µg/ml). Bu uçucu yağ en güçlü antibakteriyal aktiviteyi *P. vulgaris*'e (gram-negatif) karşı göstermiştir. (MİK:12,5 µg/ml). Gram-pozitif bakterilerde de duyarlılık gözlenmiş ve bu özütlere en duyarlı bakterinin *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir.

Uçucu yağlarının GK-KS ve GK-AİD analizleri yoluyla kimyasal kompozisyonlarının saptanması sonucu aktivite ile aktiviteden sorumlu olası bileşikler arasında bağlantı kurulabilir. Zira uçucu yağların bileşenleri, özellikle antimikrobiyal aktivitenin doğası üzerinde belirleyicidir. Bu bağlamda timol, karvakrol, sineol gibi terpenlerin bulunması ve miktarları antimikrobiyal aktivitede birincil derecede belirleyicidir (Sökmen, 2004). Sivropoulou ve arkadaşlarının (1996) yaptıkları çalışmada uçucu yağın içerdiği %  $\gamma$ -terpinen ve p-simen miktarının antimikrobiyal aktiviteye herhangi bir katkısının bulunmadığını, bunun yanında bu bileşiklerin biyosentetik ürünleri olan karvakrol ve timol bileşiklerinin *P.aeruginosa* hariç tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduklarını rapor etmişlerdir. Bunun yanında timol'ün antimikrobiyal aktivitesiyle ilgili yapılan çalışmalarda, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *E. aerogenes* ve *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir ( Burt, S., 2004; Dorman ve Deans 2000; Cosentina vd., 1999). Bu sonuçlar, araştırmamızda test edilen ve ana bileşeni timol olan uçucu yağların antimikrobiyal aktivitesini açıklamamıza yardımcı olacaktır. Çalışmamız kapsamında aktivitesi araştırılan uçucu yağlardan *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* bitkilerinin uçucu yağları *P.*

*aeruginosa* hariç diğer test mikroorganizmaları üzerinde etkili olmuştur. Bu sonuçlar yukarıda verilen bulgularla, antimikrobiyal aktivite yönünden benzerlik göstermektedir.

Amarti vd. (2010) antimikrobiyal aktivitenin yüksek olmasını timol miktarının fazla olmasına bağlamışlardır. Buna göre *T. pseudopulegioides* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olmasının nedeni, uçucu yağ içeriğine bakıldığında (Tablo 9) timol miktarının (%58) diğer bitkilerinden daha fazla olmasıdır. Yine *T. praecox* uçucu yağının aktivitesinin düşük olması, uçucu yağın içerdiği timol miktarının düşük olmasına bağlanabilir.

Birçok bitki türünden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmalarda gram-pozitif bakterilerin gram-negatiflere göre uçucu yağlarla etkileşimleri bakımından daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir (Juliano, vd., 2000; Delaquis, vd., 2002; Lambert, vd., 2001; Smith-Palmer, vd., 2001). Bazı araştırmalarda gram-negatif bakterilerin gram-pozitiflerden farklı olarak hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bir dış zara sahip olmaları, bu bakterilerin uçucu yağların antibakteriyal etkilerine karşı daha az duyarlı olmalarının nedeni olarak gösterilmiştir (Skocbušic, vd., 2006). Buna karşılık Deans ve arkadaşları bakterilerin uçucu yağlara karşı hassasiyeti üzerinde gram reaksiyonlarının çok az etkili olduğunu belirtmişlerdir (Deans ve Ritchie, 1987; Deans, vd., 1995). Bizim çalışmamızda gram-negatif bakterilerin gram-pozitif bakterilere göre, test edilen uçucu yağların aktivitelerine karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Delespaul ve arkadaşları (2000) çeşitli uçucu yağların antifungal aktivitelerini incelemiş, farklı funguslar üzerine uygulanan uçucu yağlardan oldukça iyi sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir. Özellikle *T. vulgaris* uçucu yağının orta derecede MİK değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Lambert, vd., 2001). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile Delespaul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri sonuçlar paralellik göstermemektedir. Aktivitelerini araştırdığımız üç *Thymus* türünden *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus*'un uçucu yağları, tüm test funguslarına karşı çok güçlü antifungal aktivite göstermişlerdir (MİK: 3,125-6,25 µg/ml). Yalnızca *T. transcaucasicus* uçucu yağı *Aspergillus sp.* fungusuna karşı orta derecede antifungal aktivite göstermiştir (MİK: 100 µg/ml).

Bu çalışmadan elde edilen bulgularla yukarıda verilen araştırmacılara ait veriler kıyaslandığında, genel anlamda bir paralellik olduğu görülmektedir. Bu da burada sunulan verilerin önceki çalışmaları destekler nitelikte olduğunu göstermektedir. Ancak özellikle



antifungal aktiviteler karşılaştırıldığında, önceki çalışmalarda elde edilen verilere göre bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçların farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmaya göre özellikle *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* uçucu yağları çok yüksek antifungal aktivite göstermiştir. Bunun yanında güçlü antimikrobiyal ve antikandidal aktiviteleri de gözlenmiştir fakat önceki verilerle çok büyük bir farklılık göze çarpmamaktadır.

#### 4.4. Antiviral Aktivite

Çalışmanın bu kısmında, bitkilerden elde edilen özütlerin antiviral aktivitelerinin belirlenmesinde Yapılan Çalışmalar kısmında ayrıntılarıyla anlatılan yollar izlendi. Antiviral etkileri belirlenen özütlerin, hücrelerin üremesi üzerindeki etkileri (toksisitesi) de araştırıldı selektivite indeksleri (SI) hesaplandı (Tablo 11 ve 12).

Antiviral aktiviteleri araştırılan *Thymus* türlerine ait özütlerin HSV'ye karşı aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Buna karşın, Influenza virüsüne karşı bazı özütlerin (özellikle hekzan özütlerinin) aktivite gösterdiği görülmüştür. Fakat aktivite gösteren özütlerin hücre üremesi üzerindeki etkilerine (Tablo 11) bakıldığında, toksisitelerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu demektir ki, özütler virüsleri öldürürken hücreler üzerinde de toksik etki göstermekte ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Bu özellikleri özütlerin antitümoral ajan olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak, Ulusal Kanser Enstitüsü (American National Cancer Institute)'ne göre, CC<sub>50</sub> değeri 30 µg/ml'den küçük ise özüt etkili antitümoral ve SI değeri 10 µg/ml'den düşük ise özüt etkisiz antiviral aktiviteye sahiptir. Verilen bu bilgilerle, çalışılan özütlerin CC<sub>50</sub> ve SI değerleri (Tablo 11 ve 12) karşılaştırıldığında, özütlerin antitümoral ve antiviral aktivite göstermediği görülmektedir.

Elde edilen verilere göre en yüksek SI değeri *T. praecox*'un hekzan özütünde Influenza virüsüne karşı gözlendi (2,5). Bu özütün 24,54 µg/ml'si ortamdaki virüs miktarının yarısını öldürmektedir. Bu değer iki katı da (49,08 µg/ml) ortamdaki bütün virüsleri öldürebilecek özüt miktarı olarak kabul edilir. Bu değer özütün yüksek antiviral aktivitesi olduğunu gösterebilir, MDCK hücreleri üzerindeki hücresel sitotoksitesine bakıldığında, hücrelerin %50'sini öldüren miktarın (55,74 µg/ml) virüslerin tamamını öldüren miktara çok yakın olduğu görülmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi kullanılan hekzan özütü virüslerin tamamını yok ederken, hücrelere de ciddi zarar vermekte ve

yaklaşık %50'sinin ölümüne yol açmaktadır. Bu sonuçlara göre, özütlerin yüksek antiviral aktivite göstermeleri, ciddi miktarda hücre ölümlerinin bir sonucu olarak görülebilir.

Araştırma kapsamında çalışılan *Thymus* türlerinin özütlerinin ve uçucu yağlarının antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral aktivitelerine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Bu bitkilerin uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri ile ilgili literatürde kısıtlı bilgiler mevcuttur (Başer, vd., 1996; Başer, vd., 1999a; Kasumov ve Gavrenkova,1985). Bu nedenle adı geçen bitkilere ait uçucu yağların ve özütlerin; antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteleri ölçülmüştür. Seçilen bitkilerle ilgili literatür yokluğu ve bitkilerin üyesi olduğu familyanın tıbbi değerlerinin bilinmesi, konunun orijinalliği yönünden oldukça ümit vericidir. Uçucu yağların kimyasal analizleri ile ilgili veriler ise konu hakkındaki kısıtlı ve nispeten eski bilgilere ek bilgi niteliğindedir.

## 5. SONUÇLAR

### Bitkilerin özüt ve uçucu yağ verimleri

1. Tez kapsamında değerlendirilen üç *Thymus* türünün toprak üstü kısımlarından metanol özütlemesiyle elde edilen kloroform fazı özüt verimlerinin %2,43 ile %4,66, su fazı özüt verimlerinin ise %10,03 ile %11,85 arasında olduğu belirlendi. Bu bitkilerin hekzan özütü verimleri ise %2,4 ile %3,12 arasında değişmektedir. Bitkilerin çiçek ve yaprak kısımlarından su distilasyonu yöntemiyle elde edilen uçucu yağ verimleri %0,49-0,98 arasında tespit edilmiştir.

### Antioksidan aktivite sonuçları

1. DPPH yöntemiyle çalışılan tüm su özütleri yüksek oranda serbest radikal temizleme özelliğine sahiptir ve en yüksek aktivitenin *T. pseudopulegioides* bitkisinden elde edilen su özütünde sahip olduğu gözlemlendi. DPPH yönteminde en yüksek radikal süpürücü etkiye *T. pseudopulegioides*'in uçucu yağı sahiptir. Bitkilerin kloroform özütlerinde düşük aktivite gözlenirken, hekzan özütlerinde aktivite ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* uçucu yağında aktivite gözlenmedi.
2.  $\beta$ -karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemi ile çalışılan bitki özütlerinde %BAA değerleri hesaplandı ve pozitif standart BHT ile karşılaştırıldı. Hekzan ve kloroform özütlerinde yüksek aktivite gözlemlendi. Buna göre bütün özütler içerisinde en yüksek aktivite *T. pseudopulegioides* bitkisinden elde edilen kloroform özütünde gözlemlendi. Su özütleri ve uçucu yağların aktivitesinin düşük olduğu saptandı.

### Antimikrobiyal aktivite sonuçları

1. Bitkilerden elde edilen kloroform, su ve hekzan özütleri test mikroorganizmaları üzerinde herhangi bir aktivite göstermedi. Uçucu yağların test mikroorganizmalar üzerinde etkili aktivitelerinin olduğu tespit edildi.
2. *T. pseudopulegioides* ve *T. transcaucasicus* bitkilerinin uçucu yağları, test mikroorganizmalarından *P.aeruginosa* hariç diğer tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bu uçucu yağlara karşı en duyarlı mikroorganizmalar *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.* ve *Aspergillus sp.* mantarlarıdır. *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* uçucu yağı 13 test mikroorganizmanın sadece 5'i üzerinde zayıf aktivite gösterdi (*A. baumannii*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.*).

3. *T. pseudopulegioides* uçucu yağı *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* ve *Fusarium sp.*'ye çok güçlü antifungal aktivite göstermiştir.
4. *T. transcaucasicus* uçucu yağı yüksek antikandidal ve antifungal aktiviteye sahiptir. *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* uçucu yağının zayıf antikandidal ve antifungal aktivitesi vardır. Bu uçucu yağ, *Aspergillus sp.* test mikroorganizmasına karşı aktivite göstermemiştir.

#### Uçucu yağların kimyasal içerik sonuçları

1. *T. pseudopulegioides* uçucu yağının kimyasal bileşenleri %98,5 oranında tanımlandı. Buna göre bu uçucu yağın ana bileşenleri; timol,  $\gamma$ -Terpinen, *p*-simen ve karvakrol metil eter'dir.
2. *T. transcaucasicus* uçucu yağının kimyasal bileşenleri %98,6 oranında tanımlandı. Buna göre uçucu yağın ana bileşenleri; timol, karvakrol,  $\gamma$ -terpinen ve *p*-simen'dir.
3. *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* uçucu yağının kimyasal bileşenleri %99 oranında tanımlandı. Buna göre uçucu yağın ana bileşenleri; timol, karvakrol,  $\gamma$ -terpinen ve *p*-simen'dir.

#### Antiviral test sonuçları

1. *T. pseudopulegioides*, *T. transcaucasicus* ve *T. praecox* subsp. *grossheimii* var. *grossheimii* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütlerinin anti-HSV ve Anti-Influenza A aktivite yönünden 'olumsuz' bulunmuşlardır. Bu bitkilerin uçucu yağları çalışılmamıştır.

## 6. ÖNERİLER

Halk arasında çok eski devirlerden beri tedavi amacıyla kullanılan, bugün yapılan çalışmalarla aydınlığa kavuşturulmuş, tat ve koku endüstrisinde, gıda sanayinde, parfümeri ve kozmetik sanayi dallarında ve bunlarla beraber farklı etkilere sahip olduklarından tedavide ve ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadırlar.

Bitkisel ürünler gıdaların bozulmaya karşı korunmasında, enfeksiyon hastalıklarının tedavi edilmesinde veya önlenmesinde alternatif olarak kullanılabilir. Bitkilerle yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında bitkilerin çeşitli organik çözücülerdeki özüt ve uçucu yağları antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmaktadır. Bitkisel özüt ve/veya uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri de özellikle ilaç ham maddesi ve kozmetik sektörlerinde büyük önem taşır.

Antioksidan aktivite testlerinde DPPH yöntemi bitki özütlerinin serbest radikal temizleme etkinliğinin bir ölçüsü iken B-karoten yöntemi oksidasyonu inhibe etme yeteneğini gösterir. Son çalışmalar, oksidatif yıkıma karşı savunmada ve kanser, damar tıkanıklığı gibi farklı insan hastalıklarında ve yaşlanma sürecinde korunmada bitkilerin antioksidan özelliklerinin de etkin olacağını göstermektedir. Aynı zamanda bu bitkilerde belirlenen lipit oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienlerin engellenmesi yiyecek endüstrisinde koruyucu olarak kullanımına olanak sağlar. Şunu da unutmamak gerekir ki antioksidanların yetersizliği gibi fazlalığı da organizmada hasara sebebiyet verebilir. Bu nedenle gerekli olan derişimlerin belirlenmesi önem taşımaktadır.

1- Bitkilerden elde edilen uçucu yağların güçlü antimikrobiyal özelliğe sahip olması, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı doğal antibiyotik olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Örneğin, güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *T. pseudopulegioides* uçucu yağı, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Fusarium* mantarlarının sebep olduğu hastalıklara karşı sentetik antibiyotiklerin yerine kullanılabilir. Ayrıca meyve, sebze ve diğer yiyecekler üzerinde bu mikroorganizmaların kontaminasyon oluşturması engellenebilir.

2- Tüm bu çalışmaların ışığında ve elde ettiğimiz verilerin sonucunda, örnekleme yaptığımız bitkilerin; antioksidan aktivite ve antimikrobiyal etki yönünden anlamlı bir değere sahip olduğu ve ileride daha detaylı tıbbi araştırmalara kaynak olabileceği söylenebilir. Çünkü araştırmalar göstermektedir ki, hem gün geçtikçe dirençli hale gelen

bakterilerle yaşamak zorunda olmak, hem de sürekli sağlıksız hale gelen yaşam tarzı, bitkilere olan ihtiyacımızı daha da anlamlı hale getirmektedir. Belki ileride bitkilerin bize sunduğu yararlara, bu tür antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral etkilerinin eklenmesi de olasılık dâhilindedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adzet, T. ve Martínez, F., 1981. Flavonoids in the leaves of *Thymus*: a chemotaxonomic Survey, Biochemical Systematics and Ecology, 9, 293–295.
- Agarwal, I. ve Mathela, C.S., 1979. Study of antifungal activity of some terpenoids. Indian Drugs Pharmaceutical Industry, 14, 19–21.
- Akçin, D.A., 2006. Numerical Taxonomic studies on some species of the genus *Thymus* L. (Labiatae) in turkey. Asian journal of plant sciences, 5, 5, 782-788, 1682-3974.
- Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları 15, 101-103, 123-126.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schroder, G. ve Lindequist, U., 2010. In vitro Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). Records of Natural Products, 4, 1, 49-63.
- Al-Jabri, A. A., Wigg, M. D. ve Oxford, J.S., 1995. Initial *in vitro* Screening of Drug Candidates for their Potential Antiviral Activities. In Virology Methods Manual. (Eds). Brian WJ Mahy and Hilaro Kangro. Academic Press. New York.
- Alscher, R.G. ve Hess, J.L., 1993. Antioxidants in Higher Plants, CRC Press, Boca Raton, 135–169.
- Alzoreky, N. S. ve Nakahara, K., 2003. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, International Journal of Food Microbiology, 80, 223–230.
- Amarowicz, R., Zegarska, Z., Rafalowski, R., vd., 2009. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. European Journal of Lipid Science And Technology, 111, 11, 1111-1117
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M. ve Chaouch, A., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. essential oils of Morocco. Biotechnologie agronomie societe et Environnement, 14, 1, 141-148
- Andrews, R. E., Parks, L. W. ve Spence, K. D., 1980. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 40, 301-304.
- Aruoma, O.I., Spencer, J.P., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J. ve Halliwell, B., 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs, Food Chemistry and Toxicology, 34, 449–456.

- Babovi, N, Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S. ve Zizovic, I., 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 1, 98-107
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M. ve Ruberto, G., 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. Journal of Essential Oil Research, 10, 618–627.
- Başer, K.H.C., Kirimer, N., Ermin, N., Özek, T. ve Tümen G. ,1996c. Composition of essential oils from three varieties of *Thymus praecox* Opiz growing in Turkey. Journal of Essential Oil Research, 8, 319–321.
- Başer, K.H.C., Kirimer, N., Tümen, G. ve Duman, H., 1998. Composition of the essential oil of *Thymus canoviridis* Jalas. Journal of Essential Oil Research, 10, 199–200.
- Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Ermin, N., Tümen, G. ve Malyer, H., 1999. Composition of the essential oil of *Thymus pseudopulegioides* Klokov et Des.-Shost. from Turkey. Journal of Essential Oil Research, 11, 86–88.
- Başer, K. H. C., <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c23/CI011069.pdf>, 2000.
- Başer, K.H.C., 2004. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Mayıs, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kirimer, Bildiriler Kitabı, 975, 94077, 2-8
- Bauer, K., Garbe, D. ve Surburg,H., 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim.
- Bayramoğlu, M. M., Toksoy M. ve Şen, G., 2009. Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti, II. Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi, Şubat, Isparta, Bildiriler Kitabı: 90-98.
- Baytop, T., 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. *A Dictionary of Vernacular Names of Wild*; Türk Dil Kurumları Yayınları: Ankara, 512 p.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul , 3.
- Betts, G.D., Linton, P. ve Betteridge, R.J., 1999. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. Food Control, 10, 27-33.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji (Özet Bakteriyoloji), Barış Yayınları, İzmir, 25.
- Borris, R. P., 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. Journal of Ethnopharmacology, 51, 29–38.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223.



- Chung, S.K., Osawa, T. ve Kawakishi, S., 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 61, 118–123.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. ve Palmas, F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29, 130.
- Coşkun, M. ve Özkan, A. M. G., 2005. Global phytochemistry: The Turkish Frame. Phytochemistry, 66: 956-960
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12, 4, 564–582
- Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Mat, A., Sanyer, G., Sütlüoınar, N.ve Meriçli, F., 2002. Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmokognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 1.
- Davis, P.H., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Supplement 1. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, 7, Univ. Press, Edinburg, 349.
- Deak, T. ve Beuchat, L. R., 1996. Handbook of food spoilage. New York, USA: CRC Press.
- Deans, S.G. ve Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology, 5, 165.
- Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W. ve Penzes, L.G., 1995. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merry. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. Flavour and Fragrance Journal, 60, 323.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. ve Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology, 74, 101.
- Delespaul, Q., Billerbeck, V.G., Roques, C.G. ve Michel, G., 2000. The Antifungal Activity of Essential Oil as Determined by Different Screening Methods. Journal of Essential Oil Research, 12, 256.
- Dorman, H. J. ve Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88, 308-316.
- Eryılmaz, B., 2001. *Capsicum annuum* (L.) *Solanaceae* meyvelerinin antioksidan

aktivite açısından değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. ve Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5294-5299.
- Frankel N.E., Huang, S., Aeschbach, R. ve Prior, E., 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1, 131-135.
- Farnsworth, R.L., 1985. Risk Management In Agriculture - Barry,Pj. American Journal Of Agricultural Economics, 67, 3, 693-693.
- Farnsworth, N. R., 1990. The role of the ethnopharmacology in drug development. In Bioactive Compounds from Plants, CIBA Foundation Symposium, 154, 2-21.
- Guenther, E., 1948. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York .
- Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A. ve Şahin, F., 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 3958-3965.
- Hamburger, M ve Hostetmann, K., 1991. M. Hamburger and K. Hostetmann, Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry, 30, 12, 3864–3884.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. ve Riley, T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of Applied Microbiology, 86, 985-990.
- Harborne, J.B. ve Williams, C.A., 1971. 6-Hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. Phytochemistry, 10, 367–378.
- Harborne, J.B., 1984. Phytochemical methods. 2<sup>nd</sup> edition. Chapman and Hall, London and New York. ISBN 0-412-25550-2., 288 pp.
- Herrmann, E.C. ve Kucera, L.S., 1967. Antiviral substances in plants of mint family (labiatae). 2. Nontannin polyphenol of *Melissa officinalis*. Blackwell Science Inc, 350 Main St, Malden, MA 02148 , 124, 3, 869.
- Hernández, L.M., Tomás-Barberán, F.A. ve Tomás-Lorente, F., 1987. A chemotaxonomic study of free flavone aglycones from some Iberian *Thymus* species. Biochemical Systematics and Ecology, 15, 61–67.

- Ho, C.T., Huang, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Shao, Y., Wei, G.J., Wang, M. ve Chin, C.K., 2000. Antioxidant and antitumor activity of rosemary leaves. Phytochemicals and Phytopharmaceuticals, 296-307.
- Hsieh, P.C., Mau, J.L. ve Huang, S.H., 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Food Microbiology , 8, 1, 35-43.
- Jalas, J., 1982. *Thymus* L. (Asteraceae). in: Davis PH, ed. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 7. Edinburgh: Edinburgh University Press, 349-382.
- Janssen, A. M., Tsai Ribe, W. H. R., Scheffer, J. J. C. ve Baerheim Svendsen, A., 1988. Citronellal and citronellol, a case of antimicrobial antagonism. Flavour and Fragrance Journal, 3, 137-140.
- Juliano, C., Mattana, A. ve Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia, Journal of Essential Oil Research, 12, 516.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U. ve Ilcim, A., 2001. Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 76, 183-186.
- Kasumov, F.Yu. ve Gavrenkova, S.I., 1985. *Thymus transcaucasicus* Ronn. Promising essential oil containing plant of Azerbaijan flora. Dokl. Akad. Nauk Az. SSR, 41, 56-59.
- Kasumov, F.Yu., 1988. Chemical composition of essential oils of Thyme species in the flora of Armenia. Chemistry of Natural Compounds. 21, 1, 121-122.
- Kırbağ, S. ve Bağcı E., 2000. *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma, Journal of Qafqaz University, III, I, 183-190.
- Kokkini, S., Karaousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. ve Lanaras, T., 1997. Autumn essential oils of Greek Oregano. Phytochemistry, 44, 883.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., de Groot, A. ve Evstatieva, L. N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods, Phytochemical Analysis, 13, 8-17.
- Könemann, 1999. The Illustrated A-Z of over 10,000 Garden Plants and How to Cultivate them. Botanica, Gordon, 885. Cheers Publication: Hong Kong.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P. ve Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91, 453.
- Lin, C.C., Cheng, H.Y., Yang, C.M. ve Lin, T.C., 2002. Antioxidant and antiviral activities of *Euphorbia thymifolia* L. Journal of Biomedical Sciences. 9, 656-664.

- Lis-Balchin, M., Ochoka, R.J., Deans, S.G., Asztemborska, M. ve Hart, S., 1999. Differences in bioactivity between the enantiomers of  $\alpha$ -pinene. Journal of Essential Oil Research, 11, 393.
- Lis-Balchin, M., 2006. Aromatherapy Science. A Guide for Healthcare professionals. Pharmaceutical pres. London. ISBN 0 85369 578 4. 462 p.
- Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G. ve Skolov, V.S., 1975. "Gerbstoffe" und Oxyzimtsaureabkömmlinge in Labiaten. Planta Medica, 27: 372-380.
- Lu, Y. R. ve Foo, L. Y., 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chemistry, 75, 197-202.
- Mantle, D., Anderton, J. G., Folkos, G., Barnes, M., Jones, P. ve Perry, E. K., 1998. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 121, 385-391.
- Marino, M., Bersani, C. ve Comi, G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bio-impedometric method. Journal of Food Protection, 62, 9, 1017.
- Mastelic, J. ve Jerkovic, I., 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry, 80, 135-140.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Breese, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., ve Tauxe, R. V., 1999. Food related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 607-625.
- Moerman, D. E., 1996. An analysis of the food plants and drug plants of native North America. Journal of Ethnopharmacology, 52, 1-22.
- Moldao-Martins, M., Bernardo-Gil, M. G., Beir-ao da Costa, M. L. ve Rouzet, M., 1999. Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* essential oil. Flavour Fragrance Journal, 14, 177-182.
- Morales, R., 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E. ve Saez, F., Eds., *Thyme The genus Thymus*. Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7., 14-55 p.
- Mulas, M., 2006. Traditional Uses of *Labiatae* in the Mediterranean Area. Workshop: Products from *Labiatae* an overview: uses, trade and quality International Symposium The *Labiatae*: Advances in Production, Biotechnology and Utilization February, Sanremo, Italy, *Bildiriler Kitabı*: 3.

- Nair, R., Kalariya, T. ve Chanda, S., 2005. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. Turkish Journal of Biology, 29, 41-47.
- Nedyalka, V., Yanishlievaa, E. ve Marinovaa, J. P., 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. European Journal of Lipid Science and Technology, 108, 776–793.
- Nguyen, D. V., Takacsova, M., Jakubic, T. ve Dang, M. N., 2000. Antioxidative effect of thyme in rapeseed oil. Biologia (Bratislava). 55, 277–281.
- Özban, N., 1994. Hücre. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, No. 231.
- Parnham, M.J. ve Kesselring, K., 1985. Rosmarinic acid. Drugs of the Future, 10, 756-757.
- Pavela, R., 2009. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Industrial Crops and Products, 30, 2, 311-315.
- Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGimpsey, J.A. ve Smallfield, B.M., 1999. Essential Oils from Dalmation Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons and Sites. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2048-2054.
- Principe, P. P., 1991. Valuing the biodiversity of medicinal plants. In Conservation of Medicinal Plants., eds. Akerele, O., Heywood, V. & Synge, H., 79-124. Cambridge: Cambridge University Press.
- Robert, P.A, 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> Edition”, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Roussel, J.L., Pellecuer, J. ve Andary, C., 1973. Propriétés antifongiques comparées des essences de trois labiées méditerranéennes: romarin, sarriette et thym. Trav. Soc. Pharm. Montp., 33, 587–592.
- Ruberto, G. ve Baratta, M. T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry, 69, 167–174.
- Sarı, A. O. ve Oğuz, B., 2002. Kekik. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayın No:108. ISBN:975-407-104-7, İzmir, 82 s.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk G., Bekat, L. ve Leblebici, E., 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematığı, 116 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 276.
- Sekeroğlu, N., Deveci, M., Buruk, CK, Gürbüz, B. ve İpek, A., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of Anzer tea essential oil. Journal of The Science of Food and Agriculture, 87, 7, 1424-1426.
- Serkedjieva, J. ve Hay, A.J., 1998. In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. Antiviral Research, 37, 221-230.

- Sezik, E. ve Basaran, A., 1986. The volatile oil of *Thymus argaeus* Boiss. et Bal. Acta Pharmaceutica Turc., 28, 93–98.
- Simeon de Bouchberg, M., Allegrini, J., Bessiere, C., Attisso, M., Passet, J. ve Granger, R., 1976. Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotype de *Thymus vulgaris* L. Riv. ital. EPPOS, 58, 527–536.
- Simonyan, A.V. ve Litvinenko, V.I., 1971. Flavone aglycones of some *Thymus* species from the Caucasus. Rast. Resur., 580–582.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T ve Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 120-1205.
- Skocbušić, M., Bezic, N. ve Dunkic, V., 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis.growing in Croatia. Food Chemistry, 96, 20.
- Smithpalmer, A., Stewart, J. ve Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters of Applied Microbiology, 26, 118–122.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. ve Fyfe, L., 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology, 18, 463.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 211-261.
- Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M. ve Sahin, F., 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control 15, 627–634.
- Sökmen, M., Angelovab, M., Krumovab, E., Pashovab, S., Ivanchevac, S., Sokmen,A. ve Serkedjieva, J., 2005. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. Life Sciences, 76, 2981 - 2993.
- Stahl-Biskup, E., 2002. Essential oil chemistry of the genus *Thymus* – a global view. *In: Thyme The genus Thymus* (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.). Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7., 88-137.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. Plant Physiology., Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 690 p.
- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atasu, E., Şener, B., Kurucu, S. ve Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Centaining Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an International Conference, Mayıs, Antalya.

- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, M., Polissio, M. ve Sokmen, A., 2004a. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Various Extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1132-1137.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M ve Sökmen,A., 2004b Antioxidative Activity of the Essential Oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. Journal of Food Engineering, 66, 447-454.
- Tepe,B., Daferera, D., Sokmen,M., Polissiou, M. ve Sokmen, A., 2004c. The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L var *bevanii*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 1389–1396.
- Thompson, J.D., 2002. Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme. *In: Thyme The genus Thymus (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.)*. Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7, 57-87 p.
- Tümen, G., Baser, K.H.C., Demirci, B. ve Ermin, N., 1998b. The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavourii* Velen. Flavour Fragr. J., 13, 65–67.
- Tümen, G., Yildiz, B., Kirimer N., Kürkcüoğlu, M. ve Baser, K.H.C., 1999. Composition of the essential oil of *Thymus fallax* Fisch. et Mey. from Turkey. Journal of Essential Oil Research, 11, 489–490.
- Uribe, S., Ramirez, T. ve Pena, A., 1985. Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane functions. Journal of Bacteriology, 161, 1195-1200.
- Ünlü, G.V., Candan, F., Sökmen,A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M.,Dönmez, E. ve Tepe, B., 2002, “ Antimicrobial and Antioxidant Activitiy of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. Et Mey. var. *pectinatus* (Lamiacee). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 63-67.
- Van den Broucke, C.O., Lemli, J.A. ve Lamy, J., 1983. Spasmolytic action of the flavones of different species of *Thymus*. Plants and Medicine: Phytotherapy, 16, 310–317.
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E. ve Tepe, B., 2003 Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 63-67.
- Vila, R., 2002. Flavonoids and further polyphenols in the genus *Thymus*– a global view. *In: Thyme The genus Thymus (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.)*. Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7, 156-189 p.

- Viuda-Martos, M., Navajas, Y.R., Zapata, E.S., Fernandez-Lopez, J. ve Perez-Alvarez, J.A., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. Flavour And Fragrance Journal , 25, 1, 13-19
- Xianfei, X., Xiaoqiang C., Shunying Z. ve Guolin Z., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. Food Chemistry, ( Article in press).
- Yıldız B., Tümen G., Demirkus, N., Adıgüzel, N., Akyalçın, H. ve Bahçecioglu, Z., 2004. Türkiye’de yetişen *Thymus* L. (Lamiaceae) Türlerinin Revizyonu ve Türler Üzerinde Palinolojik ve Kimyasal Araştırmalar, TBAG-1715 (198T003), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastırma Kurumu (TÜBİTAK), 20.
- Zambonelli, A., Zechini D’Aulerio, A., Bianchi, A. ve Albasani, A., 1996. Effect of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. Journal of Phytopathology, 144, 491.
- Zarzuolo, A. ve Crespo, E., 2002. The medicinal and non-medicinal uses of thyme. *In: Thyme The genus Thymus (EdS. Stahl-Biskup, E. ve Saez, F.)*. Taylor & Francis, ISBN 0-203-27289-7, 256-305 p.
- Zeybek, U. ve Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Degistirilmis 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir , 378.



## ÖZGEÇMİŞ

1984 Yılında Trabzon Beşikdüzü ilçesinde doğdu. İlköğretimini Beşikdüzü Merkez İlköğretim Okulunda tamamladı. Orta öğretimini Vakfıkebir Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanı Biyoloji öğretmenliği Bölümü'nden Mezun oldu 2007 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Anabilim dalında Tezli Yüksek Lisans eğitime başladı, Halen daha Tezli yüksek lisans eğitime devam etmektedir. Orta derece İngilizce bilmektedir.