

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANADOLU ÇAPRAZINA ÖZGÜ DÖRT *Thymus* L. (LAMIACEAE)
TÜRÜ UÇUCU YAĞININ KİMYASAL BİLEŞİMLERİ,
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÖZELLİKLERİ

DOKTORA TEZİ

SELMA ÇELEN

Balıkesir, Ağustos-2011

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANADOLU ÇAPRAZINA ÖZGÜ DÖRT *Thymus* L. (LAMIACEAE)
TÜRÜ UÇUCU YAĞININ KİMYASAL BİLEŞİMLERİ,
ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÖZELLİKLERİ

DOKTORA TEZİ

Selma ÇELEN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Dilek AZAZ

Sınav Tarihi: 05-08-2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. A. Dilek AZAZ (Danışman - BAÜ)

Prof. Dr. Bayram YILDIZ (BAÜ)

Prof. Dr. Münevver ARISOY (AÜ)

Prof. Dr. Kıymet GÜVEN (AÜ)

Doç. Dr. Turgut KILIÇ (BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun
nolu kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Ağustos-2011

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2009/22 Kodlu proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

ANADOLU ÇAPRAZINA ÖZGÜ DÖRT *Thymus* L. (LAMIACEAE) TÜRÜ UÇUCU YAĞININ KİMYASAL BİLEŞİMLERİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTE ÖZELLİKLERİ

Selma ÇELEN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

(Doktora Tezi/ Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Dilek AZAZ)

Balıkesir, 2011

Lamiaceae familyası Türkiye’de 45 cins, 546 tür (730 takson) ile temsil edilmektedir. *Thymus* cinsi ise 38 tür ile temsil edilmekte olup endemizm oranı % 47’dir. Anadolu çaprazının farklı lokalitelerinden toplanan *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var *pectinatus*, *T. spathulifolius* türlerinin toprak üstü kısımlarının hidrodistilasyon ile uçucu yağları elde edilerek GC ve GC/MS ile kimyasal bileşenleri belirlenmiştir. *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var *pectinatus* ve *T. spathulifolius* uçucu yağlarının ana bileşenleri sırasıyla kamfor (%16,6), 1,8-sineol (% 23,6), *p*-simen (% 23) ve karvakrol (% 49) olarak belirlenmiştir. Dört uçucu yağın ve ana bileşenlerinin; *Campylobacter Jejuni* ATCC 33291, *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherichia coli* ATCC 25292, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens* (klinik izolat), *Klebsiella pneumoniae* (klinik izolat), *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* (klinik izolat), *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* ve *P. lanosum*’a karşı antibakteriyel ve antifungal aktivite özellikleri belirlenmiştir. Bütün uçucu yağlar ve ana bileşenleri test bakterileri ve *Candida albicans* üzerinde üremeyi durdurucu etki gösterirken, mikrofunguslara karşı zayıf antifungal etki gösterdikleri saptanmıştır. Uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antioksidan aktivesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini metodu kullanarak belirlenmiştir. Test uçucu yağlarının antioksidan aktiviteleri BHA (bütillenmiş hidroksianisol)’ya göre daha düşük olarak belirlenmiştir. Bunun yanında test uçucu yağlarının doğal antioksidan olarak etkili olduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Thymus* sp./ uçucu yağ/ GC/MS/ Antibakteriyel aktivite/ Antifungal aktivite/ Antioksidan aktivite.

ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF FOUR *Thymus* L. (LAMIACEAE) SPECIES SPECIAL TO ANATOLIAN DIAGONAL

Selma ÇELEN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Ph. D. Thesis/Supervisor: Prof. Dr. A. Dilek AZAZ)

Balikesir, 2011

The family Lamiaceae is represented by 45 genera, 546 species and 730 taxa in Turkey. The genus *Thymus* is represented in turkey by 38 species, the ratio of endemism in the genus is 47 %. Aerial parts of *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var *pectinatus*, *T. spathulifolius* collected from different localities of Anatolian Diagonal were subjected to hydrodistillation to yield essential oils and analyzed by GC and GC/MS. The essential oils of *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var *pectinatus* and *T. spathulifolius* contained respectively camphor (16.6 %), 1,8-cineol (23.6 %), *p*-cymene (23 %) and carvacrol (49 %) as the main components. The antibacterial and antifungal activity of four essential oils and their main components was evaluated against *Campylobacter Jejuni* ATCC 33291, *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherichia coli* ATCC 25292, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens* (clinic isolate), *Klebsiella pneumoniae* (clinic isolate), *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* (clinic isolate), *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* and *P. lanosum*. All test bacteria and *Candida albicans* were inhibited by all the essential oils and their main components. The essential oils showed weak antifungal activity against all microfungi tested. Antioxidant activity of the essential oils and their main components was tested using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging method. The antioxidant activities of the tested essential oils were slightly lower than BHA (butylated hydroxyanisole), so the essential oils can be considered effective natural antioxidant.

KEY WORDS: *Thymus* sp/ Essential oil/ GC/MS analysis/ Antibacterial activity/ Antifungal activity/ Antioxidant activity

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR KELİMELELER	iv
ABSTRACT, KEY WORDS	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri	18
1.2 Bitkisel Materyalin Hazırlanması	22
1.2.1 Toplama	22
1.2.2 Kurutma	22
1.2.2.1 Güneşte Kurutma	23
1.2.2.2 Gölgede Kurutma	23
1.2.3 Saklama	23
1.3 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	24
1.3.1 Distilasyon Yöntemi	24
1.3.1.1 Su Distilasyonu	24
1.3.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu	25
1.3.1.3 Buhar Distilasyonu	25
1.3.1.4 Kuru Distilasyon	25
1.3.1.5 Hidrodifüzyon	26
1.3.2 Ekstraksiyon Yöntemi	26
1.3.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon	26
1.3.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon	27
1.3.2.3 Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon (SAE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu)	27
1.3.3 Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)	28
1.4 Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri	28
1.5 <i>Thymus</i> Cinsinin Genel Özellikleri	29
1.6 Türkiye’de Yetişen <i>Thymus</i> Türleri ve Yayılışları	30

2. MATERYAL VE METOT	32
2.1 Materyal	32
2.1.1 Bitkisel Materyal	32
2.1.1.1 Araştırmada Kullanılan <i>Thymus</i> Türlerinin Genel Özellikleri	33
2.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri	38
2.2 Metot	46
2.2.1 Bitkisel Materyalden Uçucu Yağ Elde Etme	46
2.2.2 Uçucu Yağların Bileşenlerinin Belirlenmesi	47
2.2.2.1 Gaz Kromatografisi	47
2.2.2.2. Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)	49
2.2.3 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel ve Antikandidal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	51
2.2.3.1 Agar Disk Difüzyon Metodu	51
2.2.3.2 Mikrobroth Dilüsyon Metodu	52
2.2.4 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	53
2.2.4.1 Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanması	53
2.2.4.2 Antifungal Aktivite Belirlenmesinde Agar Disk Difüzyon Metodu	54
2.2.4.3 Antifungal Aktivite Belirlenmesinde Mikrobroth Dilüsyon Metodu	54
2.2.4.4 Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrofunguslar Üzerindeki % İnhibisyon Değerlerinin Saptanması	55
2.2.5 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem	56
2.2.5.1 DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	56
2.2.6 İstatistik	56
3. BULGULAR	58
3.1 Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları	58
3.2 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	66
3.3 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları	72
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	74
5. EKLER	85
5.1 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Standartlar	85
6. KAYNAKLAR	90

KISALTMALAR

<u>Kısaltma Adı</u>	<u>Açıklama</u>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
TBHQ	Tersiyer Bütil Hidroksikinon
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
GC	Gaz kromatografisi
GC/MS	Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre (10^{-3} litre)
μ l	Mikrolitre (10^{-6} litre)
mm	Milimetre (10^{-3} metre)
mg	Miligram (10^{-3} gram)
MFK	Minimum Fungisid Konsantrasyonu
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
IC ₅₀	İnhibe edici konsantrasyonun yüzdesi
°C	Santigrat Derece
SAE	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
CO ₂	Karbondioksit
kg	Kilogram
cm ²	Santimetrekare
atm	Atmosfer

ATCC	American Type Culture Collection, U.S.A (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)
NRRL	Northern Regional Research Laboratory, U.S.A (Kuzey Bölgesi Araştırma Laboratuvarı)
FID	Flame Ionization Dedector (Alev İyonlaşmalı Dedektör)
m	Metre
dak.	Dakika
μg	Mikrogram (10^{-6} gram)
CFU	Koloni oluşturucu ünite
DMSO	Dimetil sülfoksit
RI	Retention Index (Tutunma İndeksi)

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Çalışmada kullanılan <i>Thymus</i> bitki örneklerinin toplandığı lokaliteler	33
Şekil 2.2	<i>Thymus convolutus</i>	34
Şekil 2.3	<i>Thymus haussknechtii</i>	35
Şekil 2.4	<i>Thymus. pectinatus var. pectinatus</i>	36
Şekil 2.5	<i>Thymus spathulifolius</i>	37
Şekil 2.6	Clevenger cihazı ve hidrodistilasyon yöntemiyle bitki örneğinden uçucu yağ elde edilişi	46
Şekil 2.7	Clevenger cihazının toplama ünitesinde biriken uçucu yağ	47
Şekil 3.1	<i>Thymus convolutus</i> uçucu yağının bileşenleri	65
Şekil 3.2	<i>Thymus haussknechtii</i> uçucu yağının bileşenleri	65
Şekil 3.3	<i>Thymus pectinatus var. pectinatus</i> uçucu yağının bileşenleri	65
Şekil 3.4	<i>Thymus spathulifolius</i> uçucu yağının bileşenleri	66
Şekil 3.5	<i>Thymus</i> uçucu yağlarının ve ana bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH üzerinden serbest radikal süpürme aktivitesi	72

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1	<i>Thymus convolutus</i> 'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri	59
Tablo 3.2	<i>Thymus haussknechtii</i> 'ye ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri	60
Tablo 3.3	<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i> 'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri	62
Tablo 3.4	<i>Thymus spathulifolius</i> 'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri	64
Tablo 3.5	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Agar Disk Difüzyon Metoduna Göre Antibakteriyel ve Antikandidal Aktiviteleri (mm)	67
Tablo 3.6	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrobroth Dilüsyon Metoduna Göre Antibakteriyel ve Antikandidal Aktiviteleri (MİK) ($\mu\text{g/ml}$)	68
Tablo 3.7	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Agar Disk Difüzyon Metoduna Göre Antifungal Aktiviteleri (mm)	69
Tablo 3.8	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrobroth Dilüsyon Metoduna Göre Antifungal Aktiviteleri (MİK) ($\mu\text{g/ml}$)	70
Tablo 3.9	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Aktiviteleri (% inhibisyon değerleri)	71
Tablo 3.10	Test Edilen <i>Thymus</i> Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenleri DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayinine Göre Antioksidan Aktiviteleri (% \pm SD)	73

ÖNSÖZ

Teze başlamadan önce yaptığımız ön çalışmada, *Thymus* türlerinin geleneksel tedavide önemli bir yere sahip olduklarını belirledik. Bu öngörüden yola çıkarak geleneksel tedavideki kullanım amaçlarına bilimsel nitelik kazandırmak amacıyla Anadolu çaprazına özgü dört *Thymus* türünün kimyasal kompozisyonunu, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini araştırmak istedik.

Lisanüstü çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, tecrübesini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve yanımda olan, çok değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. A. Dilek AZAZ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez izleme komisyonumda bulunan ve sunumlarıma özveriyle katılarak değerli görüşlerini bizimle paylaşan sayın jüri üyeleri, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Bayram YILDIZ ve Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Münevver ARISOY'a teşekkürlerimi sunarım. Bitkisel materyallerin toplanması ve teşhisinde yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Bayram YILDIZ'a, GC ve GC/MS analizlerinin yapılması ve yorumlanması konusunda yardımlarını gördüğüm Sayın Doç. Dr. Mine KÜRKCÜOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Zehra KÜÇÜKBAY'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Sayın Yrd. Doç. Dr. Onur TURHAN'a, tez süresince manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, sevgi ve güvenlerini benden esirgemeyen, eğitimim süresince bana her türlü olanağı sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

Balıkesir, 2011

Selma ÇELEN

GİRİŞ

İnsanların bitkileri hastalıkların tedavisinde kullanmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri erken dönem Çin, Hint ve Yakındoğu Medeniyetlerine kadar uzanmaktadır [1].

Bitkilerin hastalıkların tedavinde kullanışlarını tarif eden en eski eserler Çinlilerindir. Chen-Nung'un "Materia Medica" adlı eseri M.Ö. 3217 yılında yazılmıştır. Kitapta iki yüzün üzerinde tıbbi bitkiden söz edilmektedir [2, 3]. M.Ö. 3000 yıllarında Mezopotamya'da Sümerler, Akadlar ve Asurlulara ait medeniyetlerde de hastalıkların rahip hekimler tarafından sihir ve büyüün yanı sıra bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavi edilmeye çalışıldığı Ninova tabletlerinden öğrenilmiştir. Günümüze ulaşılan bilgilere göre, Mezopotamya uygarlığı döneminde bilinen bitkisel drogların miktarı 250 civarındadır [4]. Mısır'da M.Ö. 1550 ve daha eski zamanlarda yazılmış Papyrus Ebers de tıbbi bitkiler konusunda en eski ve en önemli belgelerdendir. Bu belge 77 kadar bitkisel, hayvansal ve madensel drog ve 800 den fazla reçete taşımaktadır [4].

Mısır ve Mezopotamya medeniyetlerinden etkilenecek oluşan Yunan uygarlığında da hastalıkların tedavisi ve bitkisel ilaçlar hakkında çok önemli kitaplar yazılmış ve bu eserler senelerce Avrupa ve özellikle İslam tıbbına temel teşkil etmiştir. Eski Yunan'da M.Ö. 460-377 yılları arasında yaşayan Hippocrate döneminde tıbbi bitkiler konusunda büyük adımlar atılmıştır. Hippocrate'ın tıpla ilgili 150 kadar eseri bulunmaktadır ve bu eserlerinde bulunan drogların miktarı 400 kadar olup bunların çoğunluğu bitkisel kökenli droglardan oluşmaktadır. Bunların yanında bitkilerin hastalıklara karşı ilaç olarak kullanımı, M.Ö. 5000 yıllarına kadar uzanmaktadır. Hakkari'nin güneyinde yer alan Şanidar Mağarası'nda ortaya çıkarılan Neanderthal mezarlar içinde bulunan ve halen bölgede tıbbi maksat için kullanılan bitki örnekleri, paleolitik çağdan beri bitkilerin bu amaçla kullanıldıklarını destekler niteliktedir [4].

Günümüzde sanayileşmiş ülkelerde hastalıklardan, bozulmalardan ve zararlı böceklerden; besi hayvanlarını ve gıdaları korumak için geleneksel yöntemlere yani bitkilere yeniden ilgi duyulduğu görülmektedir [5]. Sadece AB ülkelerinde tıbbi ve aromatik bitkiler pazarında yıllık %10 'luk bir büyüme sağlanmıştır [6].

Gelişmekte olan birçok ülkede insanların büyük bir kısmının birincil sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel tedavi yöntemlerine ve tıbbi bitkilere ağırlıklı olarak güvendiği belirtilmektedir. Aynı zamanda gelişmiş ülkelerde de birçok insan bitkisel ilaçları, alternatif ya da tamamlayıcı tedaviye dahil ederek kullanmaya başlamıştır [7]. Dünya sağlık örgütü (WHO) verileri geliştirmekte olan ülkelerde insanların %80 'inin bu tedavi yöntemlerini kullandığını ve 3,3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur [8].

Doksan bir ülkenin farmakopelerine ve tıbbi bitkiler üzerine yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak WHO'nun hazırladığı bir çalışma tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20000 civarında olduğunu gösteriyor. Bunlardan 500 kadarının üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçlarla kullanılan bitkilerin çok azı farmakopelerde (Kodeks) kayıtlıdır. Örneğin Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Halbuki halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı çok fazladır [4, 9].

Avrupa farmakopedisindeki ilaç hammaddelerin bazıları doğal kaynaklardan oluşmaktadır. Avrupa ülkelerinden Fransa, İsviçre ve özellikle Almanya'da bitkisel ilaçları modern tıpla birleştirmek için bir eğilim vardır [9]. Doğu Avrupa'da yer alan Romanya, Macaristan ve Bulgaristan gibi ülkelerde bitkilerle tedavi bir devlet politikası halindedir [10]. Avrupa'da en az 2000 tıbbi ve aromatik bitki türünün ticareti yapılmakta ve ayrıca bazı Avrupa ülkelerinde, tıbbi ve aromatik bitkiler tarımı yapılmaktadır. Özellikle Macaristan tıbbi ve aromatik bitki tarımında 40 bin hektarla ilk sırada yer almaktadır [6].

Hindistan yarımadasında modern tıbbın yanında, geleneksel tıptan da yararlanılır. Bu ülkede tıbbi bitkiler "Araştırma-Geliştirme Faaliyetleri" adı altında incelenmektedir. Uzakdoğu ülkelerinde de örneğin Japonya'da modern tıbbın

yanında bitkilerle tedaviye dayanan geleneksel Çin, Kore, Japon tedavi sistemleri yaygın bir şekilde uygulanmaktadır [11].

Amerika'da reçeteleşmiş ilaçların % 25 'i doğal ürünlerken, diğer bir % 25'de doğal ürünlerden hareketle türevleşen maddelerden oluşmaktadır. Rusya'da kullanılan ilaçların üçte birinden fazlası bitkisel kökenlidir [1].

Yirmi birinci yüzyıl da yalnız ilaç değil, doğal olmayan birçok yapay üründe yaşantımıza girmiş ve girmektedir. Hatta eskiden daha seyrek görülen ya da bilinmeyen birçok hastalığın insan yaşamını tehdit etmesinin nedeni sentetik maddelerde aranmaktadır [12].

Ayrıca insanoğlu hayatı boyunca yaşamın beraberinde getirdiği stres vb. zorlukları aşmak, hastalıklardan korunmak için, yaşamak için gerekli olmazsa olmazların yanında, takviye kuvvetler almak durumundadır. Bu tür koruyucu, engelleyici maddelere son zamanlarda önemi gittikçe artan antioksidan maddeler denir [13].

Antioksidanlar, otookside olabilir materyallerin oksidasyon başlangıcını geciktiren veya oksidasyon hızını azaltan maddelerdir. Gerek doğal ve gerekse sentetik yüzlerce bileşiğin antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [14].

Günümüzde besin desteği olarak beslenmede, koruyucu olarak gıda endüstrisinde ve kozmetik ürünlerde doğal antioksidanlara yönelim artmaktadır [13, 15, 16, 17].

Literatürlerde doğal maddelerin önemli antioksidan etki gösterdikleri ve bazen sentetik antioksidanlardan daha etkin olduklarına ilişkin çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bitkiler (yağlı tohumlar, tahıllar, sebzeler, meyveler, baharatlar ve çay), hayvansal ürünler (peptitler, amino asitler ve karotenoidler) ve enzimler (glutatiyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz) en önemli doğal antioksidan kaynakları arasında yer almaktadır [18].

Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir [19]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, antioksidan aktivite gösteren maddelerin oksidatif stresten dolayı meydana gelen katarakt, kanser, kalp-damar rahatsızlıkları, nörolojik rahatsızlıklar gibi birçok dejeneratif hastalıkların önlenmesinde önemli roller aldığını ortaya çıkarmıştır [20 - 24].

İnsan sağlığının korunması çok önemli bir konu olmakla birlikte ekonomik açıdan da önem arz etmektedir. Özellikle gıda ve kozmetikte doğal katkı maddelerinin kullanımına yönelik dünya genelindeki eğilim nedeniyle bitkilerde bulunan doğal antioksidanlara artan bir ilgi vardır [25].

Gıda endüstrisinde gıda maddelerinin depolanma karalılığını artırmak için çoğunlukla BHT (bütillenmiş hidroksitoluen), BHA (bütillenmiş hidroksianisol), TBHQ (tersiyer bütül hidroksikinon) ve propil galatlar gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar ucuz olmaları, yüksek düzeyde kararlılık ve güçlü antioksidan aktivite göstermelerinden dolayı tercih edilmektedirler [26, 27]. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların hoş olmayan tat ve kokulara sebep olduğu, toksisitelerinin bulunduğu ve en önemlisi kanserli hücre oluşumunu uyararak insan sağlığını olumsuz etkilediği belirlenmiştir. Bu yüzden bazı ülkelerde kullanımı sınırlanırken bazılarında yasaklanmıştır ve ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır [27 - 29]. Bu nedenle günümüzde özellikle bitkilerin doğal antioksidan kaynağı olarak kullanımı gündeme gelmiştir.

Batı toplumlarında doğal, daha az yapay katkılı yiyecek tüketmek isteyen “yeşil” tüketici akımı olmuştur [30]. Aynı zamanda “yeşil dalga”, “yeşil ilaç” adıyla anılan ilaç ve tedavide de doğaya dönüş akımı tüm Avrupa ve Amerika’da yayılmaktadır [31].

Sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin fazla olması antimikrobiyal olarak kullanılan sentetik ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnç oluşturmaları gibi sebepler doğal bitkisel kaynakların ve bu maddeleri taşıyan tıbbi bitkilerin önemini daha çok arttırmıştır [32].

WHO tanımlamasına göre “Bitkisel İlaç”, aktif içerik olarak bitkilerin toprak altı ve toprak üstü kısımlarını (çiçek, kabuk, kök, meyve, tohum, yaprak gibi) ya da başka bitkisel materyali veya bunların kombinasyonunu ham halde veya bitkisel preparatlar halinde taşıyan, günümüz ilaç endüstrisi teknolojisinin tüm gerek ve kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve etiketlenmiş tıbbi ürünlerdir. Bitkisel materyal usare, zamk, sabit veya uçucu yağlar ve bu yapıda diğer maddeleri kapsar. Kimyasal olarak tanımlanmış, etken maddelerle kombine edilmiş bitkisel materyal taşıyan ve bitkiden saf olarak izole edilmiş kimyasal madde içeren ürünler bitkisel ilaç olarak kabul edilmemektedir [1].

Bitkilerin temel yapı ve besin depo maddeleri olan primer metabolitler dışında, bir de bitkilerin hayatiyetleri bakımından mutlak gerekli olmayan ve bazen ölçülmeyecek düzeylerde olan uçucu yağlar, alkaloitler, glikozitler, flavanoitler, tanenler, renk maddeleri ve reçineler gibi küçük molekülü sekonder metabolitler bulunmaktadır. Sekonder metabolitler bakımından zengin olan bitkiler çoğunlukla tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alır. Bu bitkilerde asıl tıbbi etki, bu sekonder metabolitler tarafından meydana getirilmektedir [6].

Aromatik ve tıbbi bitkiler ve onların ekstraktlarının antiseptik özellikleri de eski çağlardan beri kaydedilmiş olmasına rağmen bu özelliklerinin laboratuvarlar da araştırılmaya başlanması 1900’lerin başlarında olmuştur [5]. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, bitkilerin sekonder metabolizma ürünü olan uçucu yağların, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antitoksijenik, antiviral, antiparazitik, antispasmodik, ekspektoral, antikarsinojenik, antidiyabetik, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü, insektisidal ve pestisit özellikler gösterdiği belirlenmiştir [33 - 47]. Bundan dolayı uçucu yağlar farmakolojide, eczacılıkta, fitopatolojide, tıbbi ve klinik mikrobiyolojide, koruyucu madde olarak gıdalarda ve ayrıca besin desteği olarak da kullanılmaktadır [5, 13, 48, 49].

Uçucu yağ terimi ilk kez 16. yüzyılda İsveçli tıp reformcusu olan Paracelsus von Hohenheim’in ilaçların etken bileşimini “Quinta essentia” olarak isimlendirmesiyle ortaya çıkmıştır [30]. Uçucu yağlar hemen hemen bütün kokulu bitkilerden distilasyonla izole edilebilen, genellikle oda sıcaklığında sıvı ve yağ

kıvamında, uçucu karışımlardır. Uçucu yağlar, bitkinin çiçeklerinden, tomurcuklarından, yapraklarından, dallarından, tohumlarından, meyvelerinden ve kökünden elde edilen aromatik yağlardır [5, 30, 50].

Günümüzde yaklaşık olarak 3000 çeşit uçucu yağ bilinmektedir ve bunlardan 300'ü ticari öneme sahiptir [51]. Avrupa'da uçucu yağlar, büyük oranda gıdalarda, parfümeride ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır [51 - 53]. Ayrıca; uçucu yağların kimyasal kompozisyonunu oluşturan bileşenlerin her biri gıdaların tatlandırılmasında kullanılmakta ve bitki materyalinden elde edilebilmelerinin yanı sıra sentetik olarak da doğal yapılarına uygun olarak laboratuvarlar da sentezlenmektedirler [54].

Uçucu yağların bakterisidal özellikleri, ilk kez deneysel olarak 1881' de Dela Croix tarafından belirlenmiştir [55]. Bununla beraber 19. ve 20. yüzyıllarda uçucu yağların tıp alanındaki kullanımında giderek artış gözlemlenmiştir [56].

Bitkilerin sekonder metabolizma ürünü olan uçucu yağlar halk arasında yemeklere tat ve koku vermek, yiyecekleri korumak ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bitki materyalleri içindeki yeni bileşenler tanımlandıkça, bunların antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri kanıtlanmış ve "geleneksel yiyecek koruma" yöntemlerinin yerini almaya başlamıştır. Uçucu yağların biyolojik yönden aktif olan birçok bileşik içerdiği ve bu bileşiklerinde birçoğunun antimikrobiyal özelliği, özellikle mikotoksin üreten funguslar gibi gıdaların bozulmasına sebep olan mikroorganizmalara karşı test edilmiş, ayrıca gıdalarda doğal antioksidan olarak kullanılmıştır [5, 30, 57 - 60].

Son yıllarda özellikle bitkilerin doğal antioksidan kaynağı olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Aromatik bitkilerin antioksidan aktivitesi yapılarındaki fenolik bileşiklerle ilişkilidir [61]. Bu bileşikler içerisinde en fazla bulunanları flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik terpenlerdir [62]. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet (tekli) oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır [63, 64]. Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbonhidrat, nükleik asitler) serbest radikallerce okside olmalarını

engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarda bulunan hidrojeni verebilmektedirler [65].

Bununla birlikte uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkiden uçucu yağı oluşturan bileşenlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir [66]. Uçucu yağların, antimikrobiyal özellik göstermesinin başlıca nedeni içerdikleri fenolik bileşiklerdir [67]. Bazı belirtiler ise minor bileşiklerin antibakteriyel aktivitede kritik role sahip olduklarını ve diğer bileşenlerle sinerjik etki oluşturmalarının mümkün olduğunu göstermektedir. Bu duruma *Salvia* sp., *Origanum vulgare* ve bazı *Thymus* türleri ile ilgili çalışmalarda rastlanılmıştır [68 -71].

Flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler çoğunlukla bitkinin yaprak, çiçek ve odunsu kısımlarında bulunmaktadır [72]. Bu nedenle, ekstraksiyon, destilasyon gibi yöntemlerle elde edilen uçucu yağ ekstraktları şeklinde kullanılmaktadır [73].

Uçucu yağların kompozisyon içeriğiyle ilgili önceki araştırmalarda uçucu yağ içeriğinin her zaman aynı kalitede belirlenmediği görülmektedir. Ancak son 30 yılda analitik metotların hızla gelişme göstermesiyle bu durum değişmiştir [74]. Uçucu yağların kompozisyonlarının içeriğinin belirlenmesinde gaz kromatografisi (GC) en çok uygulanan analitik tekniktir. Özellikle kütle spektrometresiyle birleştirilmiş gaz kromatografi – kütle spektrometre (GC-MS) analiz tekniğiyle günümüzde etkili uçucu yağ analizleri yapılmaktadır [74 - 78]. 1960'larda sadece uçucu yağların ana bileşenleri belirlenebiliyorken günümüzde GC, GC/MS gibi analitik teknikler geliştikçe kimyasal analizler kolaylaşmış ve bugün kimyasal maddelerin bileşiminin % 90-95 oranında tanımlanabilmeleri sağlanmıştır [74].

Uçucu yağlar 60 'tan fazla bileşen içerebilmektedirler [79, 80]. Uçucu yağ kompozisyonunun % 85 'inden fazlasını ana bileşenler oluşturmakta ve diğer bileşenler ise sadece eser miktarlarda bulunmaktadır [79, 81].

Bitkilerde uçucu yağ verimi ve kimyasal kompozisyon farklı faktörler nedeniyle önemli ölçüde değişebilir. Hem iç hem de dış faktörler göz önünde

bulundurulmalıdır. İç faktörleri genetik ve seksüel varyasyonların yanı sıra mevsimsel ve onto genetik varyasyonlar oluşturmaktadır. Dış faktörler ise coğrafik bölge, iklim, yükseklik, toprak, ışık gibi ekolojik ve çevresel etkiler olarak belirlenmiştir. Bunların yanında toplanma zamanlarına göre de farklılık gösterirler [60, 67, 71, 74, 76, 82, 83, 84].

Güney Fransa'dan toplanan *Thymus vulgaris* örneklerinin uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonları üzerine yapılan bir araştırmada *T. vulgaris* populasyonlarının detaylı kimyasal analizlerini incelemişler ve sonuç olarak uçucu yağ ana bileşenleri timol, karvakrol, tr-sabinenhidrat/terpinen-4-ol, α -terpineol, linalol ve geraniol olan 6 farklı kemotip gösterdiğini belirlemişlerdir. Fenolik kemotiplerin sıcak ve kuru bölgelerde, linalol ve α -terpineol kemotiplerin nemli iklimde, geraniol kemotipinin ise nemli ve soğuk bölgelerde yetişmesi bu kemotiplerin yayılma alanları ve iklim arasında bir korelasyon olduğunu ortaya çıkartmıştır [74].

Bitkilerden, hasat zamanı ya da çiçeklenme döneminden hemen sonra elde edilen uçucu yağların, genellikle güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [71, 84]. Ayrıca uçucu yağ bileşenlerinin enantiomerlerinin farklı büyüklüklerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [85].

Aynı bitkinin farklı bölümlerinden elde edilen uçucu yağların kompozisyonlarının da farklılık gösterdiği saptanmış ve örnek olarak *Coriandrum sativum* (kişniş) tohumlarından elde edilen uçucu yağ kompozisyonu ile aynı bitkinin olgunlaşmamış yapraklarından elde edilen uçucu yağ kompozisyonunun birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir [78].

Uçucu yağların kimyasal kompozisyonu yaprakların konumuna göre de farklılık gösterdiği yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Buna göre monoterpenoidlerin ve fenolik bileşiklerin daha çok bitkinin yan kısmında bulunan yapraklarda yoğun konsantrasyonlarda bulunduğunu alt ve en üst olgunlaşmış yapraklarda daha az bulunduğunu; menton ve pulegon gibi monoterpenoidlerin ise

tipik olarak genç ve yan yapraklarda yoğun olduğunu; mentolün ise olgun nane yapraklarında bulunduğunu bildirmişlerdir [86].

Bugün doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3 'ü uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağ taşıyan bitkiler daha çok sıcak iklim bölgelerinde yetişmektedir. Uçucu yağlar daha çok çiçekli bitkilerde bulunmaktadır. En fazla uçucu yağ içeren familyalar ise Pinaceae, Lamiaceae (Labiatae), Apiaceae (Umbelliferae), Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Asteraceae (Compositae), Piperaceae, Brassicaceae (Cruciferae), İridaceae, Verbenaceae ve Ranunculaceae olarak belirtilmiştir. Bu familyalara dahil uçucu yağ içeren pek çok tür bulunmaktadır [2, 50]. Günümüzde ticari amaçla üretimi yapılan uçucu yağ bitkilerinin sayısı 40 'ı geçmektedir. Özellikle bazı familyalar uçucu yağ taşıyan türleri nedeni ile önem kazanmıştır. Lamiaceae familyasında bulunan ve birçok Avrupa ülkesinde üretimi yapılan *Thymus* türleri, *Lavandula* türleri, *Mentha* türleri ve diğer bazı bitkiler değerli uçucu yağ kaynaklarıdır [50].

Lamiaceae kozmopolit bir familya olup, başta Akdeniz fitocoğrafik bölgesi olmak üzere yeryüzünün bütün bölgelerine yayılmış, 220 cins ve 3200 tür ile temsil edilmektedir. Bu familya, çok iyi bilinen ekonomik değeri yüksek otlar, çalılar ve ağaçlar içerir. Bunlar, Asya'nın tropik yağmur ormanlarında bulunan *Tectoma grandis* gibi kereste elde edilen ağaçlardan *Thymus*, *Salvia*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Lavandula*, *Sideritis*, *Satureja* gibi Akdeniz bölgesinin baharat, aromatik ve tıbbi önemi olan cinslere kadar değişir. Türkiye'de ise 45 cins ve 546 'dan fazla tür ile önemli familyalardandır. Familya üyelerinin çoğu uçucu yağ içermelerinden dolayı farmokoloji, parfümeri ve kozmetik sanayisi için önem arz etmektedir [50, 87 - 91].

Thymus cinsi de Lamiaceae familyasına ait uçucu yağ içeren bitkiler arasında olup, çok sayıda tür ve tür altı taksona sahiptir. Lamiacea familyasının tür sayısı bakımından en büyük 8 cinsinden biri *Thymus*'tur. *Thymus* türleri başta Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde olmak üzere Asya ve Avrupa kıtalarında ve Kuzey Afrika'da yayılış göstermektedir. Özellikle İspanya, Portekiz, Fransa, Cezayir, Tunus, İsrail,

Türkiye, İran ve Rusya'da yaygındır. Az da olsa Amerika kıtasında da bulunmaktadır [67, 87, 92].

Hipokrat ve Dioscoridis'in eserlerinde bulunan *Thymus* türleri Akdeniz bölgesinde tıbbi bitki olarak kullanılan ilk bitkilerdendir. *Thymus*'lardan elde edilen uçucu yağları eski Mısırlılar tıbbi amaç için, parfüm yapımında ve mumyalamada kullanmışlardır. Yunanlılar ve Romalılar da hastalıkların tedavisinde kullanmışlardır [93].

Günümüzde *Thymus* türlerinden dünya genelinde tıbbi alanlarda ve diğer alanlarda geniş ölçüde yararlanılmaktadır. *Thymus* uçucu yağlarından gıda sanayisinde çeşitli besinlerde, içeceklerde ve şekerlemelerde lezzet verici olarak, bunun yanında antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Parfümeri sanayisinde ise bu cinsten sabun ve losyonlara koku kazandırıcı olarak yararlanılmaktadır. *Thymus*, uçucu yağlarının antioksidan özelliklerinden dolayı beslenmede destekleyici olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca *Thymus* uçucu yağları antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antispazmodik, antitussif, ekspektoran, analjezik özelliklerinden dolayı tıp ve farmakoloji alanlarında da kullanılmaktadır [67, 93 – 98].

Thymus cinsine ait türler ülkemizde kekik ya da taş kekik olarak bilinmektedirler [99]. Kurutulan toprak üstü kısımları halk arasında bitkisel çay ve yemeklere aroma ve tat verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Thymus* cinsine ait türlerden şeker hastalığı tedavisinde, kan dolaşımının düzenlenmesinde, safra artırıcı, kurt düşürücü, soğuk algınlığı giderici, astım da nefes darlığı giderici ve iştah açıcı olarak halk ilacı şeklinde de yararlanılmaktadır [4, 100 - 102].

Dünya genelinde *Thymus* cinsinin 162 taksonunun uçucu yağ analizleri yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda *Thymus* türlerinin uçucu yağlarında 360 farklı bileşen saptanmıştır. Bu bileşenlerin % 75 'ini terpenler oluşturmaktadır. Terpenlerin ise % 43 'ünü monoterpenler, % 32 'sini de seskiterpenler oluşturmaktadır. Terpenoidlerin dışındaki bileşenlerin oranı düşüktür. *Thymus*

uçucu yağlarındaki diğer bileşenler çok düşük konsantrasyonlarda non-terpenoid alifatikler (% 17), basit benzen türevleri (% 6) ve fenilpropanoidler (% 2) dir [74].

Bitkiler aleminde monoterpenoid fenollerin en önemli kaynağı *Thymus* türleridir. Yapılan analizler sonucunda *Thymus*'larda yaklaşık 270 terpen olduğu saptanmış olmakla birlikte bunlardan 52 terpen özellikle bu terpenlerden de 34 tanesi *Thymus* cinsi için çok önemli uçucu bileşen olarak belirlenmiştir. Özellikle timol, karvakrol, linalool, *p*-simen, γ -terpinen, borneol, 1,8 sineol, geraniol *Thymus*'larda bulunan en önemli monoterpenlerdir [74]. Bu monoterpenlerden *p*-simen, γ -terpinen, timol ve karvakrol biyogenetik süreçlerde birbirleriyle yakından ilişkilidirler. *Thymus*'larda monoterpen hidrokarbonlardan *p*-simen ve γ -terpinen yüksek oranda olması timol ve karvakrol'un varlığından bağımsız olarak düşünülemez. Bunun nedeni bazı bileşenlerin kendi öncülerinden sentezlenmesi olarak açıklanabilir. *Thymus* ve *Origanum* türlerinde *p*-simen ve γ -terpinen bileşenleri timol ve karvakrol'un öncü maddeleridir [67, 74, 103]. Bu dört bileşenin, Yunanistan'ın farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Origanum vulgare* uçucu yağındaki miktarlarının toplamının hemen hemen eşit olduğu rapor edilmiştir [77, 104]. Aynı durum İtalya'dan toplanan *Thymus vulgaris*'lerin uçucu yağ kompozisyonları içinde rapor edilmiştir [71]. Bu durumu *p*-simen ve γ -terpinen, timol ve karvakrol'un biyolojik ve fonksiyonel olarak yakın ilişkide olduğu ve *T. vulgaris*'deki γ -terpinen'den *p*-simen aracılığıyla timol'un şekillendiği teorisinin desteklendiği rapor edilmiştir [104].

Thymus uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri üzerinde yapılan çalışmalarda antimikrobiyal ve antioksidan etkiden uçucu yağı oluşturan bileşenlerin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Chamberlain *Thymus*'ların antibakteriyel özelliğini kanıtlayan ilk araştırmacıdır. 1887'de Chamberlain *Thymus* buharının *Bacillus anthracis* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiğini gözlemlemiştir. Ondan sonra farklı *Thymus* türlerinin uçucu yağları ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır [93].

Son yıllarda *Thymus* uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu ve/veya biyolojik özellikleri hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Başer ve arkadaşları

(1996) *T. eigii* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas. bitki örneğinin hidrodistilasyon ile uçucu yağını elde etmişler ve GC ve GC-MS yöntemleriyle uçucu yağının içeriğini belirlemişler ve ana bileşeninin karvakrol (% 64,61) olduğunu rapor etmişlerdir [105].

Kabouche ve arkadaşları (2005) Constantine (Tunus) bölgesinde yetişen *Thymus numidicus* Poiret türünün bitki örneklerinin hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağını elde etmişler ve GC-MS yöntemiyle analizini yapmışlardır. *T. numidicus* uçucu yağının ana bileşenini timol (% 68,2) olarak belirlemişlerdir [96].

2002 yılında Hedhili ve arkadaşları Kobra (Tunus) bölgesinde doğal olarak yetişen *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et. Link türünün bir yıllık vejetasyon döngüsü boyunca her ay örneklerini toplamış ve bu örneklerin buhar distilasyonu yöntemiyle uçucu yağını elde etmişlerdir. Uçucu yağların analizlerini de GC ve GC-MS yöntemiyle belirlemişlerdir. Sonuç olarak uçucu yağın veriminde çiçeklenme döneminde (% 2 - 1,08) artış, dormansi döneminde (% 0,2) ise azalma gözlemlenmiştir. *T. capitatus* uçucu yağının bileşenlerinde de, vejetasyon döneminin farklı safhalarında değişiklikler gözlemlenmiştir. Çiçeklenme döneminde yüksek oranda karvakrol (% 71,8) içerdiğini, karvakrolun minimum olduğu zaman ise maksimum olarak *p*-simen'i belirlemişlerdir [94].

Başer ve arkadaşları (2002) *Thymus migricus* Klokov et Des.-Shost ve *Thymus fedtschenkoi* var. *handelii* (Ronniger) Jalas. türlerine ait bitki örneklerinin hidrodistilasyon ile uçucu yağlarını elde etmişler ve GC-MS ile de uçucu yağların analizini yapmışlardır. *T. fedtschenkoi* var. *handelii* uçucu yağının ana bileşenini linalool (% 13), dört farklı lokaliteden toplanan *T. migricus* örneklerinin uçucu yağlarının ana bileşenlerini iki örnekte karvakrol (% 36 – 37) diğer iki örnekte ise timol (% 36 – 44) olarak belirlemişlerdir [106].

Giordani ve arkadaşları (2004) *Thymus vulgaris* L.'in altı farklı kemotipi, *Satureja montana* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula hybrida* Reverchon, *Syzygium aromaticum* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L.'in uçucu yağlarının *Candida albicans*'ın üremesi üzerine etkilerini sıvı dilüsyon yöntemi

kullanılarak araştırmışlardır. Sonuçta *Candida albicans* 'a karşı en etkili uçucu yağın ana bileşeni timol (% 63,22) olan *T.vulgaris*'e ait olduğunu belirlemişler ve MİK değeri 0,016 µL/mL olarak saptamışlardır [107].

Rasooli ve Mirmostafa tarafından (2002) *Thymus pubescens* Boiss. ve *T. serpyllum* L.'un çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme dönemi uçucu yağlarının içeriği ile antibakteriyel özellikleri araştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre *T. pubescens*'in çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme döneminde uçucu yağının ana bileşenini timol (% 64,79 - 48,75) olarak belirlenirken, *T. serpyllum* türünde her iki dönemde de uçucu yağın ana bileşenlerini; - terpinen (% 21,90 - 22,69), *p*-simen (% 21,22 - 20,68) ve timol (% 18,73 - 18,68) olarak belirlemişlerdir. Ayrıca her iki *Thymus* türünde de çiçeklenmeden önce ve çiçeklenme dönemi uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitelerinin farklılık gösterdiğini saptamışlardır. *T. pubescens* ve *T. serpyllum* uçucu yağlarının farklı mikroorganizmalara karşı mikrobiyal inhibisyon zonlarını temel olarak 26 - 41 mm ve 15 - 40 mm arasında belirlemişlerdir [95].

Bağcı ve Başer (2005) Türkiyenin Doğu Anadolu Bölgesinden topladıkları *T. haussknechtii* Velen. ve *T. kotschyanus* Boiss. et Hohen var. *kotschyanus* taksonlarının uçucu yağlarını hidrodistilasyon ile elde etmişler ve GC/MS yöntemiyle analizini yapmışlardır. *T. haussknechtii* uçucu yağının ana bileşenini 1,8-sineol (% 21,5), *T. kotschyanus* var. *kotschyanus*'ta ise uçucu yağın ana bileşenini timol (% 47,5) olarak belirlemişlerdir [99].

Cosentino ve arkadaşları (1999) İtalya'nın Sardinia bölgesinden topladıkları  ve ticari olarak satılan bir *Thymus* rneğinden elde ettikleri uçucu yağların GC/MS ile kimyasal kompozisyonlarını belirlemişler ve ayrıca uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerini araştırmışlardır. alışmalarında Sardinia bölgesinden topladıkları *T. capitatus* (L.) Hoff. & Link. uçucu yağının ana bileşeni olarak timol (% 29,3) ve *p*-simen (% 26,4)'i ticari olarak satılan örnekte ise timol (% 46,1) ve -pinen (% 25,2)'i ana bileşen olarak rapor etmişlerdir. Sardinia'nın kuzeyinden topladıkları *T. herba-barona* Lois. uçucu yağında ise timol (% 50,3) ve *p*-simen (% 27,6), Sardinia'nın merkezinden topladıkları *T. herba-barona*'da ise timol (% 46,9) ve karvakrol (% 20,6)' ana bileşen olarak rapor etmişlerdir. Genellikle

örneklerden elde edilen uçucu yağların aynı mikroorganizmalara karşı benzer etki gösterdiğini fakat Sardinya'nın merkezinden toplanan *T. herba-barona*'nın uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi diğer örneklere göre daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. *Thymus herba-barona* özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı daha etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [67].

Rasooli ve arkadaşları (2006) İran Ulusal Botanik Bahçesin'den topladıkları *Thymus eriocalyx* (Ronniger) J alas ve *Thymus x-porlock* örneklerinin uçucu yağ içeriklerini GC ve GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve ayrıca uçucu yağların antifungal özelliklerini araştırmışlardır. *T. eriocalyx* uçucu yağının ana bileşenleri timol (% 63,8) ve β -fellandren (% 13,3) *T. x-porlock* uçucu yağının ana bileşenlerini ise β -fellandren (% 38,7) ve timol (% 31,7) olarak rapor etmişlerdir. *Aspergillus niger*'e karşı örneklerin uçucu yağlarının antifungal aktivitelerini, minimum inhibisyon (MİK) ve minimum fungisid (MFK) konsantrasyonlarını ve uçucu yağların fungisidal kinetiğini belirlemişlerdir. Sonuç olarak *T. eriocalyx* uçucu yağının, *T. x-porlock*'ın uçucu yağına göre daha düşük MİK/MFK değerlerine sahip olduğunu, fakat *T. eriocalyx* uçucu yağının *T. x-porlock*'ine göre fungus sporlarını daha yavaş şekilde öldürdüğünü rapor etmişlerdir [97].

Başer ve arkadaşları (1992) Eskişehir'in Bozdağ Atalantekke mevkisinden çiçeklenme döneminde toplanan *Thymus leucostomus* var. *argillaceus* uçucu yağının ana bileşenlerini GC ve GC/MS yöntemleri ile timol (% 27) ve karvakrol (% 22) olarak rapor etmişlerdir [108].

Başer ve arkadaşları (1996) Türkiye'nin farklı lokalitelerinden topladıkları *Thymus zygioides* var. *lycaonicus*'un dört kemotipinin uçucu yağ içeriklerini geraniol (% 68,55), karvakrol (% 48,14), α -terpinil asetat (% 36,18) ve timol (% 41,75 - % 57,18) olarak saptamışlardır [109].

Başer ve arkadaşları (1999) Çankırı Çallı köyünden *Thymus leucostomus* var. *gypsaceus* ve Malatya Arapkır bölgesinden topladıkları *Thymus pubescens* var. *cratericola* uçucu yağlarının bileşenlerinin kompozisyonunu GC/MS yöntemiyle

analiz etmişler ve *T. leucostomus* var. *gypsaceus* uçucu yağının ana bileşenlerini timol (% 33,2) ve borneol (% 22,2), *T. pubescens* var. *cratericola* uçucu yağının ana bileşenlerini de karvakrol (% 17,5), *p*-simen (% 16,4) ve timol (% 10,8) olduğunu belirlemişlerdir [110].

Tümen ve arkadaşları (1999) *Thymus fallax* türünden hidrodistilasyon ile elde ettikleri uçucu yağın içeriğini GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve karvakrolün (% 68,1) ana bileşen olduğunu rapor etmişlerdir [111].

Başer ve arkadaşları (1999) *Thymus zygioides* var. *zygioides* uçucu yağının GC/MS yöntemiyle içeriğini belirlemiş ve ana bileşenlerini linalol (% 33,7) ve (E)-nerolidol (% 12,5) olduğunu belirtmişlerdir [112].

Megalla ve arkadaşları (1980) *Thymus* uçucu yağlarını oluşturan bileşenlerin antimikrobiyal aktivitesi üzerinde çalışmışlar ve timol ve karvakrol'ün *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, üzerinde yüksek aktivite gösterirken, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini kamfor'un ise bu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada timol ve karvakrol'ün *Penicillium cyclopium*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus aegyptiacus*, *Trichoderma viride*'ye karşıda kamfor'a göre daha yüksek antifungal etki gösterdiği belirtmişlerdir [113].

Tullio ve arkadaşları *Thymus vulgaris* uçucu yağının filamentöz funguslar üzerindeki antifungal etkisini çalışmışlar ve *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. fumigatus*, *Penicillium lanosum*, *P. frequentans*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor* spp. ve *Rhizopus* spp. karşı *T vulgaris* uçucu yağının MİK değerleri 0,125 - 1 (% v/v) arasında belirlemişlerdir [114].

Bounatirou ve arkadaşları (2007) Tunus'ta farklı lokalitelerinden çiçeklenme dönemi öncesinde, çiçeklenme döneminde ve çiçeklenme döneminden sonra topladıkları *Thymus capitatus* örneklerinin uçucu yağ içeriklerini GC ve GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve ayrıca uçucu yağların antibakteriyel ve antioksidan

özelliklerini araştırmışlardır. *T. capitatus* örneklerinin uçucu yağ ana bileşenlerini karvakrol (% 83 - % 62), *p*-simen (% 17 - % 5), γ -terpinen (% 14 - % 2) ve β -karyofillen (% 4 - % 1) olarak belirtmişlerdir. Uçucu yağların antioksidan aktiviteleri 100 - 1000 mg l⁻¹ olarak rapor etmişlerdir. *T. capitatus* örneklerinin uçucu yağlarının *Basillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Listeria innocua*, dört farklı *Staphylococcus aureus* suşu ve methisillin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyal aktivitelerini disk difüzyon metodu kullanarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak çiçeklenme döneminde ve çiçeklenme döneminden sonra toplanan örnekler yüksek antibakteriyal etki göstermesine rağmen çiçeklenme döneminden önce toplanan örneklerin antibakteriyal özellik göstermediğini belirtmişlerdir [115].

Maksimović ve arkadaşlarının (2008) Sırbistan'ın kuzey bölgesinden topladıkları *Thymus pannonicus* bitki örneğinin uçucu yağ bileşenlerini GC ve GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve ana bileşenlerinin ve geranial (% 41,42) ve neral (% 29,61) olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca *T. pannonicus* uçucu yağının antimikrobiyal özelliklerini agar disk difüzyon ve mikrobrot dilüsyon yöntemleri kullanılarak *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (2 suş) ve *Candida albicans* (2 suş) üzerinde test etmişlerdir. Sonuç olarak *T. pannonicus* uçucu yağının *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* (MİK 50 µl/ml) karşı daha etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir [116].

Tepe ve arkadaşları (2005) Osmaniye, Düziçi'den *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve Sivas Kangal'dan topladıkları *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* örneklerinin hidrodistilasyon ile elde ettikleri uçucu yağın içeriğini GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* uçucu yağının ana bileşenlerini borneol (% 11,2), α -muurolol (% 9,2), β -karyofillen (% 7,6), geranial (% 7,3) ve neral (% 5,4) olarak, *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* uçucu yağının ana bileşenlerini ise karvakrol (% 58,1), timol (% 20,5), *p*-simen (% 4,1), γ -terpinen (% 4,4) olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca bitki örneklerinin uçucu yağlarının DPPH ve β -karoten/linoleik asit yöntemleriyle de antioksidan özelliklerini belirlemişlerdir. *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* ve *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* uçucu yağlarının serbest radikal süpürücü etkileri

yaklaşık olarak $IC_{50} = 220 \pm 0,5$ ve $2676 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ olarak rapor etmişlerdir. β -karoten/linoleik asit yöntemiyle elde ettikleri sonucunda ise *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* uçucu yağının oksidan linoleik asiti etkili bir şekilde inhibe ettiğini fakat *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* uçucu yağı ise linoleik aside karşı bir etki göstermediğini belirtmişlerdir [117].

Miguel ve arkadaşları (2004) Portekiz'den topladıkları *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* ve *Thymus mastichina* örneklerinin uçucu yağ bileşenlerini GC ve GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve *T. caespititius* uçucu yağı ana bileşenini α -terpineol (% 32), *T. mastichina* uçucu yağı ana bileşenini 1,8-sineol (% 58) ve *T. camphoratus*'un ana bileşenlerini ise linalool (% 17), linalil asetat (% 15), 1,8-sineol (% 11) olarak rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada TBARS yöntemiyle tüm uçucu yağların antioksidan özellik gösterdiğini bununla beraber *T. caespititius* uçucu yağının en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [118].

Azaz ve arkadaşları (2010) Hatay- Serinyol ve Hatay: Belen – Güzelyayla arasındaki *Pinus brutia* orman alanı açıklıklarından topladıkları *Thymus eigii* örneklerinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yöntemiyle elde ettikleri uçucu yağların antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini çalışmışlardır. Uçucu yağların bileşenlerini GC/MS yöntemiyle belirlemişler ve beyaz çiçekli *T. eigii* uçucu yağının ana bileşenleri karvakrol (%43.63), *p*-simen (%20.55) ve timol (%16.06), mor çiçekli *T. eigii* uçucu yağının ana bileşenleri ise geranilasetat (%15.66), *p*-simen (%14.62) ve timol (%11.48) olarak rapor etmişlerdir. Uygulanan antimikrobiyal aktivite testleri sonunda genel olarak test edilen her iki uçucu yağında benzer antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, uçucu yağların güçlü antibakteriyel etkiye sahip olmalarının yanında antifungal etkiye de sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca test edilen uçucu yağların DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini metodu kullanarak antioksidan aktivite özelliklerini belirlemişler ve antioksidan özelliklerinin sentetik antioksidan madde olan BHA'dan biraz daha az olduğunu rapor etmişlerdir [119].

Sarıkürkçü ve arkadaşları (2010) Muğla'dan çiçeklenme döneminde topladıkları *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis* bitki

örneğinin çeşitli ekstraktlarının ve uçucu yağının antioksidan aktivitelerini çalışmışlardır. Bitki örneğinden hidrodistilasyonla elde ettikleri uçucu yağın bileşenlerini GC ve GC/MS analiz yöntemleriyle belirlemişler ve ana bileşenlerini γ -terpinen (% 27,80), timol (% 27,65), ve *p*-simen (% 19,38) olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca DPPH, indirgeyici gücü belirleme, metal şelatlama ve β -karoten/linoleik asit yöntemlerini kullanarak *T. longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis* uçucu yağının ve ekstratlarının antioksidan aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir [120].

1.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, su buharı ile sürüklenebilen, kolaylıkla kristalleşebilen uçucu özellikte, kuvvetli kokulu, yağimsı karışımlardır. Birçok bitkilerin karakteristik kokuları, içerdikleri uçucu yağdan kaynaklanmaktadır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden bunlara uçucu yağ veya eterik yağ denilmektedir. Ayrıca su ile karışmadıklarından ve su yüzeyinde tabaka oluşturdıklarından, “yağ” adı ile anılırlar. Bunların yanında uçucu yağlar genellikle güzel kokulu olduklarından ve bir de parfüm sanayinde kullanıldıklarından “esans” da denilmektedir [50].

Uçucu yağlar bitkinin tamamında veya bitkinin belirli bir organında bazen de bir organın belirli dokularında da bulunabilmektedir. Bitkilerin bulunduğu familyalara göre salgı tüylerinde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve nadiren parankima dokusu içinde yayılmış olarak bulunurlar. Uçucu yağın bitkide ya doğrudan doğruya protoplazmada ya da hücre çeperinin özel bir tabakasında oluştuğu ileri sürülmekle birlikte glikozitlerin hidrolizi yoluyla da meydana gelebildiği belirlenmiştir [4, 6, 121, 122]. Birçok bitki sekonder metabolitler olan uçucu yağları normal büyüme ve gelişim dönemlerinde ya da patojen saldırılara karşı veya strese tepki olarak üretmektedir [33].

Uçucu yağların bitkilerde neden oluştuğu tam olarak aydınlatılamamıştır. Belki bitkinin yararsız metabolizma ürünlerinin atılmasında bir rol oynuyorlardır, yani detoksifikasyon ürünleridir. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözünmesini sağlarlar. Uçucu yağların böcekleri kaçırma ya da çekmek için oluştuğunu düşünenlerde vardır. Buna bağlı olarak ya bitkiyi korurlar ya da tozlaşmaya yardımcı olurlar. Uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle hayvanlar tarafından yenmediği de düşünülürse, bitkiyi koruduğu ve neslini sürdürmesine yardım edici özellikler taşıdığı söylenebilir [123, 6]. Bazı uçucu yağların yabancı ot tohumlarının çimlenmesi ve sürmesini engelleyerek, bitkilerin rahat gelişebileceği izole alan oluşturduğu düşünülmektedir. Bazı araştırmacılar da sıcak ve kurak iklim bölgelerinde yetişen bitkilerin uçucu yağ üreterek aşırı sıcaktan korunmaya çalıştığını bunun sebebinin de uçucu yağlar uçucu olma özelliklerinden dolayı, uçma anında bitkiden ısı çekerek serinlik etkisi oluşturması olarak açıklarlar. Belki de bu nedendir ki, sıcak iklim bölgelerinde serin iklim bölgelerine göre daha fazla uçucu yağ bitkisi bulunmaktadır [6].

Uçucu yağlar çoğunlukla renksiz olup, bazen açık sarı bazen de renkli (tıbbi papatya ve karanfil yağı gibi) olabilirler. Işık ve hava ile uzun süre temas ettiklerinde zamanla oksitlenirler ve reçineleşirler. Bu nedenle yağlar serin ve karanlık ortamlarda koyu renkli şişelerde saklanmalıdırlar [6]. Uçucu yağlar fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine genellikle benzerler ve genel olarak kırılma indisleri yüksektir. Optikçe aktifirler ve yağların polarize ışığı spesifik olarak çevirmeleri yağı tanıtmaya yarayan önemli özelliklerden birisidir, kırılma indisinde polarize ışığı çevirmede meydana gelen değişmeler, yağın saflığının bozulduğunu gösterir. Uçucu yağlardan elde edilen bazı maddelerin doğal ya da yapay yolla elde edildiğini, maddenin polarize ışığı çevirmesini saptamak suretiyle anlamak mümkündür. Uçucu yağlar su ile karışmayan maddeler oldukları halde, kokularının suya geçmesine yetecek oranda suda çözünürler. Tüm lipofilik çözücülerde iyi çözülürler. Örneğin; Petrol eteri, kloroform, benzol, eter, etanol iyi çözücüdürler [6, 31, 122, 124]. Bunların yanında son yıllarda uygun konsantrasyonlar da deterjan bazlı çözücüler de (Tween 80, Tween 20) kullanılmaktadır [125].

Uçucu yağlar kendilerine özel kuvvetli bir kokuya, tada ve renge sahiptirler. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağın kendine özgü kokusunu, tadını ve terapötik özelliğini verir. Uçucu yağlarda farmakognozi yönünden asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevlerdir. Genellikle uçucu yağlar yağ asidi-gliserol esteri yapısında olmadığından zamanla acılaşmaz. Genel olarak uçucu yağlar sudan hafiftirler, az bir kısmı sudan ağırdır. Örneğin; karanfil, tarçın, hardal uçucu yağı gibi [6, 50].

Uçucu yağlar sabit yağlardan bazı özellikleri ile ayrılabilir. Uçucu yağlar, su buharında sürüklenirken sabit yağlar su buharı ile sürüklenmez. Uçucu yağlar sabit yağlardan farklı olarak açıkta bırakıldıklarında buharlaşırlar ve buharlaştıktan sonra leke bırakmazlar, zamanla acılaşmazlar. Ancak ışık ve hava karşısında bir süre sonra oksitlenir ve reçineleşirler [6].

Uçucu yağları tanımak için bitkisel doku kesitlerinde ve drog tozlarında Sudan III boyası kullanılır. Bu boya uçucu ve sabit yağlara turuncu bir renk vermektedir. Kesitler bir süre ısıtıldığında ya da sulu etanol ile yıkandığında yağ damlacıkları kaybolursa uçucu yağ, kaybolmuyorsa sabit yağ olduğu anlaşılmaktadır [31].

Uçucu yağların kompozisyonlarının içeriği ise GC ve GC/MS analizleriyle belirlenebilir [74, 75, 76]. Gaz kromatografisi son yıllarda hızla gelişen ayırma yöntemlerinden birisidir. Hareketli fazın gaz, hareketsiz fazın sıvı olduğu ve dolayısıyla partiyon mekanizmasının rol oynadığı bu yöntem, uçucu yağların yapısındaki bileşiklerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Gaz kromatografisinde ayırım gerçekleştikten sonra kütle spektrometresinde her bir bileşenin spekturumları alınmalıdır. Her bileşiğin standart şartlarda bir kütle spektrumu olduğundan, bunların tanınmaları kolaylıkla mümkün olmaktadır [126].

Uçucu yağların kimyasal kompozisyonunu oluşturan bileşenleri, terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar ile azot ve kükürt taşıyan bileşikler diye dört grup altında toplayabiliriz [50].

Günümüze kadar uçucu yağların yapısında 2000 'den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu tespit edilmiş olup, bunların % 90 'ı terpenik maddelerin oluşturduğu belirlenmiştir. Bugün yapılarında 150 'den fazla monoterpen, 1000 kadar seskiterpen ile diterpenler bulunmuştur. Bunların yanında alkoller (benzil alkol, sinnamik alkol, sitronellol), organik asitler (asetik asit, benzoik asit, sinnamik asit), fenoller (karvakrol, kativol, timol), ketonlar (kafur, karvon, pulegon), aldehytlar (benzaldehit, sinnamik aldehit, sitral), esterler (benzil benzoat, bornil asetat, granil asetat), fenol esterleri (anetol, öjenol, safrol), ve diğer bileşikler (sülfür, nitrojen, kumarin) bulunmaktadır. [5, 31, 50, 121].

Uçucu yağların aromatik özellikleri koku ve tatlarına göre ayrılarak sınıflandırılabilir. Buna göre uçucu yağlar; çok kokulu ve tadı iyi olanlar "aromatika", kokulu fakat acı tadı olanlar "aromatika-aroma", kokulu ve tadı keskin olanlar "aromatika-acria" diye üç sınıfa ayrılabilir. [50].

Uçucu yağlar farmaside farmakolojik ve terapik etkilerine göre de gruplandırılır. Uçucu yağların nervinatik (sinir yatıştırıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), irritan (uyarıcı), ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü kesen), antiromatizmal, diüretik (idrara söktürücü), emmenagog (adet söktürücü), stomasik (mideyi), karminatif (gaz giderici), koleretik (safra sökücü), antihelmintik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik, antifungal, antioksidan ve sedatif etkilerine göre bir gruplandırmaya tabii tutulurlar [72, 74, 80].

Uçucu yağların çoğu toksik etki gösterir. Mukozayı tahriş eder, sinir sistemini uyuşturur. Toksik etki lipitlerde erimelerinden ve hücre içine girerek plazmayı bloke etmelerinden ileri gelir.

Uçucu yağların birden fazla maddeden oluştuğu dikkate alınır, aynı uçucu yağın değişik amaçlarla kullanılması da doğal sayılır. Bugün uçucu yağlar yerine, daha çok içindeki terpenik veya aromatik etken maddeler ilaç olarak kullanılmaktadır [124].

1.2 Bitkisel Materyalin Hazırlanması

Bilimsel amaçlar için kullanılacak bitkisel materyallerin deneylerden önce kullanım şekillerine uygun yöntemlerle hazırlanmaları gerekmektedir.

Tıbbi bitkilerin drog olarak kullanılan yaprak, çiçek, tohum, kök gibi kısımların içerdiği etkili bileşikler nedeniyle hastalıklara iyi geldiği belirtilmektedir. Bu etkili bileşikler; bitkilerde belirli hayat devrelerinde yapılmakta ve miktarı da belirli zamanlarda en yüksek düzeye erişmektedir. Drogun etkili bileşikler bakımından, mümkün olduğu kadar zengin olması istendiği için, bitkisel materyaller, drog etkili maddelerinin en yüksek olduğu dönemlerde toplanmalıdır. Bu da her drog için özel bir toplama, kurutma, saklama şekli ve zamanı bulunduğunu gösterir [4].

1.2.1 Toplama

Genellikle elle veya küçük aletler (makas) kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca elle toplama sırasında bitkinin ertesi yıl tekrar ürün vermesi için kökleme yapılmamalıdır. Uçucu yağlar sıcak hava ve güneşte buharlaşarak kaybolabileceğinden dolayı bu bitkiler genellikle erken saatlerde toplanırlar. Örneğin; güller sabahleyin ve iyice açmış halde iken, karanfiller 2 - 3 saat güneşte bekletildikten sonra toplanır. Yapraklar bitki çiçek açmaya başladığı zaman, çiçekler tamamen açılmadan önce veya tomurcuk halinde, toprak altı kısımları bitkinin toprak üstü kısımları kuruduktan sonra, kabuklar bitki yapraklarını döktükten sonra, meyve ve tohumlar özel kayıt yoksa olgunlaştıktan sonra toplanırlar [1, 4, 31, 50].

1.2.2 Kurutma

Toplanan bitkisel materyal, nadiren taze halde kullanılır. Bitkisel materyallerin içerdikleri etkin maddelerin değişime uğraması, bozulması veya yok

olmasını önlemek ve her an kullanılabilir bir durumda muhafaza etmek için kurutulmaları gerekmektedir.

Kurutma işlemi sırasında materyal ağırlığının ortalama % 75 'lik kısmını kaybettiği için kurutma materyalin taşınması ve depolanması yönünden de yararlıdır. Kurutma işlemi için seçilecek yol, kurutulacak materyalin cinsine ve taşıdığı etkili maddelerin durumuna göre yapılmalıdır. Yalnız enzimlerin en etkili olduğu sıcaklığın 35 – 50 °C arasında olduğunu düşünerek kurutma sırasında materyalin bu ısıda çok az bir süre kalmasına özellikle dikkat edilmelidir [4].

1.2.2.1 Güneşte Kurutma

Bitkisel materyal doğrudan doğruya güneşe serilerek kurutulması yöntemidir. Çok ekonomik ve kolay bir yöntem olmasına rağmen güneşe dayanabilen bitkisel materyal için kullanılabilir. Çiçekler için bu yöntem uygun değildir [4].

1.2.2.2 Gölgede Kurutma

Bitkisel materyalin üzeri kapalı ve yanları açık çardak, sundurma veya hangarlar içinde kurutulması yöntemidir. Burada malzeme doğrudan güneşe maruz kalmadan, açık havada kurutulmuş olur. Bitkisel materyal demetler halinde asılır veya ince tabaka halinde yere yada kurutma raflarına serilir ve küflenmeyi önlemek için sık sık alt üst edilir. Yaprak ve çiçek gibi suyunu kolaylıkla kaybeden materyal bu yöntem ile iyi şekilde kurutulur [4].

1.2.3 Saklama

Kurutulmuş olan bitkisel materyalin özelliklerini kaybetmeden, korunması için bazı koşullara uyulması gerekmektedir. Saklama sırasında rutubet, sıcaklık ve ışık drogun bozulmasına sebep olan etkenlerdir. Bunun için genel olarak drogların

serin, kuru ve karanlık bir yerde saklanması gerekir. Drog kese kağıdı, bez torba, mukavva kutu, teneke kutu veya cam kavanoz içinde saklanmalıdır. Plastik torbalar drogların muhafazası için uygun değildir kısa sürede küflenmeye neden olur. Kurutulmuş olan droglar, tedavi özelliklerini genellikle bir yıl muhafaza edebilmektedirler. [4].

1.3 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağlar bitkilerden, miktarlarına ve bileşenlerinin özelliklerine bağlı olarak ve diğer bir yönden de uçucu yağ elde edilecek bitki kısmına göre değişik şekillerde elde edilir [50].

1.3.1 Distilasyon Yöntemi

Distilasyon yöntemi, bitki materyallerindeki bütün uçucu maddeleri buharlaştırma ve yoğunlaştırma yoluyla ayırma yöntemidir. Bu yöntem ucuz ve kolay olup uçucu yağı kolaylıkla veren bitkiler için uygulanır [50].

Genellikle çiçekler doğrudan, yapraklar hafif ufalandıktan sonra, kök vs. ise küçük parçalara ayrıştırıldıktan sonra distile edilirler. Bitkiler çok ince toz haline getirilmemelidir. Portakal çiçeği, gül, lavanta, anason, karanfil, nane, kekik, adaçayı gibi bitkilerde bu yöntem uygulanır [50]. Uçucu yağların elde edilmesinde beş tip distilasyon yönteminden faydalanılır.

1.3.1.1 Su Distilasyonu

Kuru bitki materyali distilasyon aygıtı içinde sıcak su ile kaynatılır. Oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaştırılarak bir kapta toplanır. Kapta su ve yağ tabakası ayrılır ve uçucu yağ alınır. Geleneksel olarak uçucu yağ

üretiminde kullanılan imbikler ve laboratuvar tipi Clevenger aygıtı bu yöntem için kullanılır [6, 50].

1.3.1.2 Su ve Buhar Distilasyonu

Hem kuru hem de taze bitkisel materyale uygulanabilir. Bu metotta bitki doğrudan doğruya sıcak su ile değil, buharla temas etmektedir. Maserasyona tabi tutulmuş materyalden su buharı geçirilerek uçucu yağlar ayrıştırılır. Su buharı başka bir yerde elde edilir ve bir boru yardımıyla maseratin içine yöneltilir. Yüksek ısı ile parçalanma olasılığı böylece ortadan kalkmış olur. Su buharı ile sürüklenerek soğutucu ünitesine gelen uçucu yağlar yoğunlaşarak toplama kabında birikir [6, 50].

1.3.1.3 Buhar Distilasyonu

Daha çok taze bitki materyallerine uygulandığından ve bu taze materyal yeterince su taşıdığından materyal maserasyona tabi tutulmaz ve distilasyon kazanının ızgarası üzerine konan materyalin içersinden doğrudan sıcak su buharı geçirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltilen buhar, yağ damlacıklarını da beraber sürükleyerek toplama kabına getirir ve toplama kabında biriktirilir [6, 50].

1.3.1.4 Kuru Distilasyon

Bazı droglar kuru kuruya ısıtıldıkları zaman uçucu maddeler kısmen oldukları gibi kısmen de parçalanarak distile olurlar. "Pirojenasyon" adını alan bu işlem özel çelikten yapılmış imbiklerde uygulanır. Materyal odun ya da dal ise küçük parçalar halinde kazanlara doldurulur ve yüksek sıcaklıkta havasız ortamda kuru kuruya distile edilir. Distilasyon ürünleri soğutucudan geçirilerek toplama kabında toplanır [31].

1.3.1.5 Hidrodifüzyon

Bitkisel dokulardaki uçucu yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken, bir kısmı da iç kısımlarda bulunur. Yüzeğe yakın yerlerdeki uçucu yağ buhar ile almak kolaydır. Yüzeğe yakın olmayan bölgelerdeki uçucu yağ ise ancak difüzyon işleminden sonra yüzeye ulaşır.

Hidrodifüzyon işlemi endüstride normal buhar distilasyonunun aksine buharın bitkisel materyal dolu kazana üstten verilmesi ve alttan çıkan buharın yoğunlaştırılması şeklinde uygulanır. Hidrodifüzyonun getirdiği birtakım avantajlar vardır. Özellikle kazanın yüklenmesi ve boşaltılması işlemleri düşünüldüğünde kullanım kolaylığına sahiptir. Sadece düşük basınçta ıslak buhar kullanılır. Distilasyon süresi kısadır, daha az buhar harcadığı için daha az masraflıdır. Distilasyon süresinin kısa olmasından ve riflaks olayı gerçekleşmediğinden dolayı yağın bileşikleri hidrolize uğramazlar. Üretilen yağların fiziksel özellikleri standart değerlere uygunluk gösterir [121].

1.3.2 Ekstraksiyon Yöntemi

Bitkisel materyalden etken maddeleri elde etmek için çözücüler kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi kullanılan çözücü maddenin cinsine göre üç farklı şekilde yapılabilmektedir.

1.3.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon

Bitkisel materyal, uçucu yağı kolaylıkla çözebilen benzen, hekzan, petrol eteri, kloroform gibi kaynama noktası düşük organik çözücülerle eritilir. Organik çözücünün alçak basınçta uçurulması ile bir miktar (sabit yağ, boya maddeleri, mum vs.) yabancı madde içeren uçucu yağ elde edilir ki bu karışıma konkret denir. Konkret, önce alkolle muamele edilir ve sonra vakum distilasyonu ile alkol uçurulur.

Böylelikle absolü (absolute) adı verilen, pahalı ve kullanılması kolay bir yağ elde edilmiş olur [6, 126].

1.3.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon

Uçucu yağ miktarının az olduğu ve diğer distilasyon ve ekstraksiyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Bu yöntemde bitkisel materyal bir sabit yağ ile belli bir süre temasta bırakılır. Zamanla uçucu yağ sabit yağa geçer. Bu işlem soğuk yağ veya sıcak yağ ile yapılmaktadır. Özellikle parfümeri endüstrisinde kullanılan bir yöntemdir [6].

1.3.2.3 Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon (SAE: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu)

Gazlar yüksek basınç ve sıcaklık altında yani süperkritik evre bölgesinde bir sıvı gibi çözücü özellik kazanırlar. Bu özellik, basınç ve sıcaklık değişimleriyle istenildiği gibi yönlendirilmektedir. Böylece sıkıştırılmış gazlar, çeşitli yöntemlerle birçok maddenin taşıyıcı materyallerden fraksiyonlarına ayrılmasında veya madde karışımlarının rafinasyonunda kullanılabilir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilir. Ayrıca SAE hızı, süperkritik akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bir süperkritik akışkan, maddenin bastırılabilirdiği ve bir gaz olarak davrandığı halidir. Diğer bir deyişle, kritik sıcaklığının yukarısına ısıtılan ve aynı zamanda kritik basıncının yukarısına bastırılan bir gazdır. Kritik sıcaklığın yukarısında ısıtılan gaz, yavaşça artan basınçla süperkritik akışkanı oluşturur. Süperkritik ekstraksiyonda amonyak, etilen, toluen ve CO₂ genel olarak amaca uygunluk gösterir. Bunlar arasında en çok kullanılan süperkritik akışkan CO₂'dir. Çünkü CO₂, patlama tehlikesi ve toksik etkisi olmayan, bunun yanı sıra oldukça saf ve ucuz elde edilebilen, kimyasallara ve radyoaktif maddelere karşı kararlı, polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü

göstermesi gibi uygun kritik özelliklere sahip bir gazdır. CO₂'nin kritik noktası 73 kg/cm² atm basınçta, 31 °C'dir.

Bu yöntem esas olarak yüksek basınçlı ekstraksiyon kabı içinde sıvılaştırılmış gazın kritik noktası yakınlarındaki sirkülasyonu içerir. Ekstrenin çözücü gazdan ayrılması basıncın değiştirilmesi ile veya tamamen buharlaştırma ile mümkündür. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak yeniden kullanılabilir. Bu üretim sisteminin kurulması yüksek maliyetli olduğundan ancak pahalı ürünlerin eldesin de kullanılmaktadır [6, 31, 127].

1.3.3 Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)

Bazı droglardan distilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmek istendiğinde droglardaki uçucu yağ bozulmaktadır. Bu nedenle bu tip droglardan mekanik yöntemle yağ elde edilmektedir. Bu yolla genel olarak portakal, limon, bergamut ve mandalina gibi turunçgil meyve kabuklarından uçucu yağ elde etmeye uygundur. Mekanik yöntemle uçucu yağ elde etmek için preslerde sıkma veya benzeri cihazlar kullanılır. Bu şekilde elde edilen usareler genel olarak berrak değildir. Bu ekstreleri berraklaştırmak için; uygun bir filtreden süzülür santrifüj yapılarak içindeki partiküllerden ayrılır, alkol ilave edilerek veya ısıtılarak bulanıklık yapan maddeler uzaklaştırılır. Bu şekilde soğuk presle uçucu yağ elde edilir [6, 50].

1.4 Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri

Genellikle salgılı ve aromatik tek veya çok yıllık otsular, nadiren çalı ve ağaç formunda bitkilerdir. Gövde ve dallar dört köşeli veya değildir. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima karşılıklı, çiçek durumu brakte veya floral yaprakların koltuğunda taşınan vertisillastrum şeklindedir. Vertisillastrumlar spika, baş, rasemus veya simoz durumlar şekline düzenlenebilir. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik türlerde erkek organlar steril (işlevsel olarak dişi çiçek)'dir. Brakteeler yapraklara çok benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir.

Kaliks genellikle 3 dişli üst lop ve 2 dişli alt lop olmak üzere genellikle 5 lopludur, nadiren üst ve alt lop bölünmemiş ya da üst lop 1 alt lop 4 dişli, bazen kaliks aktinomorf, 5 - 20 arasında damar bulunur. Korolla birleşik, zigomorfik ve iki dudaklı, tüpsü, genellikle üst dudak belirsiz 2 loplu, dik yada falkat, az çok konkav, alt dudak 3 loplu, nadiren üst dudak indirgenmiş ve alt dudak 5 loplu, yada üstte 1 ve altta 4 loplu yada korolla aktinomorfiktir. Stamenler, korollaya bağlı, 4 ve didiman ya da 2, üstteki çift genellikle alttaki çiftten daha kısa, anter tekaları 2 ya da 1 gözlü, paralel ya da divergent, nadiren konnektiflerin uzaması ile birbirinden ayrılmıştır. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, 4 loplu, 2 karpelli ve ovüllü, anotrop, plasentasyon bazal veya eksenseldir. Stilus ginobazik, nadiren değil, tepede iki loplu. Meyve 4 nuksa ayrılan (nadiren daha az) bir şizokarpıdır [128].

Angiospermae subdivisio'sunun Magnoliopsida sınıfında yer alan Lamiaceae familyasının ülkemizde 45 cinsi ve 546 'dan fazla türü bulunmaktadır [90, 128].

1.5 *Thymus* Cinsinin Genel Özellikleri

Aromatik, çok yıllık yastık oluşturan, tabanda odunlu küçük çalimsı ya da sürünücü otsu bitkilerdir. Gövde tabanda otsu olup üstte dallanma gösterir, dallar sık uzun, enine kesitte dört köşeliden yuvarlağa kadar değişen şekillerde, her tarafı veya karşılıklı iki yüzeyi tüylüdür. Yaprak ayasının kenarları tam, revolut yada değil, sapsız ya da kısa saplı, çoğunlukla saptan ayanın kenarlarına doğru sili, 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 vertisillatlardadır. Brakteler yapraklara benzer ya da farklı. Brakteoller genellikle küçüktür. Kaliks belirgin bilabiat; tüp silindirikten, kampanulata kadar değişen şekillerde, 10 - 13 damarlı, boğaz kısmı sık beyaz tüylü, üst dudak 3 dişli, tüpten geniş, düz yada 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, yada açık pembeden mora kadar değişen renklerde, tüp şeklinde, kaliksten daha uzun, üst dudak emarginat \pm düz, alt dudak 3 loplu. Stamenler 4, hermafrodit çiçeklerde korolladan dışarı çıkar. Anterler birbirine

paralel veya divergent tekalı. Nutlet küçük, tüysüz. Bitki genellikle ginodioiktir [128].

1.6 Türkiye’de Yetişen *Thymus* Türleri ve Türkiye’de Bulunduğu Yerler

Ülkemizde tamamı çok yıllık olan *Thymus* cinsinin 38 türü kayıtlıdır. Ülkemizde yetişen bu türler aşağıda liste halinde verilmiştir. Bunlardan endemik olanlar (*) ile belirtilmiştir [129].

- *1. *T. 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. brachychilus* 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. zygoides* 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)

Halk arasında *Thymus* türlerinin tedavi amaçlı da kullanılmasına rağmen Türkiye’de *Thymus* türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ile ilgili yapılmış çalışmalar az sayıdadır [117, 119, 130, 131].

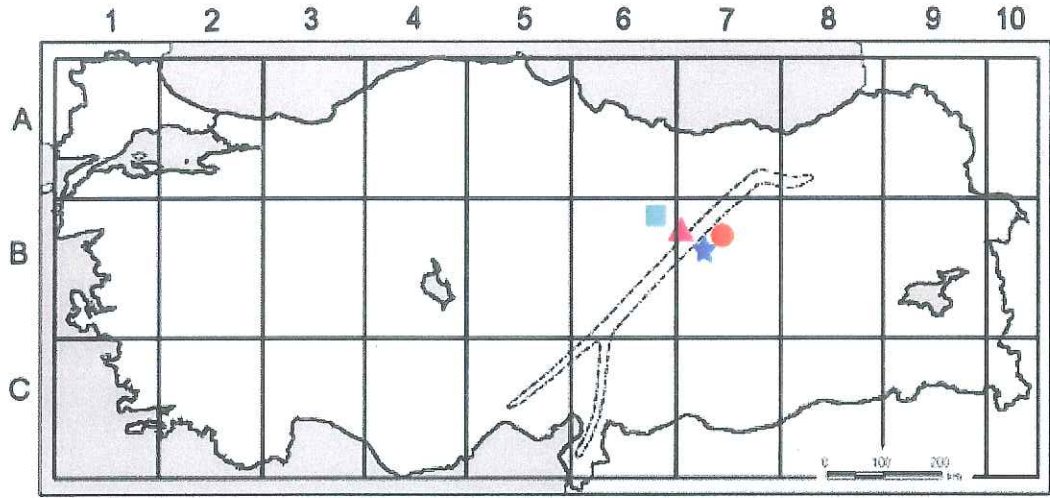
Bu araştırmada ile Anadolu çaprazından toplanan *Thymus* cinsine ait dört endemik tür olan *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var. *pectinatus*, *T. spathulifolius*’un uçucu yağ bileşenleri GC ve GC/MS ile belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağlarının ve ticari olarak sağlanan test uçucu yağlarının ana bileşenleri olan kamfor (Aldrich-sigma), 1,8 sineol (Aldrich-sigma), *p*-simen (Aldrich-sigma), karvakrol (Aldrich-sigma) ve timol’ün (Fluka) antibakteriyel, antikandida ve filamentöz funguslar üzerindeki antifungal özellikleri Agar Disk Difüzyon ve Mikrobrot Dilüsyon metotları kullanılarak belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda yer alan uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antioksidan özellikleri DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini metoduyla saptanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Araştırmamızda Anadolu Çaprazına özgü *Thymus* cinsine ait *T. convolutus* Klokov, *T. haussknechtii* Velen., *T. pectinatus* Fisch. & Mey. var. *pectinatus*, *T. spathulifolius* Haussk. & Velen.'un toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Anadolu Çaprazının farklı lokalitelerinden toplanan bitki örnekleri gölgede ve oda sıcaklığında 10 - 15 gün kurumaya bırakılmıştır (Şekil 2.1). Kuruma işlemi gerçekleştikten sonra bitki örnekleri 3 saat süreyle hidrodistilasyona tabi tutulup uçucu yağları elde edilmiş ve % yağ verimleri belirlenmiştir. *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. spathulifolius*'un herbaryum örnekleri Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesinde Biyoloji Bölümü'nde *T. pectinatus* var. *pectinatus*'un herbaryum örneği ise Cumhuriyet Üniversitesi Herbaryum'unda saklanmaktadır. Çalışmada kullanılan *Thymus* türlerine ait genel bilgiler ve uçucu yağ verimleri Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 'de verilmiştir.



Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan *Thymus* bitki örneklerinin toplandığı lokaliteler

★ : *T. convolutus*, ● : *T. haussknechtii*, ■ : *T. pectinatus* var. *pectinatus*, ▲ : *T. spathulifolius*

2.1.1.1 Araştırmada Kullanılan *Thymus* Türlerinin Genel Özellikleri

T. convolutus Klokov

Çapı 50 cm'ye ulaşan yastık oluşturan, yaşlı gövdeler odunlu, tabanda yaprak kalıntıları bulunan bitkiler, çiçekli genç gövdeler 10 – 20 cm, ince, kolay kırılır, geriye dönük tüylü. Yapraklar gövdeye basık, kenarları kuvvetle geriye kıvrık, birincil yapraklar 5 – 12 x 0,5 – 1 mm, lineer, nodyumlardan uzun, puberulent, yarıya kadar kısa silli, demet yapraklar kısa ve uzun tüylü, yağ damlacıkları seyrek, renksiz. Çiçek düzeni kapitat yapraklardan ayrılmamış ya da çok az ayrılmış, meyve evresine doğru çiçek sapı uzar ve çiçek düzeni belirgin hale gelir ve alt versiller ayrılır. Brakteler yapraklara benzer, genellikle çiçeklerden uzun, meyve evresinde çiçek eksenini uzadığından brakteler kısa kalır, tabanda ya da ortada hafif genişlemiş, 6 – 7 mm, puberulent. Brakteoller lineer, 2 – 2,5 mm, pediselden uzun. Kaliks 4,5 – 5,5 mm, genç evrede silindirik, meyve evresinde kampanulant, pilos. Korolla 5 – 6 mm, beyaz ya da gül rengi. Nutlet küresel, 1 x 1 mm, açık kahverengi, üzeri beyaz unsu madde ile örtülü. Kalker kayalıkları ve step alanlarda 1500 – 1700 m yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Haziran – Temmuz aylarıdır [129].



Şekil 2.2 *Thymus convolutus* (Foto B. Yıldız)

***T. haussknechtii* Velen**

Kısa boylu, tabanda kuvvetli odun yastık oluşturan bitkiler; verimli genç dallar zayıf, 3 - 10 (- 20) cm, kısa, geriye dönük tüylü. Yapraklar 5 – 10 x 1 – 2,5 mm, dar spatulat, soluk yeşil, etli, tüysüz, puberilos ya da skabrid, yağ damlacığı çok, renksiz, orta damar belirgin, yanal damarlar belirsiz, meyveli evrede yaprak koltuklarından yan sürgünler çıkar, tüm yaprakların kenarları düz, yarıya kadar silli. Çiçek düzeni seyrek az çiçekli başlıklar halinde, Kaliks, hermofradit çiçeklerde 4 – 5 mm, kampanulat, puberulent, kısa salgılı tüylü, yağ damlacıkları renksiz, üst dudak tüpten geniş, alt dudaktan uzun, üst dişler skabrid, ya da skabridolus, orta diş 1,5 mm, dişi çiçeklerde pubessentten villoza kadar, tüp dudaklara eşit, dudaklar eşit ya da alt dişler biraz uzun. Korolla beyaz, dişi çiçeklerde kalikse eşit ya da çok daha uzun, Meyve geniş ovat, 1 x 0,75 mm, koyu kahverengi, tüysüz yada uç kısmı beyaz tüylü. Volkanik alanlarda 1500 – 3000 m yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Haziran - Temmuz aylarıdır [129].



Şekil 2.3 *Thymus haussknechtii*

T. pectinatus* Fisch. & Mey. var. *pectinatus

Tabanda odunlu, sık yastık oluşturan bitkiler, çok dallı gövdeler 10 – 20 cm, geriye dönük kısa tüylü, alt kısmında yanal yaprak demetleri mevcut; tüm bitki sık, genç evrede sarımsı, olgunlukta koyu kırmızı yağ damlacıklı. Yapraklar 6 – 10 x 0,8 – 1 mm, genellikle gövdeye basık, etli, orta damarlar belirgin, yanal damarlar belirsiz, tabanda skabrid yada skabridulos, bazen seyrek silli, çiçek düzeni genellikle

kapitat, bazen ayrı vertisillatlar halinde. Brakte 4 – 5 x 1 mm, yapraklardan küçük, lanseolat – eliptik. Brakteol küçük, 1 mm kadar. Kaliks 3 – 4,5 mm, çan şeklinde, tüm yüzeyi hirsuta, tüp dudaklara eşit, dudaklar mor, üst dudak alt dişlerden kısa, üst dudağın orta dişi 0,3 – 0,6 mm, alt dişler subulat, taraksı silli ve kısa zayıf tüylü. Korolla gül kırmızısı, bazen beyaz, 5 – 8 mm, hirsut. Yapraklar, siller hariç tüysüz. Jipsli alanlarda 1300 – 1400 m. Yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Temmuz – Ağustos aylarıdır [129].



Şekil 2.4 *Thymus. pectinatus* var. *pectinatus* (Foto B.Yıldız)

***T. spathulifolius* Haussk. & Velen**

Yastık oluşturan tabanda kuvvetli odunlu, yarı çalimsı bitkiler. Bitkinin tüm organları gümüşü renkli, kısa sık puberulent; çiçekli dallar 5 – 10 cm. Yapraklar 5 – 7 x 1 – 1,3 mm, spatulat, belirsiz, silli değil. Çiçekler braktelerin koltuklarından 1- 2

adet. Brakteler yapraklara benzer, 7 x 1,2 mm, brakteol belirsiz, 1 mm'den kısa. Pedisel 2 – 3 mm, Kaliks 4 – 5 mm, tp silindirik – kampanulat, dudaklardan uzun, alt dişler üst dudaktan uzun, üst dudağın orta dişi 0,5 mm. Korolla 6 - 7 mm, mor, dış yüzeyi seyrek villos. Jipsli alanlarda 1300 - 1500 m. yükseklikte yetişir. Çiçeklenme dönemi Haziran – Temmuz aylarıdır [129].



şekil 2.5 *Thymus spathulifolius* (Foto B. Yıldız)

2.1.2 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Çalışmada maya formundaki insan patojeni *Candida albicans* (klinik izolat), *Candida albicans* ATCC 10231, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Enterobacter aerogenes* NRRL 3567, *Escherchia coli* ATCC 25292, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Proteus vulgaris* NRRL 123, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens* (klinik izolat) ve *Klebsiella pneumoniae* (klinik izolat) bakterileri ve *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum* ve *P. lanosum* mikrofungusları kullanılmıştır. Antifungal aktivite testlerinde kullanılan saprofitik mikrofunguslar laboratuvarımızda topraktan izole edilmiş ve teşhisleri Prof. Dr. A. Dilek Azaz tarafından yapılmıştır. Test mikroorganizmalarına ait stok kültürler Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde saklanmaktadır.

***Campylobacter jejuni*:** *Campylobacter*'ler gram negatif, spor oluşturmeyen, 0,2 - 0,5 µm eninde 1,5 - 5 µm boyunda, kıvrık, S veya spiral şeklinde, hareketlidir. Mikroaerofilik bir bakteridir. Üreme sıcaklığı optimum 42 °C'dir. *Campylobacter jejuni* kanatlı hayvanların sindirim sisteminin normal bir sakini. *Campylobacter*, en çok kanatlı hayvan, domuz, çiğ midyeler ve diğer kabuklu deniz hayvanları gibi kontamine gıdalar veya klorlamaya maruz kalmamış yüzey sularıyla geçmektedir. *C. jejuni* insanlarda *Campylobacter* enterite yol açar ve en sık görülen belirtileri ishal, halsizlik, ateş ve karın ağrısıdır. *C. jejuni* enfeksiyonlarından birkaç hafta sonra HLA-B27 doku grubu antijeni taşıyan kişilerde reaktif artrit oluşabilir. Hepatit, interstiyel nefrit ve hemolitik üremik sendrom diğer komplikasyonlarıdır. *C. jejuni* enfeksiyonlarının başka bir komplikasyonu Guillan-Barré sendromudur (GBS). GBS'lu olguların % 10 - % 30 'u *C. jejuni* enfeksiyonlarından sonra gelişmektedir. *Campylobacter*'ler ampisiline, tetrasikline ve kanamisine %10-15 oranında dirençlidir. Genellikle kloramfenikole, eritromisine, gentamisine, furazolidona, nalidiksik aside ve floraokinolonlara duyarlıdırlar [132, 133].

Enterobacter aerogenes: *Enterobacter* cinsindeki bakteriler, düz, gram negatif, fakültatif anaerop, spor oluşturmeyen, basil şeklindedir. *Enterobacter aerogenes*, tabiatta çok yaygın olan, toprak, su, tahıllar ve aynı zamanda insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan nonfekal koliform bir bakteridir. Fırsatçı patojen özellik göstererek yeni doğan ve prematüre bebeklerde, bağışıklık sistemi zayıf ve baskılanmış hastalarda, idrar yolları, üst solunum yolları, yara ve yanık enfeksiyonları, menenjit olmak üzere çeşitli hastalıklar oluşturur. Son zamanlarda *Enterobacter*'lerin giderek artan oranlarda hastane enfeksiyonları yaptıkları bildirilmektedir. *Enterobacter aerogenes* sefolotin'e dirençli, karbenisilin ve sefotaksim gibi antibiyotiklere nispeten duyarlıdır [134 - 136].

Escherichia coli: Memelilerin ve kuşların bağırsak florasında bulunur. 2 - 6 µm boyunda, 1,0 - 1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak basil şeklinde gram-negatif bakterilerdir. Fakültatif anaerop olup, optimum üreme sıcaklığı 37 °C'dir. İnsan normal bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge halinde kaldığı sürece hastalık yapmaz. Normal şartlarda kokuşma (putrifikasyon) / mayalaşma (fermantasyon) dengesinin düzenlenmesinde ve sindirim kanalında özellikle K vitamini olmak üzere birçok vitaminin üretilmesinde rol alır. Normal bağırsak florasında bulunan *E. coli*, herhangi bir nedenle başka dokulara geçme olanağı buldukları takdirde önemli enfeksiyonların oluşmasına neden olabilir. Bu enfeksiyonlar üriner enfeksiyon, septisemi, neonatal sepsis, menenjit ve diyaredir. *E. coli*'ye karşı ampicilin, tetrasiklinler, kloramfenikol, sefaloporinler ve amigoglikozitler'in değişik şekillerde etkilidir [134 - 137].

Listeria monocytogenes: 1 - 2 µm boyunda, tek tek, ikili veya kısa zincir halinde, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, gram-pozitif hareketli bir basildir. Aerob ve fakültatif anaerob özelliklere sahiptir. *L. monocytogenes* doğada çok yaygın olup, toz, toprak, kanalizasyon, çürük bitkiler ve hayvan yemlerinden, süt ürünleri, taze dondurulmuş kanatlı etleri, taze işlenmiş et ürünlerinden izole edilmiştir. Enfeksiyon genellikle fekal yolla bulaşır. Özellikle çiğ meyve ve sebze, çiğ peynir, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri, iyi pişmemiş tavuk, balık ve kırmızı et tüketimi olan kişilerde enfeksiyona rastlanma olasılığı yüksektir. *L. monocytogenes* insanlarda Listeriosis denilen gıda kaynaklı bir hastalığa neden olmaktadır. Listeriosis menenjit,

endokardit, öldürücü septisemi, hamilelerde düşük ve ensefalit gibi ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Listeriozanın genelde risk grubunu yaşlılar, bağışıklık sistemi zayıf olan insanlar hamile bayanlar, anne karnındaki ve yeni doğmuş bebekler, oluşturmaktadır [138 - 141].

Klebsiella pneumoniae: Hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü ve basil şeklinde gram negatif bakterilerdir. İnsanlarda üst solunum yolu ve gastrointestinal florasında bulunan bir bakteri olduğu için patojenliği uygunsuz koşullar karşısında fırsatçı patojen olarak açığa çıkar. Bu nedenle hastane enfeksiyonlarından sorumlu bir bakteridir [135, 142, 143]. *Klebsiella* türleri özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ve hastaneyle ilişkili enfeksiyonlarda, diyabetli hastalarda ve kronik pulmoner obstrüksiyon varlığında ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Klebsiella pneumoniae*, insan sağlığı açısından çok önemli olan nazokomiyal enfeksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları oluşmasında rol alan patojenlerdir [143 - 145]. *Klebsiella pneumoniae* bakteriyel pnömonilerin % 12 'sinden sorumludur. Ayrıca; piyelit, piyelonefrit ve sistit gibi idrar yolu enfeksiyonlarında neden olur. *Klebsiella pneumoniae*, ampisilin ve karbenisiline antibiyotiklerine dirençli ve gentamicin, ciprofloksacin ve sefoperazon antibiyotiklerine de duyarlıdır [134, 146].

Proteus vulgaris: Gram-negatif, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, üreaz pozitif ve çok hareketlidirler. Toprakta, suda, insan dışkısında, kanalizasyon atıklarında, kokuşmuş proteinli yiyeceklerde yaygın olarak bulunurlar. Hastane ortamında gelişen çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Ağır ve parçalanmış yaralarda bulunmaları hem enfeksiyonu ağırlaştırır hem de gazlı gangren ve tetanos etkenlerinin üremesini kolaylaştırarak bunların enfeksiyonlarının gelişmesine yol açar. Özellikle yeni doğan bebeklerde göbek kordonu enfeksiyonlarından kaynak bulan septis ve menenjit bazen epidemiler halinde görülebilir. Çoğunlukla insanlarda idrar yolları enfeksiyonlarına bazen de enteritise neden olurlar. *P. vulgaris* polimiksinler, tetrasiklin, ampisilin, neomisin ve nitrofurantoin'e dirençli kanamisin ve gentamisine karşı genellikle duyarlıdır [134, 135, 136, 147].

Pseudomonas aeruginosa: Gram-negatif, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, aerobik, 1,5 - 3 µm uzunluğunda basillerdir. *P. aeruginosa*'da bir uçta tek flagella ile hareketlidir. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla üreyebilen non-fermentatif bir bakteridir. Optimum 37 °C'de üreyebilirler. Ayrıca çevre koşullarına kendilerini iyi uydurabildiklerinden yeterli nem sağlandığında, çok az besin maddesiyle, uzun süre canlı kalabilir. Hastane ortamında solunum cihazları, yataklar, banyolar, gazlı bezler, tamponlardan gibi çok sayıda alandan izole edilebilir. Hastane enfeksiyonlarına yol açarlar. *P. aeruginosa* fırsatçı patojen bir bakteri olarak; insanlarda yaralarda, yanıklarda, idrar kanallarında, dış kulak yolu enfeksiyonlarına neden olur ve apselere, septisemiye ve menenjitte neden olabilir. *P. aeruginosa* enfeksiyonların da gentamisin ve sefalosporinler etkili şekilde kullanılan bir antibiyotiktir [135, 136, 148].

Serratia marcescens: 0,5 – 0,8 µm eninde ve 0,9 – 2,0 µm boyunda, hareketli, kapsülsüz, gram negatif ve fakültatif anaerobtur. Doğada yaygın olarak toprak, bitki ve su da bulunurlar. İnsan ve hayvanlarda ise ince barsak ve üst solunum yolu florasında bulunan mikroorganizmalardır. Son zamanlarda gittikçe artan sıklıkta hastane enfeksiyonlarına neden olduğu saptanmıştır. Bu mikroorganizma genellikle immün sistemi zayıf bireylerde, geniş spektrumlu antimikrobik alanlarda, trakeostomi veya katater kullanımına bağlı olarak çeşitli araç gereçlerle hastane enfeksiyonlarına neden olmakta ve endokardit, osteomyelit, yara, idrar ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [135, 149, 150].

Shigella sonnei: Yaklaşık 2 - 3 µm boyunda ve 0,5 µm eninde gram negatif, hareketsiz, kapsülsüz basillerdir. Fakültatif anaerobtur ve spor oluşturmazlar [134, 151]. *Shigella*'lar sadece yüksek primatlarda (başlıca insan) enfeksiyon oluşturur. İnsanlar bu bakterinin doğal konağıdır. İnsandan insana fekal-oral yol ile bulaşır. Rezervuar mikroorganizmayı dışkı ile yayan taşıyıcı insanlardır. Bu mikroorganizmalar taşıyıcılardan yiyecek ve içeceklere, temiz su kaynaklarına-depolarına bulaşır. Böcekler ve sinekler de etkeni, mekanik olarak bulaştırabilir. Bulaşmada kişisel hijyenin önemi büyüktür. *Shigella sonnei* shigellosis enfeksiyonuna sebep olur. Patojen bakteriler üst gastro intestinal yoldan canlı olarak geçip, kalın bağırsak epiteline tutunur ve penetre olurlar. Önce çoğalır ve hücreden hücreye geçerler. Bakterilerin hücre içinde çoğalması sonunda inflamasyon,

epitelyum hücrelerin ölümü, ülserler, kolon sıvı emiliminde bozukluk, dışkılama ile kan, mukus ve irin atılımı olur. Bu belirtiler mikroorganizmanın kolona kolonizasyonu ve kolon epiteline invazyonu nedeniyle görülür [134]. *Shigella sonnei* suşlarının trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, amoksisilin-klavulanik asid, ve ampisilin'e dirençli olduğu rapor edilmiştir [152]. *Shigella sonnei* enfeksiyonun tedavisinde kinolonlar ve azitromisinin kullanılabilceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir [153].

Staphylococcus aureus: Kok şeklinde, gram pozitif, fakültatif anaerop bir bakteridir. Üreme sıcaklığı optimum 37 °C'dir. *S. aureus*, doğada oldukça yaygındır; toz, toprak, çevresel yüzeylerde bulunur. İnsanlar ve hayvanlar başlıca konak yerleridir. *S. aureus*, burun mukozasında, ağız ve nazofarink florasında, insan ve hayvan derisinde bulunmaktadır. Gıdalarda geliştiğinde, ürettiği enterotoksinlerin sebep olduğu besin zehirlenmesine neden olmaktadır. Besin zehirlenmelerinin yanı sıra deri-mukoza lokalizasyonları, sepsisler ve zatüree, osteomyelit, artritis gibi sistem ve organ enfeksiyonlarına sebep olurlar. *S. aureus* bakterilerinin günümüz için en önemli yönleri, kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin birçoğuna hızla dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlarına daha sık rastlanmasıdır. *S. aureus*'ların suşlarının çoğu aminoglikozidlere, tetrasikline, metisiline direnç geliştirmiştir. *S. aureus* enfeksiyonunun tedavisinde vankomisin antibiyotiği kullanılabilceği bildirilmiştir. [135, 136, 147, 154].

Candida albicans: Fırsatçı ve patojen bir tür 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 rutubetli 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 hücresel bağışıklık sistemi tahrip olmuş hastalarda görülür. Tedavi amacıyla nistatin ve imidazol kullanılır [135, 147, 155].

***Alternaria alternata* (Fr.) Keissl:** Kolonileri genellikle siyah veya zeytinimsi siyah, bazen gri renkte. Konidiyoforlar tek veya küçük gruplar halinde, dallı veya basit, düz veya kıvrımlı, bazen genikulat, soluk veya orta derecede altın sarısı, düz çeperli 50 µm uzunlukta, 3 - 6 µm kalınlığında, bir veya birkaç tane apikal poru var, 1 - 3 bölmeli Konidiler genellikle uzun sık dallanan zincirler halinde, obklavat, obpriform, ovoid veya elipsoidal, genellikle kısa konik veya silindirik bir gagaya sahip, bazen bu gaga konidinin üçte biri kadar uzun olmakta, konidiler soluk veya orta derecede altın sarısı renginde, düz veya verrukuloz çeperli, sekize kadar enine ve bir kaç tanede boyuna veya oblik bölmeli, bütün uzunluk 18 - 63 µm, eni ise 7 - 18 (13) µm, gaga soluk renkli 2 - 5 µm kalınlığındadır.

Son derece yaygın bir saprofit bir fungus olup birçok bitki artığı, gıda, toprak, tekstil maddeleri üzerinde bulunmaktadır. *Alternaria alternata* bitkilerde koyu renkte lekeler halinde yaprak ve çiçekler de gelişir. Lekeler daha sonra genişler ve yuvarlak bir şekil alır. Koşullar uygunsuzsa fungusun koyu yeşil sporları lekeler üzerinde gelişir. Böyle gelişmeler sonucunda lekeler üzerinde konsantrik halkalar oluşabilir. Yaşlı yapraklar da lekeler kâğıdımsı gibi olur ve yırtılmalara maruz kalabilir [156, 157].

***Aspergillus flavus* Link ex Gray:** Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler 10 günde hızla gelişerek 6 - 7 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle ince fakat sıkı yapılı bir misel keçesi oluşturmakta, çoğunlukla düz ancak bazı ırklarında ise radial olarak oluklu ya da beyin kıvrımlıdır. Çoğu ırklarında bol miktarda konidi yapıları gelişir. Genç konidi başları genellikle sarı tonlardadır fakat hızlı bir biçimde parlak koyu sarı-yeşil tonlara kaymaktadır. Koloni altı genellikle renksiz - pembemsi esmer renktedir. Kondiyaforlar kalın çeperli, renksiz, kaba şekilde pürüzlü genellikle 1 mm kısadır. Vesiküller gençken uzamış, daha sonraları ise subgloboz veya globoz olmaktadır. Sterigma tek veya iki seri halinde, aynı ırkta tek bir vesikülde her iki durumda görülebilmektedir. Çoğunlukla konidiler olgunlaştıklarında globoz veya subgloboz, belirgin şekilde pürüzlü veya düz çeperli büyüklükleri ırklar arasında değişkendir. *Aspergillus flavus* yağlı tohumlarda mesela yerfıstığı ihtiva eden birçok hayvan yemi ve insan gıdasında aflatoksin denilen mikotoksini üretmektedirler. Yüksek dozlarda alındığında bu toksin karaciğeri tahrip eder. Düşük dozlarda ise

kansere sebep olmaktadır. Aflatoksinler, bilinen en güçlü doğal kanserojen maddelerdir [135, 156].

***Aspergillus niger* Tiegh:** Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler yavaş gelişmekte, 10 - 15 günde oda sıcaklığında 2,5 - 3,0 cm çapına ulaşmaktadır. Oldukça gevşek-kompakt beyaz-hafif sarı bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış konidi yapıları vardır. Tipik olarak karbon siyahına yakın renkte veya bazen koyu kahverengimsi siyah renktedir ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır. Koloni altı genellikle renksiz, bazen merkezde soluk sarıdır. Konidi başları tipik olarak büyük ve siyah, önce globoz, daha sonra radyat veya yaşlandığında iki veya daha fazla gevşek - iyi belirlenmiş sütun halinde yarılmaktadır. Konidiyoforlar değişken uzunlukta, çeper düz, nispeten kalın, renksiz ve özellikle üst kısımda kahverengimsi tonlardadır. Vesiküller globoz veya globoza yakındır. Sterigmalar iki seri halindedir. *A. niger* soğan, sarımsak, incir ve turunçgil meyvelerinde siyah çürüklük etmenidir. *A. niger* saprofit bir fungusdur, hastalık etmeni olarak da zayıf bir patojendir. Olgunlaşmamış ve çatlamış meyvelerde hastalık oluşturmaktadır. Portakal ya da incir de hastalık yaralanmış ve çatlamış meyvelerde görülmektedir. Soğanlarda ise hastalık yaralı olanlarda hızlı gelişmekte, ama bunlarda yaralanma olmadan da kabuklar altında hastalık gelişmektedir [156, 158].

***Penicillium expansum* Link ex Gray:** Hifler bölmeli, dar, genellikle 2 - 3 µm eninde, renksiz veya parlak renkli, düzensiz dallanmakta ve yoğun kompakt miselyum oluşturmaktadır. Konidi kenarları genellikle çok belirgindir. Konidiyoforlar farklılaşmamış yüzey altı veya havai hiflerden gelişmektedir. Saplar nispeten dar ve ince çeperli, genellikle bir iki bölmeli, bazı türlerde apikal olarak şişkin ancak vesiküller daima 10 µm'den küçük çapta, karakteristik şekilde penisillat dallanmıştır ve "penisillus" denilen yapılar gelişmektedir. Fiyalidler terminal ve kompakt vertisiller halinde, nispeten kısadır. Konidiler bazipetal olarak gelişmekte, genellikle uzun zincirler halinde, tek hücreli, çok küçük, küresel, elipsoid, priform veya apikulat nadiren silindirik kitle halinde gri - yeşil, gri - mavi veya gri nadir olarak kahverengidir. *Penicillium expansum* ekonomik öneme sahip birçok meyvede (elma, kiraz gibi) mavi küf çürüğü etkenidir [159, 160].

Penicillium lanosum Westling: Czapek Dox Agar besiyerinde 14 günde oda sıcaklığında 40 mm çapında koloni yapmakta, sert ve sıkı yapılı bazal keçe var, üzerinde flukkoz hifler gelişmekte ve koloni yüzeyine lanat görünüm vermekte, koloni düz, kenar bölgelerde hafif şekilde sporlanmakta, koyu gri-yeşil tonlarda, diğer yerler flukkoz hiften dolayı devamlı olarak beyaz kalmakta, eksudat sınırlı miktarda ve küçük damlacıklar halinde, koloni altı soluk sarı-krem tonlarında, penisillus büyük, asimetrik, düzensiz dallanmakta ve divergent eğilimde, konidiyoforlar kısa dallar halinde havai hiflerden gelişmekte, 100 - 200 µm uzunlukta, daha az olarak substrattan gelişmekte, bu durumda 200 - 600 x 2,8 - 3,3 µm, çeper düz veya düze yakın, dallar değişken, 25 - 35 x 2,8 - 3,0 µm, iki tane konidiyofor üzerinde genellikle aşağı kısımlardan gelişmekte, metula 2, 3 tane, 9 - 14 x 2,5 - 3,5 µm, uçları hafif genişlemiş, 4,0 - 4,5 µm, penisillusun farklı seviyelerinden gelişmekte, fiyalidler 2 - 10 tane, 9 - 11 x 3,0 - 4,0 µm, konidiler globoz- subgloboz, 2,8 - 3,0 µm çapında, çeper hafif granüllü, konidi zincirleri gevşek şekilde veya dağınıktır. *Penicillium lanosum* mısırdaki dane çürüklüğüne sebep olmaktadır [159, 161].

2.2 Metot

2.2.1 Bitkisel Materyalden Uçucu Yağ Elde Etme

Bitki örneklerinin kuruma işlemi gerçekleştirildikten sonra hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağları izole edilmiş ve % yağ verimleri belirlenmiştir. Bunun için belirli miktar kuru bitki örneği Clevenger cihazının balonuna konulduktan sonra balona bitki miktarının 10 katı kadar saf su ilave edilerek mantolu ısıtıcı üzerinde balon içeriği kaynatılmıştır. Kaynama sırasında, uçucu yağlar su buharı ile birlikte buharlaşarak balonun üstüne monte edilmiş olan ve soğuk su sirkülasyonu ile soğutulan soğutucuya sürüklenmiştir. Soğutucuya çarpan buhar yoğunlaşarak damla damla toplama ünitesinde birikmiştir. Hidrodistilasyona bitkisel materyal kaynamaya başladıktan sonra 3 saat süresince devam edilmiş ve sürenin sonunda toplama ünitesinde biriken uçucu yağ koyu renkli küçük şişelere alınmıştır. Daha sonra distile edilen bitki miktarı ile elde edilen uçucu yağ miktarından gidilerek % olarak uçucu yağ verimi hesaplanılmıştır [6, 50].



Şekil 2.6 Clevenger cihazı ve hidrodistilasyon yöntemiyle bitki örneğinden uçucu yağ elde edilişi



Şekil 2.7 Clevenger cihazının toplama ünitesinde biriken uçucu yağ

2.2.2 Uçucu Yağların Bileşenlerinin Belirlenmesi

Uçucu yağların kimyasal bileşenlerinin belirlenmesinde Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi analiz teknikleri kullanılmıştır.

2.2.2.1 Gaz Kromatografisi

T. convolutus, *T. haussknechtii* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağlarının analizinin yapıldığı GC'nin :

Analiz koşulları;

Sistem : Agilent Technologies 6890N Network sistem

Kolon : HP-Innowax column (60 m x 0.25 mm *i.d.*, 0.25 µm)
Dedektör : FID (Alev İyonlaşmalı Dedektör)
Taşıyıcı gaz : Helyum (1.7 ml/dk)
Split oranı : 50:1
Enjektör : 250°C
Sıcaklık Programı : 60°C-10 dk// 4 °C /dk // 220 °C -10 dk// 1 °C /dk // 240°C
-10 dk

T. spathulifolius uçucu yağının analizinin yapıldığı GC'nin:

Analiz koşulları:

Sistem : Agilent 5975 GC
Kolon : HP-Innowax Silika kapiler kolon
(60 m x 0.25 mm Ø, 0.25µm film kalınlığı)
Dedektör : FID (Alev İyonlaşmalı Dedektör)
Taşıyıcı gaz : Helyum (0.8 ml/dak)
Split oranı : 40:1
Enjektör : 250°C
Sıcaklık Programı : 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10
dak // 1°C/dak artışla 240°C

2.2.2.2 Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi (GC/MS)

Uçucu yağ içindeki bileşenler, gaz kromatografisi kolonundan ayrıldıktan sonra dedektör görevi gören kütle spektrometresinde her birinin tek tek spektrumları alınmıştır.

T. convolutus, *T. haussknechtii* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağlarının analizinin yapıldığı GC/MS'in :

Analiz koşulları:

Sistem : Agilent Technologies 5973 sistem

Dedektör : MSD (Kütle Seçici Dedektör)

Kolon : HP-Innowax column (60m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film kalınlığı)

Sıcaklık Programı : 60°C-10 dk// 4 °C /dk // 220 °C -10 dk// 1 °C /dk // 240°C -10 dk

Taşıyıcı gaz : Helyum (1.7 ml/dak)

Split oranı : 50:1

Elektron enerjisi : 70 eV

Kütle Aralığı : m/z 10 - 425

Enjektör : 250°C

Analiz sonuçları Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi'nin kütüphanesinde (Wiley, Adam ve Nist) bulunan uçucu yağların verileri ile örneklerimizdeki uçucu yağların karşılaştırılması ile tanımlama yapılarak değerlendirildi.

T. spathulifolius uçucu yağının analizinin yapıldığı GC/MS'in:

Analiz koşulları:

Sistem	: Agilent 5975 GC-MSD sistemi
Dedektör	: MSD (Kütle Seçici Dedektör)
Kolon	: HP-Innowax Silika kapiler kolon (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25µ m film kalınlığı)
Sıcaklık Programı	: 60°C de 10 dak // 4°C/dak artışla 220°C ye // 220°C de 10 dak // 1°C/dak artışla 240°C
Taşıyıcı gaz	: Helyum (0.8 ml/dak)
Split oranı	: 40:1
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle Aralığı	: <i>m/z</i> 35-450
Enjektör	: 250°C

Analiz sonuçları Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi'nin kütüphanesinde (BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams LIBR (TP)) bulunan uçucu yağların verileri ile örneğimizdeki uçucu yağın karşılaştırılması ile tanımlama yapılarak değerlendirildi.

Uçucu yağların bileşenleri tespit edildikten sonra pik alan yüzdeleri hesaplanarak, yüzde bileşimleri tespit edildi.

2.2.3 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antibakteriyel ve Antikandidal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antibakteriyel ve antikandidal özelliklerinin belirlenmesinde Agar Disk Difüzyon ve Mikrobroth Dilüsyon teknikleri kullanılmıştır [162, 163].

2.2.3.1 Agar Disk Difüzyon Metodu

Çalışmada kullanılmak üzere steril petrilere 15'er ml olacak şekilde *Listeria monocytogenes* için Listeria Selektive Agar Base (LSA), *Campylobacter jejuni* için % 5 At kanı (Oxoid) ilave edilmiş Columbia Agar (CA), patojen maya olan *Candida albicans* için Saboraud Dextrose Agar (SDA), ve diğer mikroorganizmalar içinde Mueller Hinton Agar (MHA) petrilere hazırlanmıştır. Kullanılacak mikroorganizmalardan *Listeria monocytogenes*, Buffered Listeria Enrichment Broth Base (BLEB) içersinde 35 °C'de, *Campylobacter jejuni* Columbia Agar'da 42 °C'de (mikroaerofilik ortamda), *Candida albicans*, Saboraud Dextrose Broth (SDB) içersinde 37 °C'de ve diğer mikroorganizmalarda çift kuvvet Mueller Hinton Broth (MHB) içersinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda gelişen mikroorganizmalar buldukları tüpten alınarak Mc Farland No:0,5'e (yaklaşık 10^8 CFU/ml) göre bulanıklık ayarı çift kuvvet MHB içinde yapılmıştır. Test edilecek uçucu yağlar ve ana bileşenlerin, 1000 µg/ml olacak şekilde saf Dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek, homojen bir karışım haline gelmeleri sağlanmıştır (stok çözelti). Mc Farland No:0,5'e göre ayarlanan taze mikroorganizma süspansiyonlarından uygun besiyerlerine yayma ekim yapıp ve üzerilerine her birine stok çözeltiden 20 µl emdirilen 3 adet ve 20 µl standart kloramfenikol (1000 µg/ml) (*Candida albicans* için ketokonazol) emdirilen 1 adet 6 mm çapında steril kağıt (oxoid) diskler uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kapları her bir mikroorganizma için uygun inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. *Campylobacter jejuni* ise 48 saat mikroaerofilik (%5 O₂, %10 CO₂) ortamda inkübe edilmiştir. Mikroaerofilik ortam anaerobik jar (Anaero

jar, Oxoid) içine camygen (Oxoid 2,5 L) yerleştirilerek sağlanmıştır. Jar içinde mikroaerofilik bir ortamın oluşup oluşmadığı anaerobik ortam kontrol strip'i (Anaerotest strip, Merck) ile kontrol edilmiştir.

2.2.3.2 Mikrobrot Dilüsyon Metodu

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalardan *Listeria monocytogenes*, Buffered Listeria Enrichment Broth Base (BLEB) içerisinde 35 °C'de, *Campylobacter jejuni* Columbia Agar (CA)'da 42 °C'de, *Candida albicans*, Saboraud Dextrose Broth (SDB) içerisinde 37 °C'de ve diğer mikroorganizmalarda çift kuvvet Mueller Hinton Broth (MHB) içerisinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gelişen kültürler, Mc Farland No: 0,5 'e (yaklaşık 10⁸ CFU/ml) göre bulanıklık ayarı yapılmıştır. Test edilecek uçucu yağların ve ana bileşenlerinin stok çözeltileri 1000 µg/ml olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Stok çözelti denemeler için 96 "U" tipi kuyucuklara sahip mikrodilüsyon petripleri (96 Well Plate) kullanılmıştır. Mikropipet yardımıyla kuyucuklara önce 100 'er µl steril distile su ilave edilmiştir (1, 11, 12'inci sütunlar hariç). Daha sonra ilk sütundaki kuyucukların her birine hazırlanan stok çözeltilerden 200 'er µl konulmuştur. Bu sütundan alınan 100 µl 'lik miktar ikinci sütuna transfer edilmiş ve bu şekilde seri olarak yapılan dilüsyonlar (1000 – 1,95 µg/ml) ile stok solüsyonların seyreltilmeleri sağlanmıştır. Yalnızca mikroorganizmasız antimikrobiyal ajanların seri dilüsyonlarını içeren sondan bir önceki sütun (11 'inci sütun) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Son sütun ise pozitif kontrol olarak bakteriler için bir antibiyotik olan kloramfenikol (1000 µg/ml), *Candida albicans* için ise standart antifungal madde olan ketakonazol (1000 µg/ml) kullanılmıştır. Bu işlem tüm kuyucuklara uygulandıktan sonra mikroorganizmaların eklenmesi işlemine geçilmiştir. Bunun için önceden bulanıklığı Mc Farland No: 0,5 'e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri yarım saat 37 °C 'de bekletilerek her satıra bir mikroorganizma gelecek şekilde (11 'inci sütun hariç) 100 'er µl ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra mikrodilüsyon petriplerinin kapakları kapatılarak uygun inkübasyon sıcaklığında 24 saat (*Campylobacter jejuni* ise 48 saat mikroaerofilik ortamda) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar da

üremenin varlığı ya da yokluğunun tespit edilebilmesi amacıyla mikrodilüsyon petrileri üzerine tetrazolium violet çözeltisi püskürtülmüştür. Bu işlemin sonunda renklenmenin olması için uygun inkübasyon sıcaklığında 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda renklenmenin olmadığı ilk kuyucukların sahip olduğu konsantrasyonlar MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak değerlendirilmiştir. MİK değeri, antimikrobiyal maddenin mikroorganizmaların üremesini durdurmak için gerekli en düşük konsantrasyon değeri olarak ifade edilmiştir.

2.2.4 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Uçucu yağların ve ana bileşenlerinin filamentöz funguslar üzerinde antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde Agar Disk Difüzyon ve Mikrobroth Dilüsyon teknikleri kullanılmış ve ayrıca uçucu yağlar ve ana bileşenlerinin mikrofunguslar üzerindeki % İnhibisyon Değerleri saptanmıştır.

2.2.4.1 Mikrofungus Spor Süspansiyonu Hazırlanması

Konidi elde edebilmek amacıyla filamentöz funguslardan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum*, *P. lanosum* Czapek Dox Agar (CDA) besiyerinde, *Alternaria alternata* ise Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde 90 mm çapında petri kapları kullanarak 25°C'de 7-10 gün süreyle geliştirilmiştir. Spor süspansiyonları %5 (w/v) oranında DMSO içeren %1 'lık (w/v) sodyum klorür çözeltisi kullanılarak hazırlandıktan sonra stok spor süspansiyonları filtre edilerek -20°C'de, muhafaza edilmiştir. 10⁴ CFU/ml yoğunlukta spor süspansiyonu hazırlamak için stok spor süspansiyonu DMSO içeren %1 'lık (w/v) sodyum klorür çözeltisinde seyreltilmiş ve thoma lamı kullanılarak sporlar sayılmıştır [164].

2.2.4.2 Antifungal Aktivite Belirlenmesinde Agar Disk Difüzyon Metodu

Çalışmada kullanılmak üzere steril petrilere 15'er ml olacak şekilde *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum*, *P. lanosum* için Czapek Dox Agar (CDA) besiyeri ve *Alternaria alternata* içinde Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyeri hazırlanmıştır. %5 'lık DMSO içeren % 1 'lık (w/v) sodyum klorür çözeltisi içinde hazırlanan 10^4 CFU/ml yoğunlukta spor süspansiyonlarından 500 µl alınarak uygun besiyerlerine yayma ekim yapılarak üzerilerine stok çözeltisinden (uçucu yağlar ve anabileşenleri 1000 µg/ml olacak şekilde DMSO içersinde hazırlandı) 20 µl emdirilen 1 adet 6 mm çapında steril kağıt disk yerleştirilmiştir. (standart olarak 20 µl ketokonazol (1000 µg/ml) emdirilen disk kullanılmıştır). Bu şekilde hazırlanan petri kapları her bir mikrofungus için uygun inkübasyon sıcaklığında 5- 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra oluşan açık zon ölçülüp kaydedilmiştir [162].

2.2.4.3 Antifungal Aktivite Belirlenmesinde Mikrobroth Dilüsyon Metodu

Test edilecek uçucu yağlar ve ana bileşenlerinin stok çözeltileri 1000 µg/ml olacak şekilde steril saf DMSO eklenerek hazırlanmış ve homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. Stok çözeltilerin seri dilüsyonlarını hazırlamak için 96 "U" tipi kuyucuklara sahip mikrodilüsyon petrileri (96 Well Plate) kullanılmıştır. Mikropipet yardımıyla kuyucuklara önce 100 'er µl Malt Ekstrakt Broth besiyeri ilave edilmiştir (1, 11, 12'inci sütunlar hariç). Daha sonra ilk sütundaki kuyucukların her birine hazırlanan stok çözeltilerden 200 'er µl konulmuştur. Bu sütundan alınan 100 µl'lik miktar ikinci sütuna transfer edilmiş ve bu şekilde seri olarak yapılan dilüsyonlar (1000 – 1,95 µg/ml) ile stok solüsyonların seyreltilmeleri sağlanmıştır. Yalnızca mikroorganizmasız antimikrobiyal ajanların seri dilüsyonlarını içeren sondan bir önceki sütun (11 'inci sütun) negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Son sütun ise pozitif kontrol olarak funguslar için standart antifungal madde olan ketakonazol (1000 µg/ml) kullanılmıştır. Bu işlem tüm kuyucuklara uygulandıktan sonra spor

süspansiyonu eklenmesi işlemine geçilmiştir. Bunun için 10^4 CFU/ml yoğunlukta spor süspansiyonları kuyucuklara (11 'inci sütun hariç) 100 'er µl ilave edilmiştir. Bu işlemden sonra mikrodilüsyon petrilerinin kapakları kapatılarak 25°C'de 5 - 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar da üremenin varlığı ya da yokluğu hif oluşup oluşmadığına göre değerlendirilmiştir. Hifin oluşup oluşmadığı Olympus SZ51 stero mikroskop kullanılarak gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hif oluşumu gözlenmeyen ilk kuyucukların sahip olduğu konsantrasyonlar MİK olarak değerlendirilmiştir [163, 164].

2.2.4.4 Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrofunguslar Üzerindeki % İnhibisyon Değerlerinin Saptanması

Konidi elde edebilmek amacıyla saprofitik funguslardan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium expansum*, *P. lanosum* Czapek Dox Agar (CDA) besiyerinde ve *Alternaria alternata* ise Malt Ekstrakt Agar (MEA) besiyerinde 90 mm çapında petri kapları kullanılarak 25 °C'de 7 - 10 gün süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra iğne öze yardımıyla gelişmiş kolonilerden spor alınarak, iki adet Czapek Dox Agar ve iki adet Malt Ekstrakt Agar besiyeri içeren petri kaplarının merkezine uygulanmış ve bu plaklardan iki tanesi kontrol grubu olarak kullanılırken, diğer iki plak ise test materyallerinin denenmesi amacıyla kullanılmıştır. Test plaklarının her birine stok çözeltilerden 20 µl emdirilen diskler, ekim yapılan noktaların üstüne yerleştirilerek, Petri kapları 7 gün süresince 25 °C'de inkübasyona bırakılıp koloni gelişimindeki büyüme kaydedilmiştir. (Su ve DMSO'un koloni gelişimi üzerine etkisini belirlemek için de 20 µl saf steril su ve DMSO emdirilen diskler kullanılmış, ve suyun ve DMSO'un fungus gelişimine tek başına etki etmediği belirlenmiştir). İnkübasyon sonunda, uçucu yağların ve ana bileşenlerinin fungus sporlarından gelişen koloniler üzerindeki % inhibisyon değerleri;

% İnhibisyon = $100 \cdot (C-T)/C$ formülüne göre hesaplanmıştır [165].

C: Kontrol petrisinde gelişen fungusun koloni çapı,

T: Test petrisinde gelişen fungusun koloni çapı.

2.2.5 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntem

Uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini yöntemi kullanılmıştır [166].

2.2.5.1 DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Uçucu yağların DPPH (Sigma) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Blois metoduna göre belirlenmiştir [166]. Bu amaçla her bir örnek için, 3 ml uçucu yağ solüsyonu ve 3 ml ana bileşen solüsyonu (uçucu yağların ve ana bileşenlerin konsantrasyonları; 100-1000 µg/ml) içeren ortama 1 ml metanol içinde hazırlanmış DPPH (1 mM) ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 200-800 nm arası spektrum taraması yapıldıktan sonra maksimum absorbanı olarak 515 nm belirlenmiş olup çalışmalarda bu dalga boyu kullanılarak spektrometrede (T80 + UV/VIS spectrometer, PG Instruments Ltd) ölçüm yapılmıştır. DPPH üzerinden serbest radikalleri süpürücü etkisinin (I) yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% I = [(\text{kontrol absorbanı} - \text{uçucu yağ absorbanı}) / (\text{kontrol absorbanı})] \times 100$$

Test edilen uçucu yağlar her bir konsantrasyonu için üç tekrar olarak çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak sentetik antioksidan olan Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) kullanılmıştır.

2.2.6 İstatistik

Antioksidan deney sonuçlarından elde edilen ortalamalar bir yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Ortalamalar arası farklılıklar, Tukey HSD (Tukey gerçekten anlamlı farklılık) testi ile belirlenmiştir. Veri analizinde SPSS

istatistik programı (SPSS, versiyon 15.0, SPSS Science, Chicago, IL) kullanılmıştır.
Sonuçlar $P < 0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

3. BULGULAR

3.1 Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları

Araştırmamızda kullandığımız *Thymus* türlerine ait uçucu yağların, GC ve GC-MS analizi kullanılarak belirlenen kimyasal bileşenleri Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve ana bileşenleri de Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4' de grafikler halinde gösterilmiştir.

Tablo 3.1 *Thymus convolutus* 'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri

Tür Adı	<i>T. convolutus</i>	
Toplayıcı No	BY 16831	
Lokalite ve Toplama Zamanı	Erzincan: Kemaliye, Sırakonaklar, Sarıçiçek yaylası yolu, 1600 m, 01.07.2008	
Yağ Verimi (%)	% 0,60	
Bileşenler	RI	Bileşenlerin miktarı (%)
Trisiklen	1008	1,20
α -Pinen	1021	4,01
α -Thujen	1024	2,30
Kamfen	1070	4,22
β -Pinen	1119	2,00
Sabinen	1136	2,20
β -Terpinen	1192	0,72
α -Terpinen	1213	0,60
Limonen	1238	0,56
1,8-sineol	1247	7,72
β -Fellandren	1249	0,29
γ -Terpinen	1297	0,82
E- β -Osimen	1306	8,90
3-Oktanon	1308	0,11
<i>p</i> -simen	1328	0,40
Delta-karen	1339	0,22
3-Oktanol	1459	0,40
1-Okten-3-ol	1516	0,09
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1531	2,40
Z-3-Heksenil-2-metilbutanoat	1540	0,16
Z-3-Heksenilisovalarat	1554	0,20
Kamfor	1586	16,6
Linalool	1608	0,12
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1609	0,30
<i>trans</i> - <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	1622	0,20
Pinokarvon	1633	0,02
Bornil asetat	1639	0,08
Endobornil acetat	1642	1,20
<i>trans</i> - α -bergomoten	1645	0,14
Terpinen-4-ol	1658	3,40
<i>cis</i> -dihidrokarvon	1666	0,10
<i>cis</i> - <i>p</i> -menth-2-en-1-ol	1677	0,16
α -Thujenal	1686	0,22
Alloaromadendren	1699	0,30
<i>cis</i> -verbenol	1704	0,22
<i>trans</i> -pinokarveol	1705	0,28
<i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2,8-dienol	1714	0,14
δ -Terpineol	1715	0,22
<i>trans</i> -verbenol	1723	0,22
Gamma-Muurolen	1733	0,24
α -Terpineol	1737	0,60
Borneol	1743	4,88
Verbenon	1750	0,20

Tablo 3.1 'in devamı

α -Muurolen	1761	0,08
α -Farnesen	1771	0,32
Bisiklogermakren	1772	2,54
cis-piperitol	1773	0,08
Delta-Kadinen	1787	2,60
Gamma-Kadinen	1790	0,28
Mirtenol	1812	0,26
trans-Karveol	1842	0,48
cis-Kalamen	1846	0,08
p-simen-8-ol	1852	0,12
cis-Carveol	1857	0,14
Askaridole	1873	0,24
Karyofillene oksid	1961	2,40
Ledol	1983	0,70
Germakren-D-4-ol	1996	3,60
Kubenol	2006	0,88
Globulol	2019	0,42
Spathulenol	2043	1,66
Tau-Kadinol	2072	3,04
Tau-Muurolol	2082	3,06
Delta-kadinol	2089	1,68
α -kadinol	2111	5,16
β -Eudesmol	2115	0,72
Monoterpen hidrokarbonlar		28,44
Oksijenik monoterpenler		40,60
Seskiterpenler		29,99
Diğerleri		0,96
Toplam		99,9

RI: Retention İndeks

Tablo 3.2 *Thymus haussknechtii*'ye ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri

Tür Adı	<i>T. haussknechtii</i>	
Toplayıcı No	BY 16828	
Lokalite ve Toplama Zamanı	Erzincan: Kemaliye-Arapkir yolu, Fırat vadisi 900-1000m, 01.07. 2008	
Yağ Verimi (%)	% 0.34	
Bileşenler	RI	Bileşenlerin miktarı (%)
Trisiklen	1008	1,20
α -Pinen	1021	4,89
α -Thujen	1024	1,30
Kamfen	1070	4,24
β -Pinen	1119	0,84
Sabinen	1136	0,45
Miresen	1195	0,30
α -Terpinen	1213	0,60
Limonen	1238	0,70
1,8-sineol	1247	23,6

Tablo 3.2' nin devamı

β -Fellandren	1249	0,29
γ -Terpinen	1297	1,02
E- β -Osimen	1306	0,07
<i>p</i> -simen	1328	2,00
Delta-karen	1339	0,30
3-Oktenil asetat	1446	0,10
3-Oktanöl	1459	0,10
trans-Linalool oksid	1510	0,70
1-Okten-3-öl	1516	0,14
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1531	2,26
cis-Linalool oksid	1538	0,47
Neröl oksid	1540	0,08
α -Kamfolen aldehid	1561	1,10
trans-Krisanthemal	1577	0,20
Kamfor	1586	6,12
Linalool	1608	1,22
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1609	0,66
Linalil asetat	1618	1,20
<i>trans-p</i> -menth-2-en-1-öl	1622	0,42
Pinokarvon	1633	0,60
Bornil asetat	1639	0,24
Endobornil asetat	1642	0,28
6- metil- 3,5-heptadien-2-on	1652	0,06
Terpinen-4-öl	1658	3,26
<i>cis-p</i> -menth-2-en-1-öl	1677	0,24
α -Thujenal	1686	1,02
Alloaromadendren	1699	0,12
cis-verbenöl	1704	1,20
trans-pinokarveöl	1705	1,00
cis-p-Menth-2,8-dienöl	1714	0,24
δ -Terpineöl	1715	0,62
trans-verbenöl	1723	6,60
1,8-Menthadien-4-öl	1728	0,24
α -Terpineöl	1737	1,00
Borneöl	1743	4,20
Verbenon	1750	2,28
trans-p-Menth-2-ene-1,8-dio	1759	0,97
Karvon	1772	0,60
cis-piperitol	1773	0,08
Geranilasetat	1780	0,12
Mirtenöl	1812	0,48
E- β -Damaskenon	1835	0,06
trans-Karveöl	1842	0,98
Geraniöl	1847	0,93
<i>p</i> -simen-8-öl	1852	0,50
isokaryofillen oksid	1947	0,40
Karyofillene oksid	1961	6,00
E-Nerolidöl	1980	0,42
Germakren-D-4-öl	1996	0,18
Elemöl	2012	0,90

Tablo 3.2' nin devamı

Spathulenol	2043	0,42
Kumin alcohol	2056	0,30
α -Eudesmol	2111	0,14
β -Eudesmol	2115	0,16
Diisobutil fitalat	2329	2,06
Monoterpen hidrokarbonlar		18,20
Oksijenik monoterpenler		64,41
Seskiterpenler		9,04
Diğerleri		3,82
Toplam		95,47

RI: Retention İndeks

Tablo 3.3 *Thymus pectinatus* var. *pectinatus*'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri

Tür Adı	<i>T. pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	
Toplayıcı No	NÇ 9125	
Lokalite ve Toplama Zamanı	Sivas: Paşa Fabrikası kuzeyi, Jips, 1350 m, 07. 2008	
Yağ Verimi (%)	% 1,3	
Bileşenler	RI	Bileşenlerin miktarı (%)
α -Pinen	1021	1,19
α -Thujen	1024	0,60
Kamfen	1070	2,26
β -Pinen	1119	0,60
Delta-3-Karen	1171	0,20
Miresen	1192	1,40
α -Terpinen	1213	2,20
Limonen	1238	0,80
1,8-sineol	1247	3,80
γ -Terpinen	1297	9,20
3-Oktanon	1308	0,20
<i>p</i> -simen	1328	23,0
α -Terpinolen	1341	0,24
3-Hexen-1-ol	1451	0,04
3-Oktanol	1459	0,40
3,4-Dimethylstyren	1509	0,20
1-Okten-3-ol	1516	0,30
<i>trans</i> -Sabinen hidrat	1531	0,34
Kamfor	1586	0,12
Linalool	1608	0,18
<i>cis</i> -Sabinen hidrat	1609	0,30
Oktanol	1615	0,08
β -Terpineol	1618	0,20
Endobornil acetat	1642	0,16
Terpinen-4-ol	1661	1,40

Tablo 3.3' ün devamı

<i>cis</i> -dihidrokarvon	1666	0,10
<i>cis</i> -p-menth-2-en-1-ol	1677	0,15
trans-pinokarveol	1705	0,10
δ -Terpineol	1715	0,15
trans-verbenol	1723	0,14
Gamma-Muurolen	1733	0,24
α -Terpineol	1737	0,48
Borneol	1743	4,80
trans-p-Menth-2-ene-1,8-dio	1759	0,06
β -Bisabolen	1761	0,20
Delta-Kadinen	1787	0,08
Gamma-Kadinen	1790	0,32
<i>cis</i> -p-Menth-2-ene-1,8-diol	1803	0,04
Cumin aldehyde	1809	0,08
Mirtenol	1812	0,26
<i>cis</i> -Kalamen	1846	0,12
p-simen-8-ol	1852	0,60
Geraniol	1854	0,70
Geranil butirat	1882	0,06
Geranil isovalerat	1884	0,08
Karyofillen oksid	1960	0,14
Timol	2079	22,0
Tau-Muurolol	2082	0,60
Delta-kadinol	2089	0,64
Karvakrol	2098	8,20
Diisobutil fitalat	2329	0,12
Monoterpen hidrokarbonlar		41,89
Oksijenik monoterpenler		44,58
Seskiterpenler		2,46
Diğerleri		0,94
Toplam		89,87

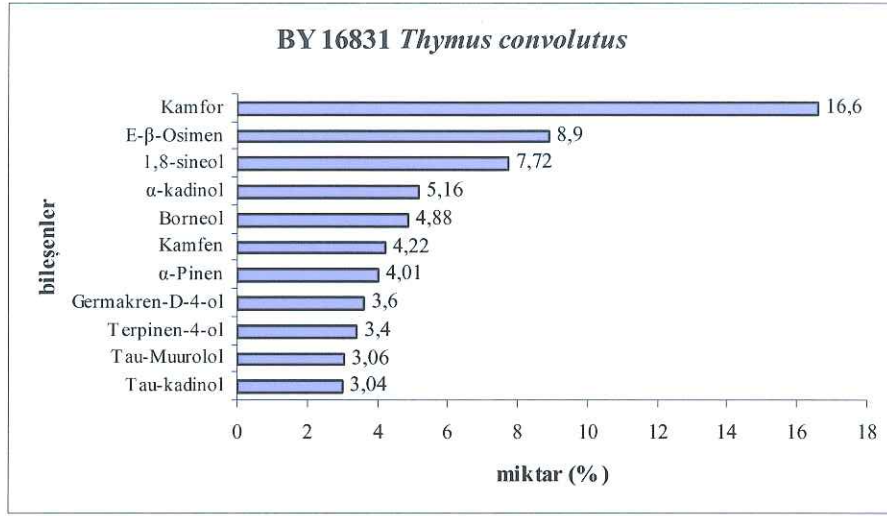
RI: Retention İndeks

Tablo 3.4 *Thymus spathulifolius* 'a ait genel bilgiler ve uçucu yağ bileşenleri

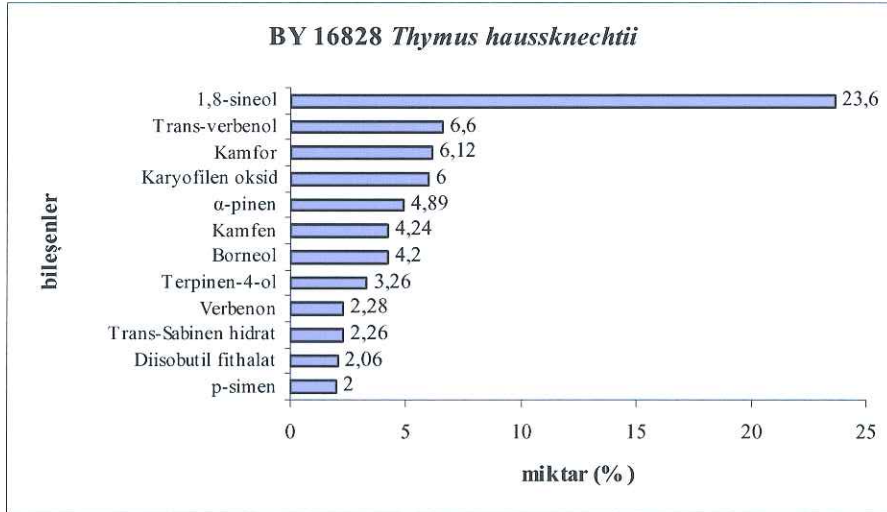
Tür Adı		<i>Thymus. spathulifolius</i>	
Toplayıcı No		BY 17063	
Lokalite ve Toplama Zamanı		Sivas, Divriği Sincan arası 1350 m. 22.07.2009	
Yağ Verimi (%)		% 2,3	
Bileşenler	RI	Bileşenlerin miktarı (%)	
Trisiklen	1014	0,1	
α -Pinen	1032	0,9	
α -Thujen	1035	0,7	
Kamfen	1076	1,3	
β -Pinen	1118	0,2	
Mirsen	1174	1,2	
α -fellandren	1176	0,1	
α -Terpinen	1188	1,3	
Limonen	1203	0,3	
1,8 sineol	1213	1,3	
β -fellandren	1218	e	
γ - Terpinen	1255	7,0	
3- Oktanon	1267	0,2	
<i>p</i> -simen	1280	12,3	
Terpinolen	1290	e	
<i>trans</i> - Sabinen hidrat	1474	0,7	
Kamfor	1532	e	
<i>cis</i> - Sabinen hidrat	1556	0,3	
Bornil asetat	1590	e	
Terpinen-4-ol	1611	e	
β -karyofillen	1612	1,2	
Karvakrol methyl eter	1614	e	
α -Terpineol	1706	0,2	
Borneol	1719	3,5	
Karyofillen oksid	2008	0,2	
İzotimol	2181	e	
Timol	2198	17,8	
İzokarvakrol	2221	0,1	
Karvakrol	2239	49,0	
Monoterpen hidrokarbonlar		25,4	
Oksijenik monoterpenler		72,9	
Seskiterpenler		1,4	
Diğerleri		0,2	
Toplam		99,9	

RI: Retention İndeks

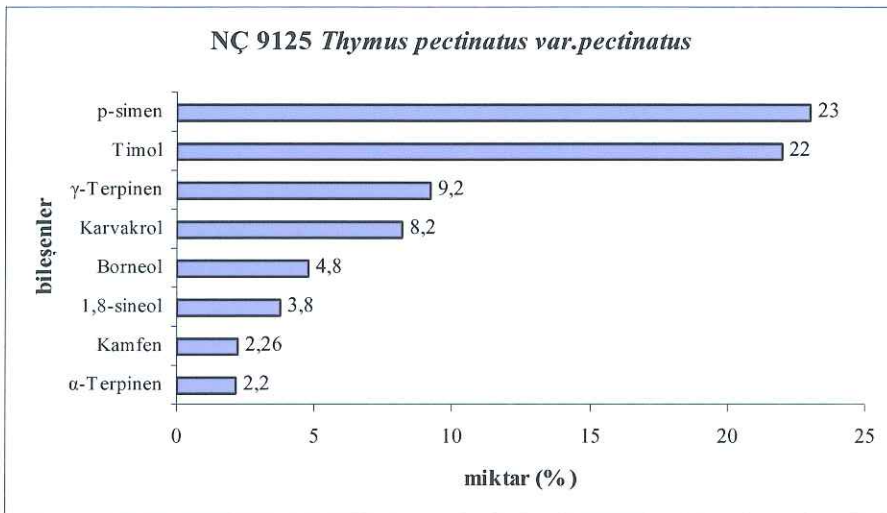
e: eser miktarda



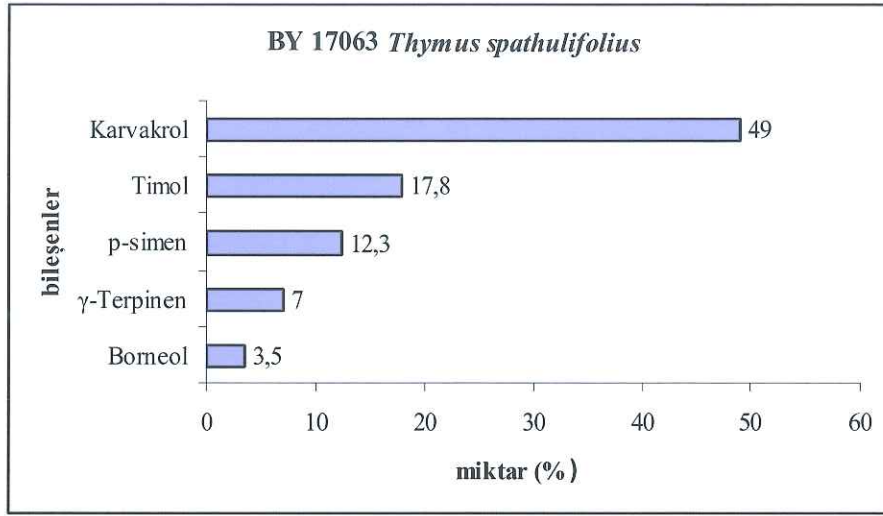
Şekil 3.1: *Thymus convolutus* uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.2: *Thymus haussknechtii* uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.3: *Thymus pectinatus var. pectinatus* uçucu yağının bileşenleri



Şekil 3.4: *Thymus spathulifolius* uçucu yağının bileşenleri

3.2 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Araştırma materyallerimizi oluşturan *Thymus* türlerine ait uçucu yağların ve bu uçucu yağların ana bileşenlerini oluşturan timol, karvakrol, kamfor, 1,8 sineol ve *p*-simen'in antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde Disk Difüzyon, Mikrodilüsyon ve Fungal Spor % İnhibisyon metotları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen değerler sırasıyla Tablo 3.5, Tablo 3.6, Tablo 3.7, Tablo 3.8 ve Tablo 3.9'da verilmiştir:

Tablo 3.5 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Agar Disk Difüzyon Metoduna Göre Antibakteriyel ve Antikandidal Aktiviteleri (mm)

Mikroorganizmalar	Kaynak	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. comolatus</i>	<i>T. haussknechtii</i>	<i>T. pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	Timol	Karvakrol	Kamfor	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Standart
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	8	9	9	9	7	7	7	7	7	25 ^C
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	10	9	9	9	9	9	8	8	8	22 ^C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25292	10	9	9	9	9	9	8	8	9	22 ^C
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	9	9	9	9	8	8	8	7	7	24 ^C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	10	10	9	9	8	9	8	8	8	23 ^C
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL 123	9	10	9	9	8	8	7	7	7	24 ^C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	10	9	9	9	9	9	8	8	8	22 ^C
<i>Serratia marcescens</i>	Klinik izolat	9	9	8	9	7	7	7	7	7	24 ^C
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	7	7	8	8	7	7	7	7	7	25 ^C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinik izolat	7	7	8	7	7	7	7	7	7	22 ^C
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	9	9	9	8	8	8	8	7	8	24 ^K
<i>Candida albicans</i>	Klinik izolat	8	9	9	8	7	7	7	7	7	27 ^K

^C: kloramfenikol

^K: ketakonazol

Tablo 3.6 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrobrot Dölüsyon Metoduna Göre Antibakteriyel ve Antikandidal Aktiviteleri (MIK) ($\mu\text{g/ml}$)

Mikroorganizmalar	Kaynak	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. convolutus</i>	<i>T. haussknechtii</i> var. <i>pectinatus</i>	Timol	Karvakrol	Kamfor	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Standart	DMSO
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291	500	250	250	500	500	1000	500	500	_C	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NRRL 3567	125	125	250	500	500	500	500	500	_C	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25292	125	125	250	500	500	1000	1000	1000	_C	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	250	250	250	500	500	1000	500	500	_C	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	125	125	250	500	500	1000	1000	1000	_C	+
<i>Proteus vulgaris</i>	NRRL 123	250	125	250	1000	1000	1000	1000	1000	_C	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	250	250	250	500	500	1000	1000	1000	_C	+
<i>Serratia marcescens</i>	Klinik izolat	250	250	500	1000	1000	1000	1000	1000	_C	+
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	500	500	500	1000	500	1000	1000	500	_C	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinik izolat	500	500	500	500	500	1000	1000	500	_C	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	250	125	250	500	500	500	500	500	_K	+
<i>Candida albicans</i>	Klinik izolat	500	250	250	500	500	1000	1000	1000	_K	+

C: kloramfenikol

K: ketakonazol

-: bulanıklık yok (aktivite var)

+: bulanıklık var (aktivite yok)

Tablo 3.7 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Agar Disk Difüzyon Metoduna Göre Antifungal Aktiviteleri (mm)

Mikrofunguslar	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. convolutus</i>	<i>T. haussknechtii</i>	<i>T. pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	Timol	Karvakrol	Kamfor	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Ketokonazol
<i>Aspergillus flavus</i>	9	8	8	9	8	8	7	7	8	22
<i>Aspergillus niger</i>	8	8	8	8	7	8	7	7	7	13
<i>Penicillium expansum</i>	8	8	8	9	7	7	0,65	0,65	0,65	16
<i>Penicillium lanosum</i>	8	8	7	8	7	7	0,65	0,65	0,65	14
<i>Alternaria alternata</i>	7	7	7	8	7	7	7	0,65	0,65	18

Tablo 3.8 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Mikrobroth Dilüsyon Metoduna Göre Antifungal Aktiviteleri (MIK) (µg/ml)

Mikrofunguslar	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. convolutus</i>	<i>T. haussknechtii</i>	<i>T. pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	Timol	Karvaktrol	Kamfor	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Ketokonazol	DMSO
<i>Aspergillus flavus</i>	250	500	500	500	500	500	1000	1000	500	-	+
<i>Aspergillus niger</i>	500	500	500	500	1000	500	1000	1000	1000	-	+
<i>Penicillium expansum</i>	500	500	1000	500	500	500	1000	1000	1000	-	+
<i>Penicillium lanosum</i>	500	1000	1000	500	500	500	1000	1000	1000	-	+
<i>Alternaria alternata</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	-	+

-: hif oluşumu yok (aktivite var)

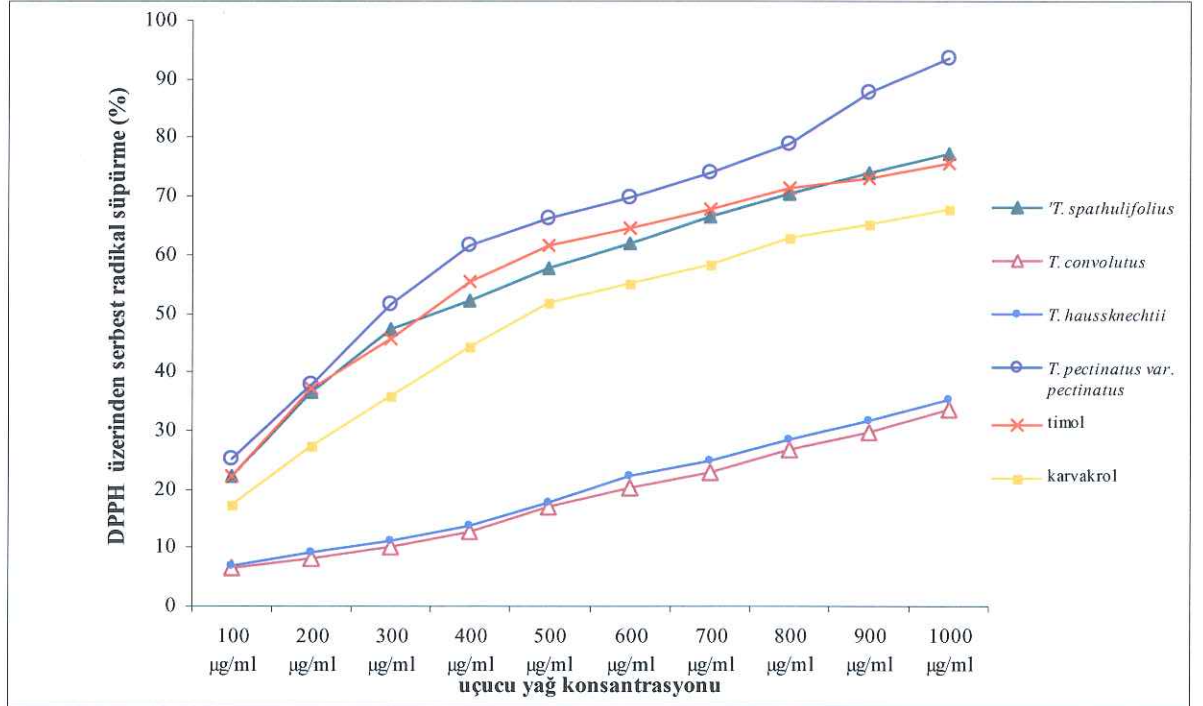
+: hif oluşumu var (aktivite yok)

Tablo 3.9 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin Antifungal Aktiviteleri (% inhibisyon değerleri)

Mikrofunguslar	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. convolutus</i>	<i>T. haussknechtii</i>	<i>T. pectinatus</i> var <i>pectinatus</i>	Timol	Karvakrol	Kamfor	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Ketokonazol
<i>Aspergillus flavus</i>	53	28	25	31	28	30	22	19	25	83,63
<i>Aspergillus niger</i>	28	17	14	19	17	17	14	8	11	40
<i>Penicillium expansum</i>	21	14	9	20	18	18	9	4	14	65
<i>Penicillium lanosum</i>	25	20	15	20	15	15	10	10	10	54
<i>Alternaria alternata</i>	12	10	8	16	10	9	9	6	8	82

3.3 Uçucu Yağların ve Ana Bileşenlerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

Araştırma materyallerimizi oluşturan *Thymus* türlerine ait uçucu yağlar ve ana bileşenleri olan timol, karvakrol, kamfor, 1,8 sineol, *p*-simen'in antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Tablo 3.10'da verilmiştir. *Thymus* uçucu yağlarının ve onların ana bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH üzerinden serbest radikal süpürme yüzdeleri grafik olarak Şekil 3.5'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5 *Thymus* uçucu yağlarının ve ana bileşenlerinin farklı konsantrasyonlarda DPPH üzerinden serbest radikal süpürme aktivitesi

Tablo 3.10 Test Edilen *Thymus* Uçucu Yağlarının ve Ana Bileşenlerinin DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayinine göre Antioksidan Aktiviteleri (%₃± SD)

Uçucu yağ konsantrasyonu (µg/ml)	<i>T. spathulifolius</i>	<i>T. convolutus</i>	<i>T. haussknechtii</i>	<i>T. pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	Tümöl	Karvakrol	1,8 sineol	<i>p</i> -simen	Kamfor	BHA
100	22,26 ± 0,49 a	6,49 ± 0,22 a	6,90 ± 0,15 a	25,20 ± 0,38 a	22,23 ± 0,39 a	17,24 ± 0,35 a	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	93,79 ± 0,75 a
200	36,58 ± 0,38 b	8,11 ± 0,14 b	9,04 ± 0,14 b	37,78 ± 0,48 b	37,23 ± 0,24 b	27,26 ± 0,40 b	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	95,15 ± 0,33 a
300	47,31 ± 0,45 c	10,13 ± 0,23 c	11,03 ± 0,19 c	51,60 ± 0,52 c	45,57 ± 0,47 c	35,96 ± 0,45 c	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
400	51,97 ± 0,42 d	12,69 ± 0,33 d	13,66 ± 0,32 d	61,61 ± 0,55 d	55,27 ± 0,36 d	44,28 ± 0,27 d	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
500	57,53 ± 0,74 e	16,80 ± 0,10 e	17,68 ± 0,14 e	66,06 ± 0,14 e	61,64 ± 0,37 c	51,84 ± 0,34 e	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
600	61,78 ± 0,44 f	20,33 ± 0,38 f	22,23 ± 0,33 f	69,80 ± 0,17 f	64,38 ± 0,24 f	54,93 ± 0,36 f	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
700	66,34 ± 0,40 g	22,89 ± 0,17 g	24,79 ± 0,17 g	73,95 ± 0,25 g	67,62 ± 0,28 g	58,32 ± 0,47 g	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
800	70,20 ± 0,26 h	26,66 ± 0,44 h	28,30 ± 0,32 h	78,98 ± 0,25 h	71,45 ± 0,27 h	62,85 ± 0,34 h	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
900	74,03 ± 0,23 i	29,72 ± 0,23 i	31,57 ± 0,29 i	87,54 ± 0,61 i	73,12 ± 0,16 i	65,06 ± 0,46 i	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-
1000	77,31 ± 0,21 j	33,39 ± 0,25 j	35,11 ± 0,22 j	93,60 ± 0,41 j	75,56 ± 0,28 j	67,63 ± 0,31 j	akti vite yok	akti vite yok	akti vite yok	-

*Her bir uçucu yağ konsantrasyonu 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

Aynı sütünlarda (a-j) aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir (P>0.05).

BHA: Bütillenmiş hidroksi anisol

SD: Standart sapma

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Araştırmamızda Anadolu Çaprazına özgü *Thymus* cinsine ait *T. convolutus*, *T. haussknechtii*, *T. pectinatus* var. *pectinatus* ve *T. spathulifolius* olmak üzere dört türe ait bitki örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerin uçucu yağları, bitkisel materyallerin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilerek GC ve GC/MS ile kimyasal kompozisyonları belirlenmiştir. Test materyali olarak kullanılan bitkisel örneklerin lokaliteleri, uçucu yağ verimleri ve yağların kimyasal bileşenleri, Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4'de verilmiştir.

Araştırmada kullanılan *Thymus* türlerinin uçucu yağ verimlerinin % 0,34 – 2,3 arasında değişen miktarlarda olduğu saptanmıştır (Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4). Çeşitli çalışmalarda ülkemizde yetişen 51 *Thymus* taksonuna ait 181 örneğin uçucu yağ verimleri ve bileşenleri saptanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda uçucu yağ veriminin türlere göre % 0,01 - 3,4 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Bu örneklerden yağ verimi % 0,01 'den az olanlar zayıf; % 0,01 - % 1 arasında olanlar orta; % 1 'den fazla olanlar ise uçucu yağ verimi bakımından zengin olarak sınıflandırılmışlardır [129]. Buna göre çalışmamızda *Thymus haussknechtii* ve *T. convolutus*'un yağ verimleri sırasıyla, % 0,34, % 0,60 olarak belirlendiğinden orta, *T. pectinatus* var *pectinatus* (% 1,3) ve *T. spathulifolius*'un (% 2,3) ise uçucu yağ verimi bakımından zengin olduğu belirlenmiştir.

Thymus convolutus uçucu yağının GC ve GC/MS sonucu Tablo 3.1' de verilmiştir. Bu sonuca göre; Erzincan, Kemaliye-Sırakonaklar-Sarıçiçek yaylası yolundan toplanan *T. convolutus* uçucu yağının bileşenleri incelendiğinde monoterpen hidrokarbonlar (% 28,44), oksijenik monoterpenler (% 40,6), seskiterpenlerden (% 29,9) ve diğerlerinden (% 0,96) oluştuğu görülmüştür. Ana bileşenleri kamfor (%16,6), E-β-Osimen (% 8,9) ve 1,8-sineol (% 7,72) olarak belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında *T. convolutus* uçucu yağının kimyasal

kompozisyonu ile ilgili ülkemizde yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Diğer örneğimiz olan *T. haussknechtii* ise Erzincan, Kemaliye-Arapkir yolu, Fırat vadisinden toplanmış ve uçucu yağının içeriğinin % 95,47'si GC ve GC/MS analizi ile belirlenmiş ve uçucu yağ bileşenlerinin monoterpen hidrokarbonlar (% 18,20), oksijenik monoterpenler (% 64,41), seskiterpenler (% 9,04) ve diğerlerinden (% 3,82) oluştuğu görülmüştür. Ana bileşenlerinin 1,8-sineol (% 23,6), trans-verbenol (% 6,6) ve kamfor (% 6,12) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.2). Bağcı ve Başer Elazığ, Harput-Ankuzubaba Dağ'ından topladıkları *T. haussknechtii* uçucu yağının ana bileşinini 1,8-sineol (% 21,5) olarak rapor etmişlerdir [99]. Başer ve arkadaşları Elazığ'dan topladıkları *T. haussknechtii* örneği ile yaptıkları çalışmada ise uçucu yağın ana bileşenlerini linalol (% 19,91) ve borneol (% 10,35) olarak belirtmişlerdir [167].

Sivas Paşa Fabrikası kuzeyi jipsli alandan toplanan *T. pectinatus* var. *pectinatus* örneği uçucu yağ içeriğini % 41,89'la monoterpen hidrokarbonlar, % 44,58'le oksijenik monoterpenler, % 2,46'la seskiterpenler ve % 0,94'la diğerlerinin oluşturduğu belirlenmiştir. Uçucu yağın ana bileşenleri ise *p*-simen (% 23), timol (% 22), γ -terpinen (% 9,2) ve karvakrol (% 8,2) olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.3). Başer ve arkadaşları (1992). Ünlü ve arkadaşları (2003) Sivas, Tecer Dağ'ından topladıkları aynı türün uçucu yağ ana bileşenlerini timol (% 49,8), γ -terpinen (% 16,1) ve *p*-simen (% 14,8) olarak rapor etmişlerdir [168].

Sivas, Divriği –Sincan arasından toplanan *T. spathulifolius*'un uçucu yağ bileşenleri incelendiğinde monoterpen hidrokarbonlar (% 25,4), oksijenik monoterpenler (% 72,9), seskiterpenlerden (% 1,4) ve diğerlerinden (% 0,2) oluştuğu belirlenmiş ve ana bileşenlerinin karvakrol (% 49), timol (% 17,8) ve *p*-simen (% 12,3) olduğu görülmüştür (Tablo 3.4). Sökmen ve arkadaşları (2004) Sivas, Sincan Yağbasan köyünden topladıkları *T. spathulifolius* uçucu yağının ana bileşenlerini timol (% 36,5), karvakrol (% 29,8) ve *p*-simen (% 10) olarak rapor etmişlerdir [131].

Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında test edilen uçucu yağların ana bileşenlerinde bizim bulgularımızla paralellik olmasına karşın, oranları bakımından bazı farklılıkların da olduğu görülmektedir. Çeşitli çalışmalarda uçucu yağların kimyasal kompozisyonu ve miktarları üzerinde bitkilerin, genotip, kemotip, coğrafik orijin, çevre ve toprak şartları ile toplanma zamanının etkili olduğu rapor edilmiştir [169 - 171].

Araştırmada kullanılan tüm bitki örneklerinden elde edilen uçucu yağların ve uçucu yağların ana bileşenlerini oluşturan timol, karvakrol, kamfor, 1,8-sineol, *p*-simen'in agar disk difüzyon ve mikrobrot dilüsyon metotları kullanılarak test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkileri de araştırılmıştır. Agar disk difüzyon metodunda, 6 mm çapında boş antibiyogram disklerine uçucu yağların ve ana bileşenlerin stok solüsyonlarından 20 µl emdirilmiş ve oluşan zon çapları mm olarak kaydedilmiştir.

Çalışmamızda test bakterileri ve *Candida* örneklerine karşı elde edilen zon çapları kontrol olarak kullanılan kloramfenikol (22 – 25 mm) ve ketokonazol'e (24 - 27 mm) ait zonlarla karşılaştırıldığında daha küçük olmalarına rağmen (uçucu yağların 7 – 10 mm, ana bileşenlerin 7 - 9 mm), test mikroorganizmaları üzerinde tüm uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antibakteriyel ve antikandidal etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Tablo 3.5). Baudoux yaptığı bir çalışmada kullanılan diskler etrafındaki üremenin olmadığı zon çapı 2 - 3 mm arasında ise uçucu yağın bakterisidal etkisinin iyi, bu zon 3 milimetreden büyükse çok etkili, eğer üremenin görülmediği alan hiç yoksa aktivitenin olmadığını rapor etmiştir [172]. Buna göre araştırmamızda test edilen tüm uçucu yağların ve ana bileşenlerin test bakterileri ve *Candida* örnekleri üzerinde etkili oldukları söylenilebilir.

Mikrobrot Dilüsyon Metodu kullanarak uçucu yağların ve ana bileşenlerinin test bakterileri ve mayalara karşı MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri de belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 3.6' da µg/ml olarak verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *T. spathulifolius* ve *T. convolutus* uçucu yağları *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Escherichia coli* (ATCC 25292) ve

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) üzerinde 125 µg/ml ile inhibisyon etkisine sahip oldukları belirlenmiştir. *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) 250 µg/ml'lik değerle *Klebsiella pneumoniae* (klinik izolat) ise 500 µg/ml'lik değerle tüm test uçucu yağları tarafından inhibe edilmiştir. *C. albicans* (klinik izolat) üzerinde *T. spathulifolius* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağları 500 µg/ml ile *T. convolutus* ve *T. haussknechtii* uçucu yağlarının ise 250 µg/ml değer ile inhibisyon etkisine sahip oldukları saptanmıştır. *C. albicans* (ATCC 10231) üzerinde ise *T. spathulifolius*, *T. pectinatus* var. *pectinatus* ve *T. haussknechtii* uçucu yağları 250 µg/ml, *T. convolutus* uçucu yağı ise 125 µg/ml değer ile etkili olmuştur. *Shigella sonnei* (ATCC 25931) en iyi *T. pectinatus* var. *pectinatus* tarafından 250 µg/ml değer ile inhibe edilmiştir. *Serratia marcescens* (klinik izolat) üzerinde ise *T. haussknechtii* uçucu yağının 500 µg/ml, *T. spathulifolius*, *T. convolutus* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağlarının 250 µg/ml değer ile inhibisyon etkisine sahip oldukları saptanmıştır (Tablo 3.6).

T. spathulifolius'un ana bileşeni olan karvakrol ve *T. pectinatus* var. *pectinatus*'un 2. ana bileşeni olan timol'ün *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Escherichia coli* (ATCC 25292) üzerinde 500 µg/ml'lik değerle inhibisyon etkisine sahip oldukları belirlenmiştir. *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567) ise 500 µg/ml'lik değerle test edilen tüm ana bileşenler tarafından inhibe edilmiştir. Karvakrol, *T. haussknechtii* uçucu yağın ana bileşeni olan 1,8-sineol ve *T. pectinatus* var. *pectinatus*'un ana bileşenleri olan *p*-simen ve timol'ün *Campylobacter jejuni*'yi (ATCC 33291) 500 µg/ml'lik değerle inhibe ettikleri belirlenmiştir. *C. albicans* (klinik izolat) üzerinde karvakrol ve timol'ün 500 µg/ml ile, kamfor, 1-8 sineol, *p*-simen'in ise 1000 µg/ml değer ile inhibisyon etkisine sahip oldukları saptanmıştır. *C. albicans* (ATCC 10231) üzerinde ise test edilen tüm uçucu yağların ana bileşenleri 500 µg/ml değer ile etkili olmuşlardır (Tablo 3.6).

Birçok bitki türünden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmalarda gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere göre daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir [76, 78, 173, 174, 175].

Bazı araştırmalarda Gram negatif bakterilerin gram pozitiflerden farklı olarak hidrofobik bileşiklerin difüzyonunu kısıtlayan bir dış zara sahip olmaları, bu bakterilerin uçucu yağların antibakteriyel etkilerine karşı daha az hassas olmalarının nedeni olarak gösterilmiştir [33, 176]. Buna karşılık Deans ve arkadaşları bakterilerin uçucu yağlara karşı hassasiyeti üzerinde gram reaksiyonlarının çok az etkili olduğunu belirtmişlerdir [177, 178]. Bizim araştırmamızda gram pozitif ve gram negatif bakterilerin, test edilen *Thymus* uçucu yağlarına karşı duyarlılıklarında büyük bir farklılık saptanmamıştır.

Antifungal aktivite testleri sonucunda; uçucu yağ ve ana bileşenlerinin oluşturdukları zon çapları kontrol maddesi olarak kullanılan ketokonazol'e (13 - 22 mm) ait zonlarla karşılaştırıldığında daha küçük olmasına rağmen (uçucu yağların 7 - 9 mm, ana bileşenlerin 6,5 - 8 mm), test mikroorganizmaları üzerinde tüm uçucu yağların ve ana bileşenlerinin antifungal etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Tablo 3.7).

Filamentöz funguslara karşı uçucu yağların ve ana bileşenlerinin MİK değerleri de belirlenmiştir. Bu değerler Tablo 3.8' de µg/ml olarak verilmiştir.

Alternaria alternata üzerinde test uçucu yağları ve ana bileşenlerin 1000 µg/ml'lik değerle inhibisyon etkisine sahip oldukları saptanmıştır. *T. pectinatus* var. *pectinatus*, *T. haussknechtii*, *T. convolutus*' a ait uçucu yağlar ile ana bileşenlerden timol, karvakrol ve *p*-simen'in *Aspergillus flavus*'un üzerinde 500 µg/ml'lik değerle, *T. spathulifolius* uçucu yağının ise 250 µg/ml'lik değerle inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir. *P. lanosum* üzerinde ise *T. pectinatus* var. *pectinatus*, *T. spathulifolius* uçucu yağları ile karvakrol ve timol'ün 500 µg/ml, diğer bileşenlerin ise 1000 µg/ml ile inhibisyon etkisi gösterdikleri saptanmıştır (Tablo 3.8).

Test uçucu yağlarının ve ana bileşenlerinin antifungal aktivite çalışmaları kapsamın da fungus sporlarından gelişen koloniler üzerindeki % inhibisyon değerleri de belirlenmiştir.

T. spathulifolius uçucu yağının *Aspergillus flavus*'un gelişmesi üzerinde % 53' lük inhibisyon değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu oranın tüm antifungal aktivite sonuçları incelendiğinde en yüksek yüzde inhibisyon değeri olduğu görülmektedir. *Aspergillus flavus*'un gelişmesi üzerine karvakrol, timol, kamfor, 1,8-sineol ve *p*-simen'in sırasıyla % 30, % 28, %22, % 19 ve % 25 oranlarında etkili oldukları saptanmıştır. *Alternaria alternata*'nın koloni gelişimi üzerinde ise test uçucu yağları ve ana bileşenlerinin en düşük % inhibisyon değerine sahip oldukları (% 6 - 16) belirlenmiştir (Tablo 3.9).

Çok sayıda araştırmada *Thymus* uçucu yağlarının güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir [67, 97, 114, 115, 179 - 185].

Azaz ve arkadaşları *Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*, *T. zygoides* var. *lycaonicus*, *T. longicaulis* subsp. *longicaulis* var. *subisophyllus* ve *T. pulvinatus* türlerinden elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antikandidal ve antifungal aktivitelerini incelemişler ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* ve *Candida albicans*'a karşı uçucu yağların etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Antifungal aktivite sonuçlarına göre de *T. zygoides* var. *lycaonicus* uçucu yağının *Mucor hiemalis* sporlarını güçlü bir şekilde inhibe ettiği fakat *Penicillium clavigerum* ve *Absidia glauca* üzerinde etkili olmadığını rapor etmişlerdir [130].

Couladis ve arkadaşları *Thymus striatus* uçucu yağının kimyasal kompozisyonunu belirleyerek antifungal aktivitesini araştırmışlardır. GC/MS analizi ile ana bileşenlerini timol (% 59,5) ve *p*-simen (% 6,3) olarak belirlemişlerdir. Antifungal aktivite testlerinde *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Trichophyton*, *Microsporum* ve *Epidermophyton* türleri kullanmışlar ve uçucu yağın bütün test fungusları üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir [186].

Delespaul ve arkadaşları çeşitli uçucu yağların antifungal aktivitelerini incelemiş, farklı funguslar üzerine uygulanan yağlardan oldukça iyi sonuçlar aldıklarını, özellikle *Thymus vulgaris* uçucu yağının orta derecede MİK değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [187].

Dorman ve Deans uçucu yağ bileşenlerinin bu yağların antimikrobiyal aktivite özellikleri ve etki mekanizmaları üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir [5].

Agarwal ve Mathela (1979) ve Agarwal ve arkadaşları (1979) yaptıkları araştırmalarda *T. serpyllum* uçucu yağının antifungal aktivitesini timol ve karvakrol'e dayandırmışlardır. Zambonelli ve arkadaşları timol ve karvakrolün fungus sitoplazmik içeriğine karışarak fungus hif yapısının bozulmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Antifungal aktiviteleri bakımından terpenik alkoller (geraniol, nerol, citronellol, terpineol, borneol, farnesol), aldehitler (sital, sitronellal), ketonlar (kamfor, karvon) dikkate değer etki gösterirken, hidrokarbonlar (osimen, limonen) düşük aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Terpenik alkollerden de monoterpenik yapıda ve hidroksil grubu terminal karbona bağlı olan (geraniol, nerol ve citronellol) daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir [93, 181, 188, 189].

Dob ve arkadaşları *Thymus algeriensis* uçucu yağını GC ve GC/MS ile analiz etmişler ve bileşenlerinin % 79,5 oranında oksijenik monoterpenlerden oluştuğunu ana bileşenlerinin i linalool (% 47,3), timol (% 29,2) ve *p*-simen (% 6,8) olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *T. algeriensis* uçucu yağının 4 bakteri, 2 maya ve 2 filamentöz fungusu karşı antimikrobiyal aktivitesini de belirlemişlerdir. Uçucu yağın çalışılan mikroorganizmalar içinde *Bacillus subtilis* ve *Mucor ramaniamus* karşı kuvvetli aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [190].

Çalışmamızda kullandığımız *Thymus* uçucu yağlarının GC ve GC/MS sonuçlarına göre belirlenen ana bileşenlerinin oksijenik monoterpenler, fenolik monoterpenler, monoterpen hidrokarbonlar ve aromatik hidrokarbonlar olduğu belirlenmiştir.

Cosentino ve arkadaşları aromatik hidrokarbondan *p*-simen, monoterpen hidrokarbonlardan α pinen ve γ -terpinen, oksijenik monoterpenlerden α -terpineol ve linalool ve fenolik monoterpen olan timol ve karvakrol ile yaptıkları araştırmada karvakrol ve timol'ün, denenen bileşikler içerisinde en kuvvetli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir [67]. Genellikle yüksek oranda timol ve

karvakrol gibi fenolik bileşikler içeren uçucu yağların güçlü antimikrobiyal özellik gösterdiği çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir [67, 5]. Timol ve karvakrol birbirinin izomeridir ve aralarındaki fark hidroksil grubunun pozisyonudur [68, 104, 173]. Aromatik ve fenolik bileşiklerin stoplazmik membranın yapısı ve fonksiyonunu değiştirerek antimikrobiyal etki gösterdiği konusunda güçlü bir fikir birliği bulunmaktadır [191]. Lambert ve arkadaşları yaptıkları araştırmada timol ve karvakrol'ün hücre membran permabilitesini arttırdıklarını tespit etmişlerdir [173]. Genellikle hücreden potasyum akışı hücre hasarının ilk işaretidir ve daha sonra bunu sitoplazmik bileşenlerin akışı izler [103, 173, 192 - 196]. Sitoplazmik membranının seçici geçirgenlik özelliğinin kaybı uçucu yağların neden olduğu hücre ölüm şekillerindedir [197].

Uçucu yağların sebep olduğu hücresel membran fonksiyon bozukluğu ve bu yapısal bozulmanın yol açtığı etkiler iyon taşıma ve depolarizasyondan kaynaklanan pH gradientinde ve elektriksel potansiyelde dağılmaya neden olduğu ve bununla birlikte uçucu yağların hücrede enerji (ATP) üretim sistemine müdahale ederek de etki gösterdikleri çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir [103, 173, 198].

Karvakrol'ün antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması üzerine bir araştırma sonucuna göre de karvakrol'e maruz bırakılan hücresel membranlar potasyum iyonlarına ve protonlarına karşı geçirgen hale gelmektedir. Bundan dolayı hücresel iç ortamın pH'sı düşmekte ve membran potansiyeli dağılmaktadır. Sonuç olarak ATP sentezlenememekte ve hücre ölümü meydana gelmektedir [103, 199]. Benzer yapıda olan karvakrol ve timol'ün, hidroksil grubu taşıdıklarından ve yapılarında delokalize elektronlar bulunduğundan güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yapılan bir araştırmada rapor edilmiştir [103].

Timol'ün antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* ve *Candida albicans* üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [5, 30, 67].

Terpenik bileşenlerin mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla beraber bazı çalışmalara göre terpenik bileşenlerin hidrofobik özelliklerine dayanarak stoplazmik membrana zarar verdiği, hücre içeriğini pıhtılaştırdığı ve proton pompasını bozduğu düşünülmektedir [200].

Ultee ve arkadaşları hidrofobik yapıda ve aromatik hidrokarbon bir bileşik olan *p*-simen'in stoplazmik membranda genişlemeye ve şişmeye neden olduğunu rapor etmişlerdir [103]. Başka bir çalışmada da *p*-simen'in timol ve karvakrol'ün aktivitesi üzerinde sinerjik etki yaptığını belirtilmektedir [199].

Yapılan çok sayıda çalışmada 1,8 sineol, *p*-simen, α pinen, kamfor, γ -terpinen, borneol'ün antimikrobiyal aktivite özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir [30, 67, 175, 201 - 207]. Bu durum bizim çalışmamızda yüksek oranda karvakrol, timol, kamfor, 1,8 sineol, *p*-simen içeren tüm test uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin sebebini açıklamamıza katkı sağlamaktadır.

Mevy ve arkadaşları uçucu yağların kimyasal kompozisyonunu oluşturan tek bir bileşenin bile uçucu yağların antimikrobiyal etkisinin değişiminde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir [200].

Çeşitli çalışmalarda, uçucu yağların ana bileşenlerine göre antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmekle birlikte minor bileşenlerin de antimikrobiyal aktivitede kritik rol oynadıklarını ve diğer bileşenlerle sinerjik veya antagonistik etki oluşturmalarının mümkün olabileceği belirtilmektedir [30, 34, 68, 69, 70, 71, 208].

Araştırmamızda kullandığımız *Thymus* uçucu yağların test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkileri uçucu yağlarımızın ana bileşenleri olan timol, karvakrol, kamfor, *p*-simen ve 1-8 sineole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Araştırmamızda kullanılan tüm bitki örneklerinden elde edilen uçucu yağların ve ana bileşenleri olan timol, karvakrol, kamfor, 1,8 sineol, *p*-simen'nin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini

yöntemi kullanılmıştır. Antioksidan aktivite belirlemede DPPH molekülü yaygın olarak kullanılmaktadır [209]. DPPH molekülü elektron/hidrojen aldığında kararlı hale geçer ve rengi mor renkten sarı renge dönüşür, böylece renk kaybetme derecesine göre test materyallerinin serbest radikal süpürücü etkisi belirlenmiş olur [166, 209].

Çalışmamızda uçucu yağların ve anabileşenlerinin antioksidan etkileri sentetik bir antioksidan olan BHA ile karşılaştırılmıştır. Test ettiğimiz bütün uçucu yağlar farklı %'de DPPH üzerinden serbest radikal süpürme etkisi göstermiştir. Uçucu yağların anabileşenlerinden *T. spathulifolius* anabileşeni olan karvakrol ve *T. pectinatus* var. *pectinatus*'un 2. anabileşeni timol DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki gösterirken kamfor, 1,8 sineol, *p*-simen çalıştığımız konsantrasyon aralığında (100 - 1000 µg/ml) DPPH üzerinden süpürücü etki göstermemiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *T. spathulifolius*, *T. convolutus*, *T. haussknechtii* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağlarının 100 µg/ml konsantrasyonların da serbest radikal süpürücü etki aktiviteleri sırasıyla %22,26 ± 0,49, %6,49 ± 0,22, %6,90 ± 0,15 ve %25,20 ± 0,38 olarak belirlenmiştir. Karvakrol ve timol'un de 100 µg/ml konsantrasyonların da serbest radikal süpürücü etki aktiviteleri sırasıyla 22,23 ± 0,39 ve 17,24 ± 0,35 olarak saptanmıştır. 1000 µg/ml konsantrasyonlarında ise *T. spathulifolius*, *T. convolutus*, *T. haussknechtii* ve *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağları sırasıyla DPPH'in serbest radikallerini %77,31 ± 0,21, %33,39 ± 0,25, %35,11 ± 0,22 ve %93,60 ± 0,41 oranlarında süpürebildikleri belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonda karvakrol ve timol ise %67,63 ± 0,31 ve %75,56 ± 0,28 oranlarında DPPH'in serbest radikallerini süpürebildikleri görülmüştür. Sentetik bir antioksidan olan BHA'nın 100 µg/ml konsantrasyonda DPPH serbest radikal süpürücü etki aktivitesi %93,79 ± 0,75 olarak saptanmıştır (Tablo 3.10).

Tepe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada timol ve karvakrol'un DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü aktivitesinin olduğunu belirlemişler bunun yanı sıra kamfor, borneol, *p*-simen, 1,8-sineol, α -pinen, β -pinen'in ise DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü aktivitesini saptayamadıklarını rapor etmişlerdir [117].

Sonboli ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada γ - terpinen ve *p*-simen'in DPPH üzerinden serbest radikallerini süpürücü etkilerini belirlemişler ve *p*-simenin oldukça düşük antioksidan etki gösterdiğini saptamışlardır. γ - terpinenin DPPH üzerinden serbest radikalleri %50 oranında süpürdüğü konsantrasyonu 15,5 mg/ml, *p*-simen'in % 50 oranında süpürdüğü konsantrasyonu ise 148,5 mg/ml olarak belirlemişlerdir [210].

Uçucu yağların antioksidan potansiyelleri üzerinde oksijenik monoterpenlerin özellikle fenolik bileşen olan timol ve karvakrol'un oldukça etkili olduğu rapor edilmiştir. [211 - 214]. Monoterpen hidrokarbonların da antioksidan aktiviteleri gözlenmiş olmasına rağmen oksijenik monoterpenlerin antioksidan aktivitelerinin monoterpen hidrokarbonlara göre daha güçlü olduğu belirtilmiştir [213].

Bizim çalışmamızda da anabileşeni karvakrol olan *T. spathulifolius* ve ana bileşeni timol ve *p*-simen olan *T. pectinatus* var. *pectinatus* uçucu yağının DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü aktivitesi, ana bileşenleri sırasıyla 1,8 sineol ve kamfor olan *T. haussknechtii* ve *T. convolutus* uçucu yağlarına göre oldukça yüksek değerde belirlenmiştir (Tablo 3.10).

Bitkilerin sekonder metaboliti olan uçucu yağların antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikler taşımasından dolayı, bu ürünlerden yararlanmanın bilimsel ve ekonomik açılarından yarar sağlayacağı düşüncesindeyiz. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan test edilen tüm uçucu yağların test mikroorganizmaları üzerinde belirli ölçülerde antimikrobiyal etki gösterdiğini görmekteyiz. Ayrıca test uçucu yağlarının antioksidan aktivite gösterdikleri de belirlenmiştir. Dolayısıyla test edilen bu uçucu yağların daha ileri boyutlarda toksikolojik ve farmakolojik özelliklerinin araştırılmasından sonra tıp, gıda, kozmetik ve diğer endüstriyel alanlarda kullanımlarının söz konusu olabileceğini düşünmekteyiz.

5- EKLER

5.1 Antimikrobiyal Aktivite Testlerinde Kullanılan Besiyerleri ve Standartlar

Mueller Hinton Broth (Oxoid) (Çift Kuvvet)

Et ekstresi.....	4 gr
Kazein hidrolizati.....	35 gr
Nişasta.....	3 gr

Seksen dört gr Mueller Hinton Broth (Oxoid) besiyeri 1000 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra tüplere 10'ar ml paylaştırılarak 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Mueller Hinton Agar (Oxoid)

Et ekstresi.....	4 gr
Agar.....	17 gr
Kazein hidrolizati.....	17,5 gr
Nişasta.....	1,5gr

Otuz sekiz gr Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyeri 1000 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Listeria Selektive Agar Base (Oxoid)

Columbia Blood Agar Base.....	39 gr
Aesculin.....	1 gr
Ferrik ammonyum sitrat.....	0,5 gr
Lityum klorid.....	15 gr

Yirmi yedi tam yüzde yetmiş beş gr Listeria Selektive Agar Base (Oxoid) besiyeri 500 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra 121 °C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içerisine Listeria Selektive Supplement (Oxoid) katılıp 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15’er ml dökülmüştür.

Listeria Selektive Supplement (Oxoid)

Sikloheksimid.....	200 mg
Kolistin sülfat.....	10 mg
Akriflavin.....	2,5 mg
Sefotetan.....	1 mg
Fosfomisin.....	5 mg

İçerisine 5 ml % 70 ’lik etil alkol katıldıktan sonra 50 °C’ ye kadar soğutulmuş steril Listeria Selektive Agar Base (Oxoid)’e ilave edilmiştir.

Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid)

Tripton soya broth.....	30 gr
Yeast ekstrakt.....	6 gr
Potasyum dihidrojen orthofosfat.....	1,35 gr
Di-sodyum hidrojen orthofosfat.....	9,6 gr

Yirmi üç tam onda beş gr Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) besiyerine 500 ml distile su ilave edilip hazırlandıktan sonra içerisine Modifiye

Listeria Selektive Enrichment Supplement (Oxoid) ilave edilip, tüplere 10'ar ml paylaşdırılarak 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Modifiye Listeria Selektive Enrichment Supplement (Oxoid)

Nalidiksik asit.....	20 mg
Amfotericin B	5 mg
Acriflavine.....	7,5 mg

Supplement 2 ml steril distile su sulandırılmıştır ve Buffered Listeria Enrichment Broth Base (Oxoid) besiyerine katılmıştır.

Colombia Agar Base (Oxoid)

Pepton.....	23 gr
Nişasta.....	1 gr
Sodyum klorid.....	5 gr
Agar.....	10 gr

Otuz dokuz gr Colombia Agar Base (Oxoid) besiyeri 500 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine steril defibrile at kanı (Oxoid) katılıp 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Sabouraud Dextrose Agar (Merck)

Bacto Pepton.....	10 gr
Bacto Dekstroz.....	40 gr
Agar.....	15 gr

Atmış beş gr Sabouraud Dextrose Agar (Merck) besiyeri 1000 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril

edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Sabouraud Dextrose Broth (Merck) (Çift Kuvvet)

Bacto Pepton.....10 gr
Bacto Dekstroz.....20 gr

Atmış gr Sabouraud Dextrose Broth (Merck) besiyeri 1000 ml distie su ilave edilerek hazırlanmıştır ve daha sonra tüplere 10'ar ml paylaşılırak 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Malt Ekstrakt Agar (Merck)

Malt extract toz.....20 gr
Pepton.....1 gr
Gluköz.....20 gr
Agar.....15 gr

Elli altı gr Malt Ekstrakt Agar besiyeri 1000 ml ditile su ilave edilerek hazırlanmış ve 121⁰C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

Czapek Dox Agar (Merck)

Sodyum nitrat (NaNO₃).....2 gr
Potasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄).....1 gr
Magnezyum sülfat (MgSO₄.7H₂O).....0,5 gr
Potasyum klorür (KCl).....0,5 gr
Demir sülfat (FeSO₄).....0,01 gr
Sükroz.....30 gr
Agar.....20 gr

Elli dört gr Czapek Dox Agar besiyeri 1000 ml distile su ilave edilerek hazırlanmış ve 121⁰C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 15'er ml dökülmüştür.

McFarland No:0.5 Bulanıklık Standardı

BaCl₂ (%1.175).....0,5 gr
H₂SO₄ (0.36N).....99,5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karışımı 15 ml'lik kapaklı tüplere dağıtılmış, kapağı parafilm ile sıkıca kapatılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- [1] Çubukçu,B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütüpınar, N., Meriçli F. Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, (2002), 1.
- [2] Öztürk, M. S., Ekonomik Botanik, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, Erzurum, (1986), 40.
- [3] Acartürk, R., Şifalı bitkiler Flora ve Sağlığımız, Reprovizyon Ltd. Şti., Ankara (1997), 2.
- [4] Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul (1999), 3.
- [5] Dorman, H.J.D., Deans, S.G., “Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils”, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, (2000) 308.
- [6] Baydar, H., Tıbbi, Aromatik ve Keyf bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, 51, SDÜ basımevi, (2005), 77
- [7] WHO monographs on selected medicinal plants, World Health Organization, Geneva, **1**, (1999), 1.
- [8] Eloff, J.N., “Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?”, *J. Ethnopharmacology*, **60**, (1998) 1.
- [9] Kırbağ, S., “Hypericum perforatum L. ’un Değişik Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri”, *Journal of Qafqaz University*, **2/1** (1999) 102.
- [10] Schilcher, H. “The significance of phytotherapy in Europe”, *Zeitschrift für Phytotherapie*, **14**, (1993), 132.
- [11] Öztürk, Y., “İlaç ve tıbbi bitkiler yönünden Hindistan’a bakış”, *Pharmacia YJTPA*, **30/3**, (1990) 145.

- [12] Sayar, A., Güvensan, A., Özdemir, F., Öztürk, M., “Muğla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri”, *The Herb Journal Of Systematic Botany*, **2/1**, (1995) 151.
- [13] Tekeli, Y., Sezgin, M., “*Centaurea Carduiformis* (Peygamber Çiçeği)’in Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi”, *Sdü Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi (E-Dergi)*, **2/2**, (2007) 204.
- [14] Nawar, WW., *Lipids. Food Chemistry*, OR Fennema (ed), Marcel Dekker Inc., New York. (1985), 139.
- [15] Choi, H.S., Song, H.S., Ukeda, H. ve Sawamura, M., “Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl”, *J. Agric. Food Chem.*, **48/9**, (2000), 4156.
- [16] Pokorny J., “Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?”, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109** (2007) 629.
- [17] Aburjai, T. ve Natsheh, F.M., “Plants Used in Cosmetics”, *Phytotherapy Research*, **17**, (2003) 987.
- [18] Hall III C., Source of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources, in J Pokorny, N Yanislhlieva and M Gordon (eds), *Antioxidants in Food, Practical Applications* Woodhead Publishing Ltd., Cambridge (2001), 169.
- [19] Çakatay, U., Kayalı, R., “Serbest Radikal Biyokimyasının Tarihsel Süreçteki Gelişimi”, *Cerrahpaşa tıp dergisi*, **37**, (2006) 162.
- [20] Frei, B., *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, Academic Press, San Diego. (1994), 10.
- [21] Riemersma, R. A., “Epidemiology and the role of antioxidants preventing coronary heart disease: a brief overview”, *Proc. Nutr. Soc.*, **53**, (1994) 59.
- [22] Mackerras, D., “Antioxidants and health. Fruits and vegetables or supplements?” *Food Australia*, **47S**, (1995) 3.
- [23] Halliwell, B., “Antioxidants in human health and disease”, *Ann. Rev. Nutr.*, **16**, (1996), 33.
- [24] Schwartz, J.L., “The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth”, *J. Nutr.*, **126S**, (1996) 1221.

- [25] Yanishlieva, N. V., Marinova, E., Pokorny, J., "Natural antioxidants from herbs and spices", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **108** (2006) 776.
- [26] Bandoniene, D., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D., Murkovic, M., "Antioxidative activity of sage(*Salvina officinalis* L.) savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borage officinalis* L.) extracts in rapeseed oil", *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **104**, (2002) 286.
- [27] Vareltzis K, Koufidis D, Gavriilidou E, Papavergou E, Vasiliadou S., "Effectiveness of natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage", *Z Lebensm Unters Forsch A*, **205**, (1997) 93.
- [28] Akgül, A. "Baharatların antioksidan özellikleri", *Doğa-TR. J. of Agriculture and Forestry*, **13**, (1989),11.
- [29] Akgül, A., Ayar, A., "Yerli baharatların antioksidan etkileri" *Doğa-TR. J. of Agriculture and Forestry*, **17**, (1993) 1061.
- [30] Burt, S., "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review", *International Journal Of Food Microbiology*, **94**, (2004) 223.
- [31] Tümen, G., Satıl, F., Yıldırım, O., "Trakya ve Batı Anadolu'da Yetişen *Satureja* Türlerinin Sistemik Revizyonu ve Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimlerinin Mukayesesi", 95/9, Balıkesir Araştırma Fonu İşletme Müdürlüğü, **155**.
- [32] Nakipoğlu, M., Otan, H., "Tıbbi Bitkilerin Flavonoidleri, Anadolu", *Journal of AARI*, **4 /1**, (1992) 70.
- [33] Skočbušić, M., Bezić, N., Dunkić, V., "Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis.growing in Croatia", *Food Chemistry*, **96**, (2006) 20.
- [34] Mourey, A., Canillac, N., "Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers", *Food Control* **13**, (2002) 289.
- [35] Pawar, V. C. ve Thaker, V. S., "In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*" *Mycoses*, **49**, (2006) 316.

- [36] Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro L.G., Carvalho, L., "Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*", *Food Chem.*, **86**, (2004) 183.
- [37] Tomaino, A, Cimino, F., Zimbalatti, V., *et al.*, 'Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils', *Food Chem.* **89**: (2005) 549.
- [38] Ultee, A., Smid, E.J., "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Basillus cereus*", *International Journal of Food Microbiology*, **64**, (2001) 373.
- [39] Sinico C, De Logub A, Laia F *et al.*, "Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity", *Eur J Pharm Biopharm*, **59**, (2005) 161.
- [40] Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S., "Essential oil compounds as potent source of nematocidal compounds" *Journal of Phytopathology* **148** (7–8), (2000) 501.
- [41] Meister, A., Bernhardt, G., Christoffel, V., Buschauer, A., "Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects", *Planta Medica*, **65**, (1999) 512.
- [42] Brasseur, T., "Etudes botaniques, phytochimiques et pharmacologiques consacrées au Thym.", *Journal de Pharmacie de Belgique*, **38**, (1983) 261.
- [43] Puatanachokchai, R., Kishida H, Denda A *et al.*, "Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats.", *Cancer Lett*, **183**, (2002) 9.
- [44] Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi S *et al.*, "Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of *Satureja Khuzestanica* in rat *in vivo*: a toxicopharmacological study.", *Med Sci Monit*, **9**, (2003) 331.
- [45] Zouaria, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A., "Chemical composition, angiotensinI-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae)", *Food And Bioproducts Processing*, (2011) basında

- [46] Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., "Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, (1998) 1111.
- [47] Isman, M. B., "Plant essential oils for pest and disease management", *Crop Protection*, **19**, (2000) 603.
- [48] Khanum, M. N., Yamaguchi, T., Hiroishi, S., Muraoka, F., Takamura, H., Matoba, T., "Radical-scavenging activities of fish and fishery products", *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, (1999) 193.
- [49] Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. And Haroutounian, S. A., "Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species", *Z.Naturforsch*, **57c**, (2002) 287.
- [50] Ceylan, A., *Tıbbi Bitkiler II (:Uçucu Yağ İçerenler)*, 481, Ege Üniversitesi ziraat fakültesi yayımları, 2. baskı Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, (1997), 1.
- [51] Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., "Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union, CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing", *Countries, Rotterdam* (1999), 116.
- [52] Bauer, K., Garbe, D., *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*, *VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim* (1985), 213.
- [53] Van Welie, Alle, R.T.H., "Cosmetica ingredienten en hun functies", *Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein*, (1997) 126.
- [54] Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J., "S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound", *Industrial Crops and Products*, **4**, (1995) 23.
- [55] Boyle, W., "Spices and essential oils as preservatives", *The American Perfumer and Essential Oil Review*, **66**, (1955) 25.
- [56] Guenther, E., *The Essential Oils*, D. Van Nostrand, New York (1948). 3.
- [57] Alma, M.H., Mavi, A., Yıldırım, A., Dıgrak, M., Hirata, T., "Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey", *Biol. Pharm. Bull.*, **26**,(2003) 1725.

- [58] Valero, M., Salmerón, M. C., “Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth”, *International Journal of Food Microbiology*, **85**, (2003) 73.
- [59] Palombo, E.A., Semple, S.J., “Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants”, *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, (2001) 151.
- [60] Faleiro, M. L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., & Pedro, L.G., “Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*”, *Letters in Applied Microbiology*, **36**, (2003) 35.
- [61] Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z., “Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities”, *Food Chemistry*, **89**, (2005) 191.
- [62] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Lcke, E., Vivanco, J.M., “Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Acimum* Accessions”, *Food Chemistry*, **83**, (2003) 547.
- [63] Rice-Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., “The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids”, *Free Radical Research*, **22/4**, (1995) 375.
- [64] Pekkarinan, S.S., Heinonen I.M., Hopia, A.I., “Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+) -catechin as antioxidants in methyl linoleate”, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, (1999) 499.
- [65] Burda, S., Oleszek, W., “Antioxidant and antiradical activities of flavonoids”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, (2001) 2774.
- [66] Lawrence, B.M., and Tucker, A.O, The Genus *Thymus* as a source of commercial products, in Stahl-Biskup and Saez (eds) *The genus Thymus*, Taylor & Francis, London (2002) 252.
- [67] Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas, F., “In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils”, *Letters in Applied Microbiology*, **29**, (1999) 130.
- [68] Marino, M., Bersani, C., Comi, G., “Impedance measurement to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae”, *International Journal of Food Microbiology*, **67**, (2001) 187.

- [69] Lattaoui, N., Tantaoui-Elaraki, A., "Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils", *Rivista Italiana EPPOS*, **13**, (1994) 13.
- [70] Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven., B., "Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain", *Journal of Food Protection*, **58/1**, (1995) 81.
- [71] Marino, M., Bersani, C., Comi, G., "Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bio-impedometric method" *Journal of Food Protection*, **62/9** (1999) 1017.
- [72] Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", *J. Agric. Food Chem.*, **47**, (1999) 3954.
- [73] Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Spais, A.B., "Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation", *Food Research International*, **36**, (2003) 207.
- [74] Stahl-Biskup E., Essential oil chemistry of the genus *Thymus* a global view, in Stahl-Biskup and Saez (eds) *The genus Thymus*, Taylor & Francis, London (2002), 75.
- [75] Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G., "GC/MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, (2000) 2576.
- [76] Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., "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**, (2000) 516.
- [77] Jerkovic, I., Mastelic, J., Milos, M., "The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia", *International Journal of Food Science & Technology*, **36**, (2001) 649.
- [78] Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., "Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils", *International Journal of Food Microbiology*, **74**, (2002) 101.

- [79] Senatore, F., "Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, (1996) 1327.
- [80] Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A., "Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, (1998) 3741.
- [81] Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim (2001).
- [82] Arras, G., Grella, G.E., "Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimycotic activity", *Journal of Horticultural Science*, **67/2**, (1992) 197.
- [83] Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., "Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity", *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, (1994) 125.
- [84] McGimpsey, J.A., Douglas, M.H., Van Klink, J.L., Beauregard, D.A., Perry, N.B., "Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand", *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, (1994) 347.
- [85] Lis-Balchin, M., Ochoka, R.J., Deans, S.G., Asztemborska, M., Hart, S., "Differences in bioactivity between the enantiomers of α -pinene", *Journal of Essential Oil Research*, **11**, (1999) 393.
- [86] Larson, K.C., Berry, R.E., "Influence of Peppermint Phenolics and Monoterpenes on Two spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae)", *Environ. Entomol.*, **13**, (1984) 282.
- [87] Morales, R., The history, botany, and taxonomy of genus *Thymus*, in Stahl-Biskup and Saez (eds) *The genus Thymus*, Taylor & Francis, London. (2002), 1.
- [88] El-Gazzar, A., Watson L., "A taxonomic study of Labiatae and related genera", *New Phytol.*, **69**, (1970) 451.
- [89] El-Gazzar, A., Watson L., "Some Economic Implications of the Taxonomy of Labiatae Essential oils and Rusts", *New Phytol.*, **69/2**, (1970) 487.

- [90] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk G., Bekat, L., Leblebici, E., Tohumlu Bitkiler Sistematığı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları 116, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, (2000), 276.
- [91] Zeybek, U., Zeybek, N., Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri, (Değiştirilmiş 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 3, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, (2002), 378.
- [92] Kartesz, J. T, Kartesz, R., A Synonymized Checklist of the Vaskular Flora of the United States, Canada, and Greenland, vol. II, The Univ. of North Caroline Press, Chapel Hill. (1980), 101.
- [93] Zarzuelo, A., ve Crespo E., The medicinal and non-medicinal uses of thyme, in Stahl-Biskup and Saez (eds) The genus *Thymus*, Taylor & Francis, London (2002) 263.
- [94] Hedhili, L., Romdhane, M., Abderrabba, .A., Planche, H., Cherif, I., "Variability in essential oil composition of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link.", *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, (2002) 26.
- [95] Rasooli, I., Mirmostafa, S.A., "Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *thymus serpyllum* essential oils", *Fitoterapia*, **18**, (2002) 244.
- [96] Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C., "Analysis of essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria", *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, (2005) 235.
- [97] Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., "Growth inhibition and morfological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*", *Food Control*, **17**, (2006) 359.
- [98] Jia, H.L., Ji, Q.L., Xing, S.L., Zhang, P.H., Zhu, G.L., Wang, X.H., "Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg.", *Journal of Food Science*, **75/1**, (2010) 59.
- [99] Bağcı, E. ve Başer, K.H.C., "Study of essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Holen var. *kotschyanus* (lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey", *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, (2005), 199.
- [100] Tümen, G., Kirimer, N. ve Başer, K.H.C., "Composition of the essential oils of *Thymus* species growing in Turkey", *Chemistry of Natural Compounds*, **31**, (1995) 42.

- [101] Başer, K.H.C., Tmen, G., zek, T., Krkulu, M., "Halk ilacı olarak kullanılan *Thymus sibthorpii* Bentham", 9. Bitkisel İla Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, (16-19 Mayıs 1991), 389.
- [102] Işık, S., Gnz, A., Arslan, ., Öztürk, M., "Afyon (Türkiye) ilindeki bazı trlerin etnobotanik zellikleri", *Ot Sistematiik Botanik Dergisi*, **2**, (1995) 161.
- [103] Ultee, A., Bennink, M.H.J., Moezelaar, R., "The phenolic hydroxyl group of carvacrol is the essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*", *Applied and Environmental Microbiology*, **68/4**, (2002), 1561.
- [104] Kokkini S., Karaousou R., Dardioti A., Krigas N., Lanaras T., "Autumun essential oils of Greek Oregano", *Phytochemistry*, **44**, (1997) 883.
- [105] Başer, K.H.C., Krkulu, M., Tmen, G., Sezik, E., "Composition of the Essential Oil of *Thymus eigii* (M. Zohary et P.H. Davis) Jalas from Turkey", *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (1996) 85.
- [106] Başer, K.H.C., Demirci, B., Kirimer, N., Satıl, F., Tmen, G., "The essential oils of *Thymus migricus* and *T. fedtschenkoi* var. *handelii* from Turkey", *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, (2002) 41.
- [107] Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H., "Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*", *Phytotherapy Research*, **18**, (2004) 990.
- [108] Başer, K.H.C., Kirimer, N., zek, T., Krkulu, M., Tmen, G., "The Essential Oil *Thymus leucostomus* var. *argillaceus* ", *J. Essent. Oil Res.*, **4**, (1992) 421.
- [109] Başer, K.H.C., Kirimer, N., Ermin, N., Krkulu, M., Tmen, G., "Essential Oils from Four Chemotypes of *Thymus zygioides* Griseb. var. *lycaonicus* (Celak) Ronniger", *J. Essent. Oil Res.*, **8**, (1996) 615.
- [110] Başer, K.H.C., zek, T., Krkulu, M., Tmen, G., Yıldız., B., "Composition of Essential Oils of *Thymus leucostomus* Hausskn. et Velen var. *gypsaceus* Jalas and *Thymus pubescens* Boiss. et Kotschy ex Celak var. *cratericola* Jalas", *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999) 776.
- [111] Tmen, G., Yıldız., B., Kirimer, N., Krkulu, M., Başer, K.H.C., "Composition of the Essential Oil of *Thymus fallax* Fisch. et Mey. from Turkey", *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999) 489.

- [112] Başer, K.H.C., Demirci, B., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G., “Essential Oil of *Thymus zygioides* Griseb. var. *zygioides* from Turkey”, *J. Essent. Oil Res.*, **11**, (1999) 409.
- [113] Megalla, S.E., El- Keltawi, N.E.M ve Ross, S.A., “A study of antimicrobial action of some essential oil constituents”, *Herba Pol.*, **26**, (1980) 181.
- [114] Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M., Alonzo, V., Carlone N.A., “Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods”, *Journal of Applied microbiology*, (2006) 1.
- [115] Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueriedo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., “Chemical Composition, Antioksidant and Antibacterial Activities of The Essential Oils Isolation from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. Et Link.”, *Food Chemistry*, **105**, (2007) 146.
- [116] Maksimović, Z., Milenković, M., Vučićević, D., Ristić M., “Chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*) essential oil”, *Cent. Eur. J. Biol.*, **3/2**, (2008) 149.
- [117] Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou M., Sökmen, A., “Antioxidative Activity of The Essential Oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*”, *J. Of Food Engineering*, **66**, (2005) 447.
- [118] Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho L. “Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*”, *Food Chemistry*, **86**, (2004) 183.
- [119] Azaz, A.D., Kucukbay, Z., Celen, S., Kuyumcu, E., Yildiz, B. “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Thymus eigii* M. Zohary & P. H. Davis essential oil”, *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, **4**, (2010) 17.
- [120] Sarıkürkçü C., Özer M. S., Eskici M., Tepe B., Can Ş., Mete E., “Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*”, *Food and Chemical Toxicology*, **48** (2010) 1801.
- [121] Baytop, T., Farmakognozi ders kitabı, 1, İstanbul Üniversitesi Yayını No:1810, Baha matbaası, (1972), 155.

- [122] Özyurt, M.S., Ekonomik Botanik, Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 47, Kayseri, (1992), 13.
- [123] Baytop, T., Farmakognozi, 1, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3399, Ecz. Fak., 51, İstanbul, (1986), 156.
- [124] Tanker, M., Tanker, N., Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını No:65, Ankara, (1990), 269.
- [125] Lahlou, M., "Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils", *Phytother. Res.*, **18**, (2004) 435.
- [126] Özatlı, N.S., Bitlis Yöresinde Yetişen Endemik *Thymus fedtschenkoi* Ronniger var. *handeli* (Ronniger) Jalas Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Korolojik Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (1999).
- [127] Hiçsönmez, Ü., Eral, M., "Nükleer Teknolojide Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Yeri ve Uygulamaları" 8. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi 15-17 Ekim 2003, Kayseri.
- [128] Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Island, 7, Univ. Press, Edinburg, (1982), 349.
- [129] Yıldız B., Tümen G., Demirkuş, N., Adıgüzel, N., Akyalçın, H., Bahçecioğlu, Z., "Türkiye'de yetişen *Thymus* L. (Lamiaceae) Türlerinin Revizyonu ve Türler Üzerinde Palinolojik ve Kimyasal Araştırmalar," TBAG-1715 (198T003), Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, (2004), 20.
- [130] Azaz, A.D., İrtem, H.A., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., "Composition and the *in vitro* Antimicrobial Activities of the Essential Oils of some *Thymus* Species", *Z. Naturforsch.*, **59c**, (2004) 75.
- [131] Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., Sahin, F., "The In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts of Endemic *Thymus spathulifolius*", *Food Control*, **15**, (2004) 627.
- [132] Erdem, B., Campylobacter ve Helicobacter. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ustaçelebi, Ş.(edi.) Güneş Kitabevi, Ankara, (1999), 531.
- [133] Karaboz, İ., gıdaların Korunması ve Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi Çökmüş, C., (çeviri editörü) Palme Yayıncılık, Ankara, (2010), 923.

- [134] Erdem, B., Enterobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ustaçelebi, Ş.(edi.) Güneş Kitabevi, Ankara, (1999), 472.
- [135] Hasenekoğlu, İ., ve Yeşilyurt, S., Mikrobiyoloji, Erzurum (2002), 12.
- [136] Bilgehan, H., Klinik Mikrobiyoloji (Özet Bakteriyoloji), Barış Yayınları, İzmir, (2000), 25.
- [137] Keskin, N., Prokaryotik Çeşitlilik: Bakteriler. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi Çökmüş, C., (çeviri editörü) Palme Yayıncılık, Ankara, (2010), 353.
- [138] Midi, İ., Ekinci, G., Yaroğlu, S., Aktan, S., "Listeria Monositogeneze Bağlı Beyin Absesi: Olgu Sunumu", *Fırat Tıp Dergisi*, **10/1**, (2005) 36.
- [139] Faber, J. M. & Peterkin, P. I., "Listeria monocytogenes: A foodborne pathojen" *Microbiology Review*, **55**, (1991) 476.
- [140] Van-Renterghen, B., Hysmen, F., Rygole, R., & Verstraete, W., "Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the aricultural ecosystem" *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, (1991) 211.
- [141] Ekici, K., İşleyici Ö., Sağun, E. " Süt ve Süt Ürünlerinde *Listeria monocytogenes* Varlığı", *YYU. Vet. Fak. Derg.*, **15/1-2**, (2004), 97.
- [142] Bilgehan, H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, (2004), 182.
- [143] Işıkkay, S., Ertekin, V., "Klebsiella pneumoniae Pnömonisi: Bir Vaka Sunumu" *Cocuk Enf Derg.*, **2**, (2008) 27.
- [144] Shen, D.; Winohur, P. ve Jones, R.N., "Characterization of Extended Spectrum B-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Beijing China", *Intern. J. Antimicrob. Ag.*, **18/1**, (2001) 85.
- [145] Rasool, S. A.; Ahmad, A.; Khan, S. ve Wahab, A., "Plasmid Borne Antibiotic Resistance Factors Among Indigenous *Klebsiella*", *Pak. J. Bot.*, **35/2**, (2003) 243.
- [146] Aladağ, M. O., Durak, Y., "Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'lerin Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları" *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt:2, Sayı:4, (2007) 40.
- [147] Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Gedikoğlu, S., Göral, G. Ve Helvacı, S., Klinik Mikrobiyoloji, Kılıçturgay, Bursa Güneş & Nobel Kitapevleri, Bursa, (1994).

- [148] Erdem, B., Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ustaçelebi, Ş.(editör.) Güneş Kitabevi, Ankara, (1999), 551.
- [149] Baykan, S., Özerol, H., Kart, H., Baysal, B., “Bir serratia sepsisi olgusu” *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1/3, (1994), 210.
- [150] Deguzman, C., “Serratia”, Soil microbiology Biol/CSES 4684
http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Serratia.html
(25-06-2011)
- [151] Yang, F., Yang, J., “Genome dynamics and diversity of Shigella species, the etiologic agents of bacillary dysentery”, *Nucleic Acid Research*, 33/9, (2005) 6445.
- [152] Şenses, Z., Baysallar, M., Aydoğan, H., Üsküdar Güçlü, A., Doğançlı L. “Kan ve dışkı örneklerinden izole edilen *Salmonella* ve *Shigella* izolatlarının antibiyotik dirençleri” *Gülhane Tıp Dergisi* 2007; 49: 141-146.
- [153] Azap, Ö. K., Can, F., Demirbilek, M., Oruç, E., Timurkaynak, F., Arslan H. “Salmonella ve shigella suşlarında azitromisin duyarlılığı” *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2005; 58:121-123.
- [154] Cengiz, A. T., Staphylococcus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ustaçelebi, Ş.(edi.) Güneş Kitabevi, Ankara, (1999), .340.
- [155] Odds, F. C., Van Nuffel, L., Dams, G., “Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection”, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, (1998) 2896.
- [156] Hasenekoğlu, İ., Toprak Mikrofungusları, 1, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Erzurum, (1991), 107.
- [157] Çakır,C., “*Alternaria alternata* Alternaria çürüklüğü.”
<http://www.bitkisagligi.net/Bag/ozellik.asp?patlatin=Alternaria alternata>
(25-05-2011)
- [158] Çakır,C. “*Aspergillus niger* Siyah küf hastalığı”
http://www.bitkisagligi.net/Cilek_Aspgillus_niger.htm
(25-05-2011)
- [159] Hasenekoğlu, İ., Toprak Mikrofungusları, 5, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 689, Erzurum, (1991), 1.
- [160] Çakır,C., “*Penicillium expansum* Mavi Küf”
<http://www.bitkisagligi.net/Elma/ozellik.asp?patlatin=Penicillium expansum>
(25-05-2011)

- [161] Çakır, C. "Mısır (*Zea mays* L.) Hastalıkları"
http://www.bitkisagligi.net/Misir_Hastaliklari.htm (25-05-2011)
- [162] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test, 6th ed., Approved Standard, M2-A6. NCCLS, Wayne, PA., (1997).
- [163] Köneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P.C. and Winn W. C., Colour Atlas and Testbook of Diagnostik Microbiology, Lippincott-Raven Pulb., Philadelphia, (1997), 785.
- [164] Hadacek, F., Greger, H., 'Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice' *Phytochemical Analysis* 11, (2000) 137.
- [165] Dharmaraj, N., "Ruthenium(II) complexes containing bidentate Schiff base and their antifungal activity", *Transition Metal Chemistry*, 26, (2001) 105.
- [166] Blois, M.S., "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, 26, (1958) 1199.
- [167] Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G., "Essential Oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii* Two Endemic Species in Turkey", *Journal Essential Oil Res.* 4, (1992), 659.
- [168] Ünlü, G.V., Candan F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou M., Sökmen, M., Dönmez, E., Tepe, B., "Antimicrobial and antioxidant activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae)", *J. Agric. Food Chem.*, 51, (2003), 63.
- [169] Javidnia, K., Miri, R. And Sadeghpour, H. "Composition of the volatile oil of *Achillea wilhelmsii* C., Koch from Iran", *Daru*, 12, (2004) 63.
- [170] Svoboda, K. P. and Hampson, J. B., Biyoactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities, Speciality chemical fort the 21st century intermediary products, cosmetics and perfumes, medicinal applications, (1999).
www.ienica.net/specchemseminar/svoboda.pdf. (25-05-2011)
- [171] Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGrimpsy, J.A. & Smallfield, B.M., "Essential oil from Dalmation sage (*Salvia officinalis* L.), variations among individuals, plant parts, seasons and sites", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, (1999) 2048.
- [172] Baudoux, D. "Antiviral and antimicrobial properties of essential oils",
<http://www.positivehealth.com/permit/Articles/Aromatherapy/baud55.htm>
(25-05-2011)

- [173] Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E., "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol", *Journal of Applied Microbiology*, **91**, (2001), 453.
- [174] Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., "The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese", *Food Microbiology*, **18**, (2001) 463.
- [175] Xianfei, X., Xiaoqiang C., Shunying Z., Guolin Z., "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China", *Food Chemistry*, **100**, (2007) 1312.
- [176] Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T., Atti-Serafini, L.A.L., Echeverrigaray, S., "Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil", *Food Chemistry*, **100**, (2007) 603.
- [177] Deans, S.G., Ritchie, G., "Antibacterial properties of plant essential oils", *International Journal of Food Microbiology*, **5**, (1987), 165.
- [178] Deans, S.G., Noble, R.C., Hiltunen, R., Wuryani, W., Penzes, L.G., "Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice" *Flavour and Fragrance Journal*, **60**, (1995) 323.
- [179] Akgül, A., Kıvanç, M., "Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **47**, (1989) 129.
- [180] Rasooli, I., Rezaei, M. B., Allameh, A., "Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*", *International Journal of Infectious Diseases* **10**, (2006) 236.
- [181] Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., Albasani, A., "Effect of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro", *Journal of Phytopathology*, **144**, (1996) 491.
- [182] Tantaoui-Elaraki, A., Errifi, A., Benjlali, B. and Lattaoui, N., "Antimicrobial activity of four chemically different essential oils", *Rivista Italiana EPPOS*, **6**, (1992) 13.
- [183] Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I., "Composition and antimicrobial activity of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae", *Journal of Ethnopharmacology*, **39**, (1993) 167.

- [184] Nelson, R.R.S., "In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **40**, (1997) 305.
- [185] Rota, M.C., Herrera A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, M.J., "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils" *Food Control* **19**, (2008) 681.
- [186] Couladis ,M., Tzakou,O., Kujundzic, S., Sokovic, M., Mimica-Dukic, N. "Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*", *Phytotherapy Research*, **18**, (2004) 40.
- [187] Delespaul, Q., Billerbeck, V.G., Roques, C.G., Michel, G., "The Antifungal Activity of Essential Oil as Determined by Different Screening Methods", *J. Essential Oil. Res.*, **12**, (2000) 256.
- [188] Agarwal, I. ve Mathela, C.S., "Study of antifungal activity of some terpenoids" *Indian Drugs Pharm. Ind.*, **14**, (1979) 19.
- [189] Agarwal, I., Mathela, C.S.ve Sinha, S., 'Studies on the antifungal activity of some terpenoids against Aspergilli' *Indian Phytopathol.*, **32**, (1979) 104.
- [190] Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum C., "Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reus", *The International Journal of Aromatherapy*, **16**, (2006) 95.
- [191] Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., "Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons", *Microbiol. Rev.*, **59**, (1995) 201.
- [192] Cowan, M.M., "Plant products as antimicrobial agents", *Clin. Microbiol. Rev.*, **12/4**, (1999) 564.
- [193] Walsh, S.E., Maillard, J.-Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L., Bartolo, R.G., "Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria." *J. Appl. Microbiol.* **94**, (2003) 240.
- [194] Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N. "The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity" *Flav. Frag. J.* **14**, (1999) 322.
- [195] Davidson, P.M., Naidu, A.S., Phyto-Phenols. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, (2000) 265.

- [196] Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, T.R., Wyllie, S.G. "The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil)", *J. Appl. Microbiol.*, **88**, (2000) 170.
- [197] Holley, R. A., "Review Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials", *Dhaval Patel Food Microbiology*, **22**, (2005) 273.
- [198] Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A.V., "Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria", *J. Agric. Food Chem.*, **46**, (1998) 3590.
- [199] Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., "Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus*", *Journal of Food Protection*, **63/5**, (2000) 620.
- [200] Mevy, J.P., Bessiere, J.M., Dherbomez, M., Millogo, J., Viano, J., "Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke", *Food Chemistry*, **101**, (2007) 682.
- [201] Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., "Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils", *Microbios*, **89**, (1997) 39.
- [202] Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I.B., Harvala, C., "Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*", *Planta Medica*, **67**, (2001) 81.
- [203] Knobloch, L., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H.M., Vogenschow, H., Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.-J.(Ed.) *Progress in Essential Oil Research*. Walter de Gruyter, USA (1985), 429.
- [204] Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C., "Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, (1995) 2839.
- [205] Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., "Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents", *Journal of applied Bacteriology*, **76**, (1994) 626.
- [206] Harborne, J.B., Williams, C.A., "Antocyanins and other flavonoids", *Natural Product Report*, **7**, (1995) 639.

- [207] Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Tottè, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., "Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo", *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, (2002) 213.
- [208] Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., "Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham", *International Journal of Food Microbiology*, **73**, (2002) 83.
- [209] Singh, P.H., Mittal, S., Kaur, S., Batish, D.R., Kohli, R.K., "Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*" *Food Chemistry*, **114**, (2009) 642.
- [210] Sonboli, A., Saheli, P., Kanani, M.R., Ebrahimi, S.N., "Antibacterial and antioxidant activity and essential oil composition of *Grammosciadium scabridum* Boiss. from Iran", *Z. Naturforsch.* **60c**, (2005) 534.
- [211] Ruberto, G., Baratta, M.T., "Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems" *Food Chemistry*, **69**, (2000) 167.
- [212] Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. U., "Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol", *Food Chemical Toxicology*, **32**, (1994) 31.
- [213] Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G., "Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils", *Journal of Essential Oil Research*, **10**, (1998) 618.
- [214] Laguori, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., & Boskou, D., "Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants growth wild in Greece", *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung*, **197**, (1993) 20.