

119769

**UMBELLIFERAE FAMILİYASINA AİT
BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gökalp İŞCAN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat 2002

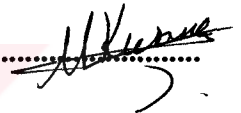
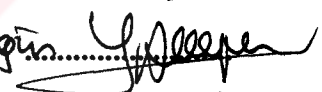
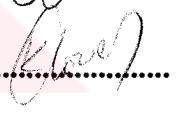
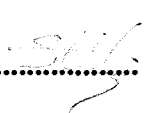
**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

119769

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 001048**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gökalp İŞCAN'ın Umbelliferae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 05.02.2002 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisanüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Merih Kuvaş	
Üye	: Prof. Dr. Yurdanur Akgün	
Üye	: Prof. Dr. Neşe Kırmaç	
Üye	: Doç. Dr. Kymet Gizen	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Semra Yılmaz	

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 08.02.2002 tarih ve 4/2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

UMBELLIFERAE FAMILİYASINA AİT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökalp İŞCAN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

2002, 93 Sayfa

Bu tezde Umbelliferae Familyasına ait çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarının farklı yöntemler kullanılarak, seçilen mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Mikrodilüsyon Broth yöntemi ile kullanılan uçucu yağların bakterilere karşı olan minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) belirlenirken, biyootografi metodu kullanılarak aktiviteden sorumlu olan uçucu yağ bileşenleri ortaya çıkarılmıştır. Kullanılan uçucu yağlar genel olarak insan patojenlerine karşı orta derecede antimikrobiyal etki gösterirken, bitki patojenlerine karşı oldukça güçlü antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Ayrıca kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip 2 uçucu yağın mutajenik etkileri Ames *Salmonella*/Mutajenite testi ile araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: MİK, Umbelliferae, Antimikrobial, Biyootografi, Ames

ABSTRACT**Master of Science Thesis****ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM
SOME UMBELLIFERAE SPECIES****Gökalp İŞCAN****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2002, 93 Pages**

In this thesis, some plants specimens's volatile oils from Umbelliferae Family have been investigated against certain microorganisms using various antimicrobial screening methods. Using Microdilution Broth method, MIC values were determined, whereas the essential oils compounds which are responsible for the bioactivity were determined by bioautography technique. The volatile oils showed moderate antimicrobial activity against human pathogenic bacteria, on the other hand, they showed strong activity against plant pathogenic bacteria. None of the essential oil showed antifungal activity against filamentous fungi. Furthermore, the mutagenic effects of two essential oils with strongest antimicrobial activity have been investigated by the Ames *Salmonella*/Mutagenicity assay.

Keywords: MIC, Umbelliferae, Antimicrobial, Bioautography, Ames

TEŞEKKÜR

Çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren ve araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezim boyunca Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya teşekkür ederim.

Özellikle uçucu yağların teminiyle, gerekli malzeme ve laboratuvarları kullanımına sunan Anadolu Üniversitesi, Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Araştırma Merkezi Müdürü, değerli hocam Sayın Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanma aşamalarında engin bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e ve Doç. Dr. Kıymet GÜVEN'e, çalıştığım uçucu yağların analizlerini yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Betül DEMİRCİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Gerek laboratuvar çalışmalarında, gerekse tez yazımı konusunda bilgilerinden faydalandığım ve benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, Sayın Yrd. Doç. Fatih DEMİRCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimdeki fotoğrafların çekilmesinde yardım eden, Sayın Yrd. Doç. Dr. Temel ÖZEK'e, Ames testinin yapılmasında bana rehberlik eden Sayın Yrd. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ ve Araş. Gör. Emel ERGENE'ye ve çalışmada kulland

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Uçucu Yağlar.....	2
1.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri	4
1.2.1. Distilasyon.....	4
1.2.1.1. Su Distilasyonu.....	4
1.2.1.2. Buhar Distilasyonu.....	4
1.2.2. Soğukta Sıkma.....	5
1.2.3. Çözücü Ekstraksiyonu	6
1.2.4. Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon.....	6
1.3. Umbelliferae Familyasının Taksonomik Özellikleri	7
1.4. Umbelliferae Familyasının Biyoloji ve Kimyası.....	8
1.5.	

1.7.3.4. Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.5. Doğal (Neutral) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.6. Sessiz (Silent) Mutasyonlar.....	25
1.7.3.7. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları.....	25
1.8. Mutasyonun Nedenleri ve Mutajenler.....	26
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
2.1. Materyal.....	27
2.1.1. Kullanılan Uçucu Yağlar.....	27
2.1.2. Antimikrobiyal Testlerde Kullanılan Mikroorganizmalar	28
2.1.3. Ames <i>Salmonella</i> /Mikrozom Testinde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	29
2.1.4. Deney Hayvanları	29
2.1.5. Antimikrobiyal Testler İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	30
2.1.5.1. Mueller Hinton Broth (Merck)	30
2.1.5.2. Mueller Hinton Agar (Mast Diagnostic)	30
2.1.5.3. Sabouraud Dextrose Agar (Difco)	31
2.1.5.4. Nutrient Agar (Merck)	31
2.1.5.5. Yumuşak Agar	31
2.1.5.6. TTC Tuzu (Sigma)	32
2.1.5.7. Anisaldehit/Sülfirik Asit.....	32
2.1.5.8. McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı.....	32
2.1.5.9. McFarland No: 5	

2.1.6.8. 4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD).....	35
2.1.6.9. 2-Aminofloren (2AF).....	35
2.1.6.10. 3-Metilkolontren.....	35
2.1.6.11. KCL Çözeltilisi.....	35
2.1.6.12. S9 Karışımı.....	35
2.1.6.13. Top Agar.....	36
2.1.6.14. Histidin/Biotin Agar (HB Agar).....	36
2.1.6.15. Histidin/Biotin/Ampisilin Agar (HBA Agar).....	36
2.1.6.16. Minimal Glikoz Agar (MGA).....	37
2.1.6.17. Nutrient Agar.....	37
2.1.6.18. Nutrient Broth.....	37
2.2. Yöntem	
2.2.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi... 38	
2.2.1.1. Mikroorganizmaların Canlandırılması.....	38
2.2.1.2. Mikrobroth Dilüsyon Tekniği.....	38
2.2.1.3. Agar Difüzyon Tekniği.....	40
2.2.2. Biyootografi Tekniği İle Uçucu Yağlardaki Antimikrobiyal Özellikteki Bileşiklerin Belirlenmesi.....	41
2.2.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Sistemi.....	41
2.2.2.2. Mikroorganizmaların Hazırlanması.....	41
2.2.2.3. Aktivite Tayini.....	42

2.2.3.2.5. Spontan Olarak Geriye Dönüşüm	
Sıklığının Kontrolü.....	47
2.2.3.3. Kullanılacak Sıvı Kültürdeki Bakteri Sayısının	
Hesaplanması.....	47
2.2.3.4. Uçucu Yağların Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	47
2.2.3.5. Memeli Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması.....	48
2.2.3.6. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	48
2.2.3.6.1. S9'suz Deney.....	49
2.2.3.6.2. S9'lu Deney.....	49
2.2.3.7. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	50
3. BULGULAR.....	51
3.1. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etki Sonuçları.....	51
3.1.1. Mikrobrot Dilüsyon Yöntemiyle Aktivitenin Belirlenmesi.....	51
3.1.2. Agar Difüzyon Yöntemi ile Antifungal	
Aktivitenin Belirlemesi.....	53
3.2. Uçucu Yağlara Biyootografi Tekniğinin Uygulanması.....	55
3.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Genotip Kontrollerinin Değerlendirilmesi.....	62
3.4. Sitotoksik Dozun Belirlenmesi.....	62
3.5. S9'lu ve S9'suz Mutajenite Deneylerinin Sonuçları.....	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
5. KAYNAKLAR.....	83</

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Mikrobrot Dilüsyon Tekniğinde Kullanılan 96 (well) Kuyucuklu Mikrotitrasyon Petrisi	39
3.1. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (<i>Aspergillus flavus</i>).....	54
3.2. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (<i>Fusarium solani</i>)	54
3.3. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (<i>Sclerotium rolfsii</i>).....	54
3.4. Ketokonazolün oluşturduğu inhibisyon zonları (<i>A. parasiticus</i>)	54
3.5. <i>C. albicans</i> plağında 9 adet uçucu yağın biyogramı ve yağlara ait referans İTK plağı	55
3.6. <i>Echinophora teunifolia subsp. sibtorphiana</i> (A) bitkisine ait uçucu yağın ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı	57
3.7. <i>Heracleum sphondylium subsp. ternatum</i> (B) bitkisine ait uçucu yağın ve ana maddelerinin biyogramı ve referans İTK plağı	57
3.8. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile δ -3-Karen'in Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	61
3.9. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile Metil öjenol'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	61
3.10. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile 1-Oktanöl'ün Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Uçucu Yağları Elde Edilen Bitki Türleri ve Kaynakları.....	27
2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları	28
3.1. Uçucu Yağların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK-µg/ml)	52
3.2. Standart Antifungal Ketokonazol'ün Oluşturduğu İnhibisyon Zonu Çapları (mm)	53
3.3. <i>E. teunifolia subsp. sibtorphiana</i> (A) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları.....	56
3.4. <i>H. sphondylium subsp. ternatum</i> (B) bitkisine ait uçucu yağın GC Analiz Sonuçları.....	56
3.5. Antimikrobiyal Aktiviteden Sorumlu Saf Maddelerin ve Ait Oldukları Uçucu Yağların MİK Değerleri (µg/ml)	59
3.6. Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA98 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	64
3.7. Test edilen uçucu yağların çeşitli dozlarda TA100 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

GC/MS	: Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometresi
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
R_f	: Retention Factor (Tutunma Faktörü)
ESSE	: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
İSTO	: İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Herbaryumu
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
TTC	: 2,3,5- Trifenil Tetrazolyum Klorid
NPD	: 4-Nitro- <i>o</i> -fenilendiamin
2-AF	: 2-Aminofloren
HBA	: Histidin/Biotin/Ampisilin
MGA	: Minimal Glikoz Agar

