

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DOĞAL ANTİMİKROBİYALLER İLE GÜÇLENDİRİLMİŞ
BİYOPOLİMER KAPLI SÜTÜRLERİN IN-VITRO
İNCELENMESİ

MUSTAFA AKIN

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM
DALI

DOKTORA TEZİ

DOĞAL ANTİMİKROBİYALLER İLE GÜÇLENDİRİLMİŞ
BİYOPOLİMER KAPLI SÜTÜRLERİN IN-VITRO
İNCELENMESİ

MUSTAFA AKIN

Doç. Dr. NESLİHAN SAKİ

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. YONCA DUMAN

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. GÜLNUR ARABACI

Jüri Üyesi, Sakarya Üniversitesi

.....

Prof. Dr. NALAN TEKİN

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Doç. Dr. ZEYNEP EKMEKÇİ

Jüri Üyesi, Isparta Uyg. Bil. Üniversitesi

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 28.08.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez kapsamında bitkilerden elde edilen doğal antibiyotik özelliğe sahip moleküller karakterize edilip, taşıyıcı biyopolimerler ile karıştırılarak farklı yapıdaki sütürlere kaplanarak cerrahi alan enfeksiyonuna sebep olan bakteri türleri üzerine etkileri in-vitro incelenmiştir.

Doktora tezimin başlamasından itibaren tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yapılabilmesi için gerekli koşulların sağlanması, en önemlisi bana araştırmayı, sorgulamayı, kendi fikirlerime yön vermeyi öğreten değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan ŞAKİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca bana her türlü imkanı sağlayan çalışmakta olduğum Petroyağ ve Kimyasallar San. Ve Tic. A.Ş'de bütün çalışma arkadaşlarıma ve üst yönetime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu uzun ve zorlu süreçte kendilerine yeterince zaman ayıramadığım halde bana desteğini hiç esirgemeyen güzel karım Sermin ÖZ AKIN ve biricik kızım İlkim Duru AKIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde ekonomik destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonuna da ayrıca teşekkürlerimi sunarım (Proje No: 2016-071).

Ağustos-2020

Mustafa AKIN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	2
1.1. Fitokimyasallar.....	3
1.1.1. Flavonoidler	5
1.1.2. Fenolik asitler	6
1.1.3. Tanenler	7
1.1.4. Terpenler.....	8
1.1.5. Stilbenler.....	8
1.1.6. Lignanlar.....	9
1.1.7. Glukozinolatlar	9
1.2. Potansiyel Fitokimyasal Kaynakları	9
1.2.1. Bilye kekik (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	10
1.2.2. Altın otu (<i>Helichrysum arenarium</i>)	11
1.2.3. Gül (<i>Rosa damascena mill.</i>).....	12
1.2.4. Doğal ekstratların antimikrobial aktiviteleri.....	13
1.3. Fitokimyasal Analiz Yöntemleri	16
1.3.1. Bitkilerin toplanması ve temizlenmesi	16
1.3.2. Kurutma	16
1.3.3. Ekstraksiyon metotları	17
1.3.4. Kalitatif analizler	18
1.3.5. Kantitatif analizler	20
1.3.6. Kromatografik analizler	21
1.4. Antimikrobiyal Aktivite	24
1.4.1. Doğal ekstratlarda antimikrobiyal aktivite	24
1.4.2. Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemleri	25
1.5. Sütürler (Dikiş iplikleri).....	31
1.5.1. Sütürlerin sınıflandırılması	32
1.5.2. Antimikrobiyal sütürler.....	37
1.5.3. Nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan bakteriler	39
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	42
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
2.2. Bitki Materyalleri	43
2.2.1. Bitki materyallerinin hazırlanması.....	43
2.2.2. Bitkilerin ekstraksiyonu.....	43
2.3. Bitki Ekstratlarının Fitokimyasal Analizi	43

2.3.1. İnce tabaka kromatografisi.....	43
2.3.2. LC-MS	44
2.4. Antimikrobiyal Aktivite	45
2.4.1. Mikroorganizmalar ve ortam	45
2.5. Bitki ekstratlarının antimikrobiyal analizleri	45
2.5.1. TLC Biyootografi	45
2.5.2. Disk difüzyon.....	46
2.5.3. Well difüzyon	46
2.6. Bitki Ekstratı-biyopolimer Karışımlarının Hazırlanması.....	47
2.7. Ekstrat-biyopolimer Karışımlarının Antimikrobiyal Analizleri.....	47
2.7.1. Well difüzyon	47
2.8. Sütürler	47
2.8.1. Cerrahi sütürler	47
2.8.2. Sütürlerin kaplanması	48
2.8.3. Antimikrobiyal aktivite.....	48
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
3.1. Bitki Ekstratlarının Fitokimyasal Analizi	49
3.1.1. İnce tabaka kromatografisi.....	49
3.1.2. LC-MS analizi.....	53
3.2. Antimikrobiyal Aktivite	59
3.2.1. Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitesi	60
3.2.2. Bitki ekstratı-biyopolimer karışımlarının antimikrobiyal aktivitesi.....	74
3.3. Sütürler	78
3.3.1. Sütürlerin kaplanması	78
3.3.2. Kaplı sütürlerin antimikrobiyal aktivitesi	79
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR	92
EKLER.....	104
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER	106
ÖZGEÇMİŞ	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Fitokimyasalların sınıflandırılması	4
Şekil 1.2.	Bazı fenolik asitler	7
Şekil 1.3.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>).....	10
Şekil 1.4.	Altın otu (<i>Helichrysum arenarium</i>)	12
Şekil 1.5.	Isparta gülü (<i>Rosa damascena</i> Mill.)	13
Şekil 1.6.	Uygun mobil faz kullanılarak yürütülen bitki ekstratlarının türevlendirilmiş görüntüsü	22
Şekil 1.7.	Bitkiden elde edilen ekstratların fitokimyasal ve biyolojik aktivite belirlenmesinde izlenen yol şeması.....	24
Şekil 1.8.	TLC-Biyootografi çalışma örneği.....	26
Şekil 1.9.	TLC-Biyotografi çeşitleri.....	27
Şekil 1.10.	CLSI tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon test protokolü	30
Şekil 1.11.	Sütürlerin yapılarına göre sınıflandırılması	33
Şekil 1.12.	Monofilament ve multifilament sütürlerin avantaj ve dezavantajları	34
Şekil 1.13.	Triklosanın yapısı	38
Şekil 1.14.	İshalli E. coli fimbria'nın çeşitli mor folojilerinin iletim elektron mikroskop görüntüsü.....	40
Şekil 3.1.	Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 1) A, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; B, UV366 lamba altında görüntüleme.....	50
Şekil 3.2.	Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 2) C, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; D, UV366 lamba altında görüntüleme.....	51
Şekil 3.3.	Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 3) E, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; F, UV366 lamba altında görüntüleme.....	51
Şekil 3.4.	Bitki ekstratlarında bulunan standart fenolik bileşiklerin TLC yöntemi ile UV 254 nm altındaki kromatogram görüntüsü. Mobil faz: kloroform: etil asetat: aseton: formik asit (40:30:20:10 v/v). Rm:Rosa damascena Mill., Ha: Helichrysum arenarium, Tv:Thymus vulgaris. 1:timol, 2:4-metilkatekol, 3:vanilik asit, 4:gallik asit, 5:sinamik asit, 6:kojik asit, 7:naringin, 8:kafeik asit, 9:quercetin, 10:pirokatekol	52
Şekil 3.5.	Gallik asit, kojik asit, kafeik asit ve vanilik asitin 10 ppm lik standart LC-MS grafiği.	53
Şekil 3.6.	LC-MS yöntemi ile ekstratlarda tespit edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.	54
Şekil 3.7.	Tv (Bilye kekik), gallik asit 0.2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.	54

Şekil 3.8.	Tv (Bilye kekik), vanilik asit 0.2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği	55
Şekil 3.9.	Tv (Bilye kekik), kafeik asit 0.5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.	55
Şekil 3.10.	Tv (Bilye kekik), timol 0.5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.	56
Şekil 3.11.	Ha (Altın otu), vanilik asit 0.2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği	56
Şekil 3.12.	Ha (Altın otu), kafeik asit 0.5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.	57
Şekil 3.13.	Rm (Gül), kafeik asit 0.5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.....	57
Şekil 3.14.	Rm (Gül), kojik asit 0.1 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.....	58
Şekil 3.15.	TLC biyo-otografi kromatogramları; <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill etanol ekstratları. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş üç farklı mobil faz kullanılarak TLC plakaları üzerinde ayrılmıştır. 1, 2 ve 3 sayıları mobil faz 1, 2 ve 3'ü temsil etmektedir	60
Şekil 3.16.	Standart fenolik asit karışımının TLC-Biyootogram grafiği	62
Şekil 3.17.	TLC biyo-otografi kromatogramları; <i>Thymus vulgaris</i> (TV), <i>Helichrysum arenarium</i> (HA), <i>Rosa damascena</i> Mill. (RM) hekzan ekstratları. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş TLC plakaları üzerinde ayrılmıştır. Mobil faz: hekzan: etanol (80:20 v/v)	63
Şekil 3.18.	TLC-doğrudan biyootografi kromatogramları; <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. hekzan ve etanol ekstratları. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) ve <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş TLC plakaları üzerine doğrudan uygulanmıştır. 1 ve 2 hekzan ekstratı 10 ve 20 µL uygulanmış, 3 ve 4 etanol ekstratı 10 ve 20 µL uygulanmıştır	64
Şekil 3.19.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. etanol ekstratlarının <i>E. coli</i> (ATCC 25922) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) bakterileri üzerine inhibisyon etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi	66
Şekil 3.20.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. hekzan ekstratlarının <i>E. coli</i> (ATCC 25922) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) bakterileri üzerine inhibisyon etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi.....	67
Şekil 3.21.	Seftriakson (30 mg) standart antibiyotik yüklü disklerin farklı türler üzerine inhibisyon değerleri. <i>E.coli</i> (ATCC 25922) 20 mm; <i>B. subtilis</i> (ATCC 6051) 38 mm; <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) 21mm; <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) 38 mm; <i>B. cereus</i> (ATCC 14579) 11 mm; <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) 20 mm	68

Şekil 3.22.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) bakterisi üzerine inhibisyon etkilerinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesi	70
Şekil 3.23.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) bakterisi üzerine inhibisyon etkilerinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesi	71
Şekil 3.24.	<i>Thymus vulgaris</i> (Tv), <i>Helichrysum arenarium</i> (Ha), <i>Rosa damascena</i> Mill. (Rm) etanol ve hekzan ekstratlarının 50 mg/ml konsantrasyonlarda <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>E. coli</i> (ATCC 5922) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>B. Subtilis</i> (ATCC 6051), <i>B. Subtilis</i> (ATCC 6633), <i>B. cereus</i> (ATCC 14579) ve <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) bakterileri üzerine etkilerinin well difüzyon yöntemi ile 120 saat inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon alanları (H; hekzan ekstratı, E; etanol ekstratı)	73
Şekil 3.25.	Biyopolimer- bitki ekstratlarının (etanol) <i>S. aureus</i> bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin TLC-Biyootografi yöntemi ile belirlenmesi. Tv; <i>Thymus vulgaris</i> , Ha; <i>Helichrysum arenarium</i> , Rm; <i>Rosa damascena</i> Mill.	75
Şekil 3.26.	Biyopolimer- bitki ekstratlarının (etanol) <i>E. coli</i> bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin TLC-Biyootografi yöntemi ile belirlenmesi. Tv; <i>Thymus vulgaris</i> , Ha; <i>Helichrysum arenarium</i> , Rm; <i>Rosa damascena</i> Mill.	76
Şekil 3.27.	Biyopolimer-bitki ekstratı karışımlarının well difüzyon yöntemi ile analizi. P- polimer, Tv- <i>Thymus vulgaris</i> , Ha; <i>Helichrysum arenarium</i> , Rm; <i>Rosa damascena</i> Mill.	77
Şekil 3.28.	Kaplama yapılmamış sütürlerin ve ticari olarak antimikrobiyal kaplamalı satılan sütürün <i>S. aureus</i> ve <i>E.coli</i> bakterileri üzerine inhibisyon aktiviteleri	79
Şekil 3.29.	Ha- <i>Helichrysum arenarium</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin <i>S. aureus</i> üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol.....	80
Şekil 3.30.	Ha- <i>Helichrysum arenarium</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin <i>E. coli</i> üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol.....	81
Şekil 3.31.	Tv- <i>Thymus vulgaris</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin <i>S. aureus</i> üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol.....	82
Şekil 3.32.	Tv- <i>Thymus vulgaris</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin <i>E. Coli</i> üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol.....	83

- Şekil 3.33. Rm- *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *S. aureus* üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol..... 84
- Şekil 3.34. Rm- *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *E. coli* üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol..... 85



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Kekik (<i>Thymus vulgaris</i>) antimikrobiyal aktivite çalışmaları	14
Tablo 1.2.	Altın otu (<i>Helichrysum arearium</i>) antimikrobiyal aktivite çalışmaları	15
Tablo 1.3.	Gül (<i>Rosa damascena</i> Mill.) antimikrobiyal aktivite çalışmaları	15
Tablo 1.4.	Yaygın olarak kullanılan fitokimyasal ayırma ve tanılama teknikleri	21
Tablo 1.5.	CLSI tarafından önerilen antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri için kültür ortamı, mikrobiyal inokulum boyutu ve inkübasyon koşulları	29
Tablo 2.1.	Kullanılan kimyasallar	42
Tablo 2.2.	Çalışmada kullanılan sütürler ve yapısal özellikleri	48
Tablo 3.1.	Mobil faz belirleme çalışmaları (x: Ayrışma hiç olmadı, √: Ayrışma oldu, Mobil faz 1: Kloroform: Hekzan: Metanol: Formik asit (50:50:10:1 (v/v)); Mobil faz 2: Etil asetat: Toluen: Formik asit (70:30:10 (v/v)); Mobil faz 3: Kloroform: Hekzan: Metanol: Su: Etil asetat (25:25:15:3.5:45 (v/v)))	50
Tablo 3.2.	Bitki ekstratlarında tespit edilen fenolik asitlerin ppm değerleri	58
Tablo 3.3.	Antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonların alıkonma değerleri	61
Tablo 3.4.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) bakterisi üzerine oluşturdukları inhibisyon alanları (mm)	71
Tablo 3.5.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Helichrysum arenarium</i> , <i>Rosa damascena</i> Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) bakterisi üzerine oluşturdukları inhibisyon alanları (mm).	72
Tablo 3.6.	<i>Thymus vulgaris</i> (Tv), <i>Helichrysum arenarium</i> (Ha), <i>Rosa damascena</i> Mill. (Rm) etanol ve hekzan ekstratlarının 50 mg/ml konsantrasyonlarda bakteriler üzerine etkilerinin well difüzyon yöntemi ile 120 saat inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon alanları (mm).	74
Tablo 3.7.	Biyopolimer-ekstrat karışımlarının sütürlere kaplanmadan önce ve sonraki % kütle değişimleri. AG-Arabik gum, HPMC-Hidroksipropil metil selüloz, CMC-karboksi metil selüloz, GG-gellan gum, PVA-polivinil alkol.	78
Tablo 3.8.	<i>Helichrysum arenarium</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı sütürlerin <i>S. aureus</i> türü üzerine inhibisyon çapları (mm)	81
Tablo 3.9.	<i>Thymus vulgaris</i> etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı sütürlerin <i>S. aureus</i> türü üzerine inhibisyon çapları (mm)	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AG	: Arabic Gum (Arabik Gum)
ATCC	: American Type Culuture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
CCC	: Counter Current Chromatography (Karşı Akım Kromatografisi)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
CBE	: Cerrahi Bölge Enfeksiyonu
DMSO	: Dimetil sülfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
GG	: Gellan Gum
Ha	: <i>Helichrysum arenarium</i> (Altın otu)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Çözünürlüklü Sıvı Kromatografisi)
HPMC	: Hydroxypropyl Methyl Cellulose (Hidroksipropil Metil Selüloz)
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi)
M-H	: Mueller Hinton
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MTT	: (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide)
PVA	: Polivinil Alkol
R _f	: Retention Factor (Alıkonma zamanı)
R _m	: <i>Rosa damascena</i> Mill. (Gül)
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SSI	: Surgical Site Infection (Cerrahi Alan Enfeksiyonu)
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
T _v	: <i>Thymus vulgaris</i> (Bilye Kekik)

DOĞAL ANTİMİKROBİYALLER İLE GÜÇLENDİRİLMİŞ BİYOPOLİMER KAPLI SÜTÜRLERİN İN-VİTRO İNCELENMESİ

ÖZET

Çalışmamızın amacı, cerrahi operasyonlardan sonra yara iyileşmesini hızlandırıcı olarak kullanılan sütür materyallerinin enfekte olması sebebiyle oluşan nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesidir. Tez üç ana bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde doğal antibiyotik kaynağı olarak, bilye kekik (*Thymus vulgaris*), altın otu (*Helichrysum arenarium*) ve gül (*Rosa damascena Mill.*) bitkilerinin etanol ekstratları elde edildi. Bu ekstratların fitokimyasal bileşimleri ince tabaka kromatografisi ve LC-MS teknikleri kullanılarak analiz edildi. Bu analiz sonuçlarında kafeik asit bütün bitki ekstratlarında tayin edilirken ($R_f=0.68$), vanillik asit ($R_f= 0.75$) ve gallik asit ($R_f=0.51$) bilye kekik ekstratında tespit edildi. Gül ekstratında ise kojik asit ($R_f=0.36$) tespit edildi. Tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarsal analizleri LC-MS analizleri ile belirlendikten sonra ekstratların *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri ince tabaka kromatografisi, disk difüzyon ve well difüzyon yöntemleri ile tespit edildi. Ekstratlar çalışmada kullanılan bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdi. Tezin ikinci bölümünde bitkilerden elde edilen antibiyotik ekstratların sütür yüzeyine tutunmasını sağlayacak biyopolimerler ile karışımları hazırlandı ve antimikrobiyal aktiviteleri aynı bakteri türlerine karşı belirlendi. Hidroksipropil metil selüloz, karboksi metil selüloz, arabik gum, gellan gum ve polivinil alkol ile ekstrat karışımları hazırlandı. Hazırlanan biyopolimer-ekstrat karışımlarının antimikrobiyal aktiviteleri ince tabaka kromatografisi ve well difüzyon yöntemleri ile belirlendi. Biyopolimerler tek başlarına aktivite sergilemezken, ekstratlar ile olan karışımları antimikrobiyal aktivite sergiledi.

Tezin son bölümünde ise hazırlanan biyopolimer-ekstrat karışımları, poliglaktin (1), polipropilen (2), ipek (3) ve poliestir (4) mono-multi falment yapıda, emilebilen ve emilemeyen özelliklere sahip sütürlere kaplandı ve antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon yöntemi ile belirlendi. Ekstrat-biyopolimer karışımları poliglaktin (1) ve poliestir (4) yapısında olan emilebilir sütürlere kaplandığında özellikle gram pozitif türe karşı daha etkili olmak üzere her iki türe karşı da antimikrobiyal aktivite gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, Fitokimyasal, Sütürler, TLC-Biyootograf.

IN-VITRO INVESTIGATION OF THE BIOPOLYMER COATED SUTURES ENHANCED BY NATURAL ANTIMICROBIALS

ABSTRACT

The aim of our study is to prevent nosocomial infections caused by the suture materials used as an accelerator to heal wound healing after surgical operations. The thesis contains three main sections. In the first part, ethanol extracts of bilye kekik (*Thymus vulgaris*), altın otu (*Helichrysum arenarium*) and gül (*Rosa damascena* Mill.) plants were obtained as a natural source of antibiotics. The phytochemical compositions of these extracts were analyzed using thin layer chromatography and LC-MS techniques. In these analysis results, caffeic acid was determined in all plant extracts ($R_f = 0.68$), while vanillic acid ($R_f = 0.75$) and gallic acid ($R_f = 0.51$) were detected in bilye kekik extract. Kogic acid ($R_f = 0.36$) was found in gül extract. Quantitative analysis of the detected phenolic compounds was elucidated by LC-MS analysis. Then, the antimicrobial activities of the extracts against *E. coli* (ATCC 25922) and *S. aureus* (ATCC 25923) species were evaluated by thin layer chromatography, disc diffusion and well diffusion methods. The extracts exhibited antimicrobial activity against the bacterial species used in the study. In the second part of the thesis, antibiotic extracts obtained from plants were prepared with biopolymers to attach to the suture surface and their antimicrobial activities were tested against the same bacterial species. Hydroxypropyl methyl cellulose, carboxy methyl cellulose, arabic gum, gellan gum and polyvinyl alcohol and extract mixtures were prepared. Antimicrobial activities of the prepared biopolymer-extract mixtures were assessed by using thin layer chromatography and well diffusion methods. While biopolymers did not show activity alone, their mixtures with extracts exhibited antimicrobial activity.

In the last part of the thesis, the prepared biopolymer-extract mixtures coated to polyglactin (1), polypropylene (2), silk (3) and polyester (4) mono-multi falment, absorbable and non-absorbable sutures and their antimicrobial activities were studied by agar diffusion method. When the extract-biopolymer mixtures were coated in absorbable sutures in the structure of polyglactin (1) and polyester (4), they showed antimicrobial activity against both species, especially more effective against the gram positive ones.

Keywords: Antimicrobial, Phytochemicals, Sutures, TLC-bioautography.

GİRİŞ

Nozokomiyal enfeksiyonlar, genellikle hastanede kalınan süre boyunca gelişen ve hastanın sağlık harcamalarını etkileyen, hastane kaynaklı enfeksiyonlardır. Hastayı nozokomiyal enfeksiyona eğilimli kılan temel faktörler arasında eşzamanlı enfeksiyonlar, tıbbi cihazlar, cerrahi, immünsüpresif ajanlar ve çoklu ilaca dirençli patojenlerin ortaya çıkması sayılabilir. Patojenler, nozokomiyal patojenler olarak bilinen bu tür enfeksiyonlardan sorumludur. Bunların %90'nını bakteriyel patojenler oluşturur; ancak mikrobakteriyel, viral, fungal veya protozoal ajanlar da daha az sıklıkla dahil edilirler (Kumara ve Goelb, 2009). Verilere göre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *enterococci* ve *Pseudomonas aeruginosa* en sık görülen nozokomiyal patojenlerdir (Alves ve Rosa, 2007).

Nozokomiyal enfeksiyonların nedenlerinden biri, cerrahi enfeksiyonlarda ve tıbbi implantlarda kullanılan enfekte sütür materyallerinden kaynaklanan cerrahi alan enfeksiyonlarıdır (SSI) (Ekor, 2013). Bilim adamları cerrahi alan enfeksiyonlarını önlemek için, cerrahi implantlar veya sütürler gibi tıbbi cihazların yüzeyinde kaplama malzemesi olarak kullanılabilecek bitki özleri ve polimerler gibi çeşitli doğal ve sentetik materyaller kullanmaktadırlar. Bu kaplamalar biyo-malzemelerine antibiyotiklerin eklenmesi, doğrudan implantasyon veya sütür bölgesinde antibiyotiğin lokal olarak verilmesini sağlayabilmekte ve böylece enfeksiyonun başlangıcını azaltabilmektedir (Huang ve diğ., 2010).

Çalışma kapsamında; önce biyopolimerler (polivinil alkol, karboksimetil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, gellan gum ve arabic gum) ile iltihaplı hastalık ve yara tedavisinde kullanılan Isparta gülü (*Rosa damascena* Mill.), Altın otu (*Helichrysum arenarium*), Bilye kekik (*Thymus vulgaris*), bitki ekstratları karıştırılarak kaplama materyalleri elde edilmiştir. Bu materyaller cerrahi bölgelerde kullanılan sütürlere kaplanarak enfeksiyona sebep olan bakteri türleri üzerindeki etkileri in vitro araştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

İnsanlık tarihinde, bitkiler her zaman bir sağlık kaynağı olarak var olmuştur. Bitkilerin çeşitli iyileştirici özelliklerinin bilgisi ampirik (deneysel) bir şekilde aktarılmıştır. Bununla birlikte, zamanla, insanlar bitkilerin özelliklerinin nereden geldiğiyle ilgilenmeye başlamış ve bilgi üretimi sürecinde, bitkilerin iyileştirici özelliklerinden sorumlu organik bileşiklerin yapılarını öğrenmek için birçok yöntem geliştirmişlerdir. Bitkilerde bulunan bileşiklerin incelenmesinden sorumlu bilim olarak tanımlanan fitokimya da böyle doğmuştur. Bu alanda, bitki doku numunesinin hazırlanmasından organik yapıların aydınlatılması için sofistike tekniklere kadar çeşitli metotlar geliştirilmiştir (Mendoza ve Silva, 2018).

İnsanlar, eski zamanlardan beri gıda, kıyafet, barınak, tıp ve diğer endüstriyel amaçlar gibi temel ihtiyaçları için doğal maddeleri sürekli olarak kullanmışlardır. 2600 yılında Mezopotamya'da yaklaşık 1000 bitki türevi madde için bulunan en eski kayıtlarla, tüm etnik kökenlerden gelen insanların ya tüm bitkiyi ya da onun tıbbi bölümünü tıbbi amaçla kullandıkları belgelenmiştir. Benzer şekilde, yaklaşık 5.000 yıllık eski Hint Ayurveda sistemi de doğal ilaç molekülleri için belgelere sahiptir. Çin kaynakları da 2500 yıl önce bitkisel ilaç kullanımı ile doludur (Alves ve Rosa, 2007). Son yirmi yıldan beri yapılan araştırmalar, yeni doğal ilaçların geliştirilmesi ve keşfinde inovasyon için umutlar sunmakta ve ilaç ve diğer endüstrilerde önemli bir rol oynamaktadır (Kumar ve diğ., 2019) Epidemiyolojik kanıtlar, bitki kaynaklı gıdalar açısından zengin bir diyetin birçok kanser türü ve kardiyovasküler hastalık riskini önemli ölçüde azalttığını ve bazı diyet antioksidanlarının kanser oluşumu ve ölüm oranlarının önlenmesi için etkili ajanlar olabileceğini düşündürmektedir (Wahle ve diğ., 2010). Bu ilaçlarda bulunan polifenoller, biyolojik fonksiyonlara sahip ve hastalık tedavisinden sorumlu başlıca ajanlar olarak kabul edilmektedir (Kumar ve diğ., 2015). Basit fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, stilbenler, hidrolize edilebilir ve yoğunlaştırılmış tanenler, lignanlar ve ligninler dahil olmak

üzere bitki fenolikleri ise ikincil metabolitlerdir ve aromatik halkaya direk bağlı bir ya da daha fazla hidroksil iyonu içerirler (Chirinos ve diğ., 2009; Kumar ve Pruthi, 2014). İkincil metabolitler, esas olarak UV radyasyonuna karşı koruma, virüslere, bakterilere, böceklerle ve diğer bitkilere karşı rekabetçi savaşın yanı sıra bitki ürünlerinde koku, renk ve lezzetten sorumlu birincil metabolitlerden (karbonhidratlar, amino asitler ve lipitler) kaynaklanmaktadır (Heleno ve diğ., 2015). Bitki büyümesi, gelişimi ve savunması da dahil olmak üzere çeşitli işlevlere sahip bitki fenolikleri birçok açıdan alifatik alkollere benzer, ancak aromatik halkanın varlığı ve fenolik hidroksil grubunun hidrojen atomu onları zayıf asitler yapmaktadır. Bu bileşikler; antienflamatuar, antikanser, antimikrobiyal, antialerjik, antiviral, antitrombotik, hepatoprotektif, gıda katkı maddesi, sinyal molekülleri ve çok daha fazlası gibi çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerde kilit rol oynayan güçlü doğal antioksidanlar olarak kabul edilmektedirler (Mori ve diğ., 1999; Middleton ve diğ., 2000; Medina ve Diğ., 2007; Badhani, 2015; Bodini ve diğ., 2009; Kumar ve Pruthi, 2015).

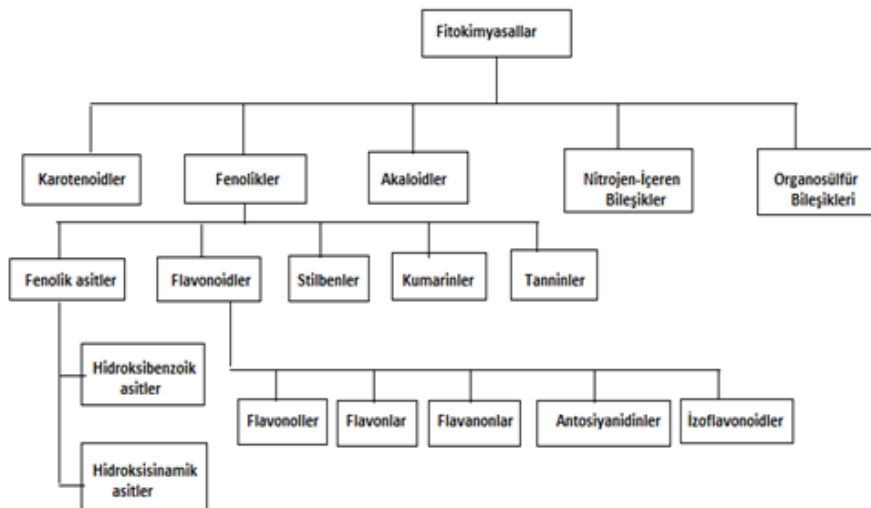
1.1. Fitokimyasallar

Yüzyıllardan beri, bitkiler büyük ve değerli fitokimyasal rezervuarı olarak çalışılmıştır. Fitokimya, bu kimyasalların bitkilerde incelenmesi olarak tanımlanmakla birlikte; bunların izolasyonu, yapısal analizi, biyosentezi ve bitkiler, hayvanlar ve insanlardaki işlevlerini içermektedir. Şimdiye kadar yaklaşık 400.000 çiçekli bitki sınıflandırılmış fakat sadece yaklaşık % 5'i tıbbi amaçlar için kullanılmış ve kimyasal bileşim ve biyolojik etkiler açısından ayrıntılı olarak incelenmiştir (Socaciu, 2019). Doğal Ürünler Sözlüğü, bitkilerden ve mikro-organizmalardan izole edilmiş yaklaşık 160.000 kimyasal içermektedir (Buckingham, 1993). Tıbbi bitkiler eski zamanlardan beri hastalıkları tedavi etmek için kullanılmış, ancak bitkisel preparatların aktif bileşenleri hakkındaki bilgiler yetersiz kalmıştır, çünkü farmakolojik önemi olan birçok ikincil metabolitin biyosentetik yolları sadece birkaç türde açıklığa kavuşturulmuşken, kimyasal çeşitlilikleri büyük ölçüde keşfedilememiştir (Scossa ve diğ., 2018).

Fitokimya, filogenetik bir yaklaşımı benimser ve bitkileri analiz eden, onların üremeleri için üretilen çok sayıda küçük molekülün (ikincil metabolitler) yapılarını tanımlayan bağımsız bir botanik veya kimya alt alanı olarak düşünülür. Birincil

metabolitler bitkilerin ve gıdaların besin kalitesi ile ilgiliyken, fitokimyasallar “besin dışı” ancak insan sağlığı üzerinde olumlu veya olumsuz etkileri olan yüksek oranda biyoaktif bileşikler olarak tanımlanır. Bu tür ikincil metabolitler, daha yüksek bitki fenotipi ve çeşitli ekolojik ortamlara adaptasyonları yansıtan büyük bir yapısal çeşitlilik gösterir (Wurtzel ve Kutchan, 2016) ve bunların bitkilerdeki biyosentezleri ve işlevleri, eylemleri ile tamamlanmaktadır, bu da fitofarmasi ve fitomedisin gelişimini belirleyerek, sağlığa olan faydaları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bilinen fitokimyasal gruplar; fenolikler (yaklaşık % 45'i temsil eder), terpenoidler ve steroidler (% 27), alkaloidler (% 18) ve diğer organosülfür veya organo-azot türevlerinden oluşmaktadır. Fenolikler, farklı bitki ve gıda kaynaklarında bulunan suda çözünür bileşiklerdir, terpenler ve terpenoidler ise büyük fitokimyasalların lipofilik gruplarıdır. Alkaloidler ve sülfür veya azot içeren fitokimyasallar da bu gruba dahil olmaktadır.

Fitokimyasalların en büyük kategorisi olan fenolik fitokimyasallar bitki krallığında çok yaygın bir şekilde dağılmıştır (Şekil 1.1). Diyet fenoliklerinin en önemli 3 grubu flavonoidler, fenolik asitler ve polifenollerdir. 4000'den fazla fenolik fitokimyasal tanımlanmıştır ve diyet fenoliklerin ana sınıfları gıdalarda 1 mg / kg ile 3000 mg / kg arasında bulunmaktadır. Fenolik fitokimyasal alımının miktarını belirlemek, fenolik fitokimyasalların sayısı ve içeriğini etkileyen faktörler nedeniyle zordur (Lea ve Beech, 1978; Fukutake ve diğ., 1996).



Şekil 1.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması

1.1.1. Flavonoidler

Biyoflavonoidler olarak da adlandırılan flavonoidler, bitkilerde doğal olarak bulunan polifenol antioksidanlardır. Flavonoidler, bitki fenollerinin en büyük ve en çok çalışılan grubudur. Bunlar ikincil metabolitlerdir, yani bitkilerin büyümesi veya gelişmesi ile doğrudan ilgisi olmayan organik bileşiklerdir. Flavonoidler, meyve ve sebze şeklinde tüketildiğinde toksik olmayan ve aynı zamanda insan vücudu için potansiyel olarak faydalı olan bitki besinleridir. Bu bileşikler, bitki boyunca yaygın olarak dağılır, birçok bitkinin çiçek ve meyvelerine canlı renkleri verir. Ayrıca bitkilerin mikrop ve böcek saldırılarından korunmasında da rol oynarlar. Daha da önemlisi, flavonoid içeren gıdaların tüketimi birçok sağlık yararıyla ilişkilendirilmiştir. Araştırmalar, flavonoidlerin tek başına vücut tarafından yavaş emiliminden dolayı minimal antioksidan fayda sağladığını gösterebilir, biyolojik olarak hastalıkla mücadele eden doğal enzimlerin üretimini tetiklediğine dair kanıtlar bulunmuştur (Keller, 2009). Flavonoidler, polifenol yapısında birçok alt grup molekülü de kapsarlar bunlardan en yaygın olanları flavonoller, flavonlar ve flavanollerdir.

Flavonoller ve Flavonlar; Fenilpropanoidlerin ortak iskeletine sahip flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak görülür. Esas olarak monomerik flavanollerden (kateşinler, lökosantosiyanidinler), proantosiyanidinlerden, antosiyanidinlerden, flavonlardan ve flavonollerden, flavanonlardan ve kalkonlardan oluşurlar. Flavonoller, 3-hidroksiflavonlar ve flavonların aksine, 3-deoksiflavonoller olarak kabul edilebilir. Bireysel farklılıklar, hidroksil gruplarının sayısı ve dağılımı ile bu grupların alkilasyonu ve / veya glikozilasyonunun doğası ve kapsamından kaynaklanmaktadır. Diğer flavonoidlerle ortak olarak, bitkilerde en sık bulunan flavonlar ve flavonoller, 3'- ve 4'-pozisyonlarında β -halkalı hidroksilasyona sahip olanları, ardından sadece 4' pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahip olanlardır. Quercetin ve kaempferol bu tip tipik flavonollerdir (Herrman, 1976).

Flavanoller; Diyet flavonoidleri kateşin ve epikateşin, çaydaki gallik asit ile birlikte kombine formda veya meyveler, baklagiller ve tahıllarda yoğunlaştırılmış tanen polimerleri olarak bulunabilmektedir. Olgunlaşmamış meyvelerde flavanol

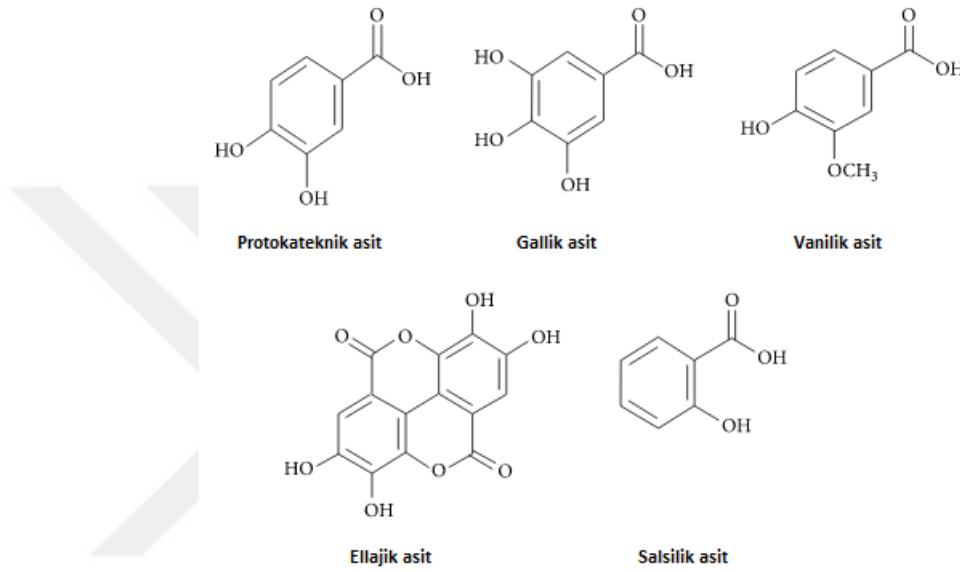
konsantrasyonları daha yüksektir ve kış boyunca depolanan meyveler orijinal flavanol bileşiklerinin sadece yarısına sahip olabilir (Pierpont, 1986).

1.1.2. Fenolik asitler

"Fenolik asitler" terimi genellikle bir karboksilik asit grubuna sahip fenolik bileşikleri tarif eder. Fenolik veya fenolkarboksilik asitler (polifenol adı verilen bir fitokimyasal türü), bitki fenolik bileşiklerinin ana sınıflarından biridir. Bunlar bitki bazlı gıdaların tohum, meyve kabukları ve sebze yapraklarında en yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Tipik olarak, amidler, esterler veya glikozitler gibi bağlı halde, nadiren de serbest formda bulunurlar (Pereira ve diğ., 2009). Fenolik asitler esas olarak iki alt gruba ayrılır (Şekil 1.2). Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler. Fenolik asitler, iyi bilinen antioksidan vitaminlerden çok *in vitro* antioksidan aktiviteye sahiptir. Sinamik asitten türetilen hidroksisinnamik asitler, gıdalarda genellikle kinik asit veya glikoz ile basit esterler halinde bulunur. Mevcut en bol çözünen bağlı hidroksisinnamik asit, klorojenik bir asittir (kafeik ve kinik asitten oluşan bir kombinasyon). En yaygın dört hidroksisinnamik asit ise ferulik, kafeik, p-kumarik ve sinapik asitlerdir. Diğer yandan, hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁'in ortak bir yapısına sahiptir ve benzoik asitten türetilmiştir. Çözünür formda bulunurlar (şekerler veya organik asitlerle konjüge edilir) ve lignin olarak hücre duvarı fraksiyonları ile bağlanırlar (Strack, 1997; Khoddami ve diğ., 2013). Hidroksisinnamik asitlerle karşılaştırıldığında, hidroksibenzoik asitler genellikle kırmızı meyvelerde, soğanlarda ve siyah turplarda düşük konsantrasyonda bulunur. Yaygın olarak bulunan dört hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik, protokatekuik, vanilik ve siringiç asittir.

Fenolik asitler, fekal suda bulunan tüm fenolikler arasında en bol bulunan bileşikler olarak bilinmektedir. Antimikrobiyal aktivite sergiler ve ayrıca gıda koruyucu olarak çalışırlar. Fenolik asitlerin antimikrobiyal potansiyelleri, kimyasal yapı yoluyla özellikle doymuş zincir uzunluğu, çekirdek benzen halkasındaki substitue sayısı ile belirlenmiştir. Fenolik asitler antimikrobiyal aktivitede metil ve butil esterlerinden daha az etki göstermektedir (Cueva ve diğ., 2010). Alkil zincir uzunluğundaki bir artış, oligomerlerin monomerlerine kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu fenolik asitler gibi aktiviteyi büyük ölçüde artırır (Elegir ve diğ., 2008). Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler ayrıca belirli bir bileşikteki hidroksil (-OH) ve metoksi (-

OCH₃) fonksiyonel gruplarının sayısına bağılı olarak farklı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Diğ er zayıf organik asitler gibi hidroksibenzoik asitler de hücre ölümüne yol açan, sitoplazmanın asitleştirilmesi yoluyla antimikrobiyal aktivite gösterirler ve bu asidik sitoplazma membranı boyunca difüze olurlar. Bu nedenle pKa ve lipofiliklik, mikrobiyal zardaki fenolik asitlerin çözünürlüğünü ve karşılık gelen antimikrobiyal kabiliyeti belirlemede anahtar faktörlerdir (Campos ve diğ., 2009).



Şekil 1.2. Bazı fenolik asitler

1.1.3. Tanenler

Tanenler, önemli sayıda bitkisel gıdada bulunan heterojen bir polifenolik bileşik grubunu oluşturur. Tanen terimi, bu bileşiklerin proteinler gibi makromolekülleri etkileşime sokmak ve çöktürme özelliklerinden türetilmiştir. Daha sonra tanenler için genel bir tanım ortaya çıkarılmış ve bu moleküller, çözeltiden protein çöktüren yüksek molekül ağırlıklı polifenoller olarak ifade edilmiştir.

Tanenler, insan ve hayvan yemi olarak kullanılan çeşitli bitkilerde de bulunmaktadır ve yapısal olarak, iki farklı gruba ayrılabilir: hidrolize edilebilir ve yoğunlaştırılmış (King ve Young, 1999).

Birinci grup, gallik asit veya galloil gibi moleküllerin oksidasyonu ile elde edilen asitlerin esterleri olan tanenlerden ve glikozdan oluşan poliollerden oluşmaktadır. Yoğunlaştırılmış tanenler ise, genellikle C-C ve bazen de C-O-C bağları ile bağlanan

kateşin ve / veya epikateşin oligomerleridir (Haslam, 1998). Proantosiyanidinler olarak da adlandırılan yoğunlaştırılmış tanenler, bitkilerde en bol bulunan polifenoller arasındadır.

Tanenler, proteinleri ve diğer makromolekülleri bağlama kapasiteleri nedeniyle çeşitli çalışmaların odak noktası olmuştur. Etkileşimlerin doğası, taninin yapısına, makromolekül tipine ve etkileşimin gerçekleştiği ortamın koşullarına (örn., pH, iyonik güç) bağlı olarak değişmektedir.

1.1.4. Terpenler

Terpenler terimi terebentin (*balsamum terebinthinae*) kökenlidir. "Çam ağaçlarının reçinesi" olarak adlandırılan terebentin, kabuğu ve birkaç çam ağacı türünün yeni ahşabını keserek veya oyduktan sonra akan viskoz hoş kokulu balsamdır. Terebentin, "reçine asitleri" ve başlangıçta terpenler olarak adlandırılan bazı hidrokarbonları içerir. Geleneksel olarak, izopren alt birimlerinden oluşan ve çoğunlukla bitkilerden kaynaklanan tüm doğal bileşikler terpen olarak kabul edilir. Tüm canlı organizmalar, bazı temel fizyolojik fonksiyonlar için terpen üretir ve bu nedenle terpenler doğal ürünleri üretme potansiyeline sahiptirler.

Terpenoidlerin sınıflandırılması, yapılarında bulunan izoprenoid birimlerinin sayısına dayanmaktadır. En büyük kategoriler iki (monoterpenler), üç (seskiterpenler), dört (diterpenler), beş (sesterterpenler), altı (triterpenler) ve sekiz (tetraterpenler) izoprenoid birimine sahip bileşiklerden oluşur (Ashour ve diğ., 2010).

1.1.5. Stilbenler

Stilbenler, fenilpropanoid yolundan türetilen fenolik bileşiklerdir ve temel özelliklerinden biri, bir etan köprüsüne bağlı aromatik halkaların varlığıdır (Fresco ve diğ., 2006). Sayıları ve oluşumları diğer polifenoller kadar değildir, ancak geniş bir profilaktik aktivite spektrumuna sahiptirler. Stilbenler, enflamatuar sitokin ekspresyonunu düşürerek, oksidatif stresi baskılayarak ve inflamasyonla ilişkili gen ekspresyonunu kullanarak biyoaktif özelliklerini sergilerler (Shiby ve diğ., 2009; Yao ve diğ., 2018).

1.1.6. Lignanlar

Lignanlar fenilpropanoid kısımlardan oluşan fenolik bileşiklerdir ve bitkilerde serbest formda bulunurlar. Lignanların başlıca bileşenleri lignanolidler, siklolinaolidler, neolignans ve bisepoksiglikanlardır. Ana formlarının yanı sıra, bağırsak bakterileri lignanları metabolize eder ve entero lignanlar olarak bilinen memeli lignanlarını oluştururlar (Fresco ve diğ., 2006).

1.1.7. Glukozinolatlar

Glukozinolatlar, turpgiller tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir ve amino asit öncüllerinin yapısına bağlı olarak üç sınıfa ayrılır; alifatik glukozinolatlar, aromatik glukozinolatlar ve indol glukozinolatlar (Masahiko ve diğ., 2014). Canlı vücuduna alındıklarında normalde inaktif haldedirler, ancak enzim aktivitesine bağlı bozulmadan sonra izotiyosiyanatlar dahil olmak üzere çok sayıda aktif ürün oluştururlar. Bu metabolitler antikanserojenik, antienflamatuar ve antioksidatif özelliklere sahip oldukları için büyük tıbbi öneme sahiptirler (Jeffery ve Araya, 2009).

1.2. Potansiyel Fitokimyasal Kaynakları

Sebzeler insan beslenmesinde önemli bir rol oynar, mikrobelerin (vitaminler ve mineraller) ve diyet lifi ve prebiyotiklerin yanı sıra sindirilebilir karbonhidratların ve proteinlerin (yumrular, bakliyatlar vb) alımına katkıda bulunan önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, besin bileşimlerinin ötesinde, bitkilerin yapısında önemli olan biyoaktif bileşikler (fitokimyasallar); flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar veya tanenler gibi karotenoidler ve polifenollerin (Brassicaceae'de) de dahil olduğu bileşikler bulunmaktadır.

Fitokimyasallar, sebze ve diğer bitkisel gıda maddelerinin tüketimine ek sağlık yararları sağlayabileceği için son zamanlarda oldukça önem kazanmışlardır. Bu bileşiklerin diyet alımı, kardiyovasküler hastalıklar, tip II diyabet, bazı kanser türleri veya Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nöro dejenerativedis bozukluklar gibi gelişmiş ülkelerde önemli ölüm ve iş göremezlik nedenlerini oluşturan bazı kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi açısından önemi büyüktür. Günümüzde koruyucu etkisi olan meyve sebzelerin birçoğunun fitokimyasal açıdan zengin oldukları

düşünülmektedir, böylece insan beslenmesindeki rollerinin araştırılması gıda araştırmalarında merkezi bir konu haline gelmiştir. Meyve sebzelerin yanı sıra fitokimyasal açıdan zengin olan birçok bitki türü mevcuttur. Özellikle tıbbi (şifalı) bitkiler bunların başında yer almaktadır, çoğu ya ilaç yapımında ya da baharat olarak lezzet verici katkılar olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.2.1. Bilye kekik (*Thymus vulgaris* L.)

Lamiaceae (nanegiller) üyelerinin çoğu yıllık veya çok yıllık bitkilerdir (Şekil 1.3), ancak moleküler çalışmalar bazı odunsu cinslerin Lamiaceae'ye ait olduğunu göstermektedir. Bu şekilde sınırlandırılan Lamiaceae'de 236 cins ve 7.173 tür vardır. Nane ailesinin ana merkezi, Kanarya Adaları'ndan Himalayalara kadar olan Eski Dünya'dır; Etiyopya, Madagaskar, Afrika'nın güney bölgeleri ve Hindistan, Sri Lanka ve doğudaki okyanus bölgelerinde daha az yayılıma sahiptir. Lamiaceae üyeleri genellikle zıt, testere dişli yaprakları, düzenli veya yoğun çiçek kümeleri ve kare gövdeleri ile tanınırlar. Çiçekleri genellikle yumurtalığın derin lobları (jinekobasik stil) arasında ortaya çıkan bir stile sahiptir.



Şekil 1.3. Kekik (*Thymus vulgaris*)

Nane ailesinin üyeleri karakteristik olarak aromatikdir ve birçoğu tıbbi olarak kullanılan eterik veya uçucu yağları, yiyecek ve içeceklerin lezzetlendirilmesi için ve parfümeride kullanılmak üzere yetiştirilir. *Marrubium vulgare* (horehound) ve *Salvia sclarea* (klar adaçayı) yağları tıbbi değere sahiptir. Baharatlar arasında *Origanum majorana* (mercanköşk), *Origanum vulgare* (kekik), *Ocimum basilicum* (tatlı fesleğen), *Salvia officinalis* (adaçayı), *Satureja hortensis* (tuzlu), *Melissa officinalis* (limon balsamı), *Thymus vulgaris* (kekik) ve *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) en bilinen türleridir.

T. vulgaris L. (Lamiaceae) Akdeniz bölgesinden gelen aromatik çok yıllık bir bitkidir (Ismaili ve diğ., 2004) ve dünyanın birçok yerinde aromatik bitki, tıbbi bitki ve gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Timus türleri, çok sayıda farmakolojik aktiviteden sorumlu çeşitli fito-bileşikler içermektedir. İçerdiği bileşiklerinin önemli bir kısmını timol, karvakrol, p-simen, y-terpinen, karyolfilen vb. gibi terpen türleri oluşturmaktadır (Jamali ve diğ., 2012).

Kekik, (*Thymus vulgaris*), kuru yapraklarının ve çiçekli üstlerinin aroması ve lezzeti ile bilinen nane ailesinin (Lamiaceae) keskin kokulu bir üyesidir. Avrasya'ya özgü ve tüm dünyada yetiştirilen kekik; kümes hayvanları, doldurma, balık, yumurta, et, sos, çorba, sebze, peynir ve makarna gibi çok çeşitli yiyeceklerin tadını artırmak için kullanılır. Esansiyel yağının ana bileşeni, parfümlerin ve diğ. macunlarının üretiminde kullanılan timol veya kekik kafurdur. Kekik, fazla uzun olmayan küçük bir çalıdır ve genellikle sıcak iklimlerde yetiştirilir, ancak ılık iklimlerde de her zaman yeşil kalan çok yıllık bir bitkidir. Sapları biraz odunsu ve ovalden doğrusal ve tersine düzenlenmiş basit yaprakları taşır. Küçük tübüler çiçekler saplar boyunca kıvrımlarda taşınır ve genellikle mor veya beyaz renktedir. Arılar kekik çiçeklerini severler ve avrupa ve asyada kekik balı yüzlerce yıldır ünlüdür (Al Laham ve AL Fadel, 2014).

Timus türleri birçok araştırmaya konu olmuş ve bunlardan bazıları antimikrobiyal (Al Laham ve Al Fadel, 2014), antiviral (Sanchez ve Aznar, 2015), antifungal (Kohiyama ve diğ., 2015), antienflamatuvar (Aazza ve diğ., 2014), antikanser (Al-Manhali ve diğ., 2015), anti-hipertansif (Alamgeer ve diğ., 2014), antioksidan ve anti tümör (Aazza ve diğ., 2014) aktivite çalışmalarından oluşmaktadır.

1.2.2. Altın otu (*Helichrysum arenarium*)

Asteraceae familyasına ait *Helichrysum* cinsi yaklaşık 500 türden oluşur ve çoğunlukla doğu yarımkürede, özellikle de birçok türün yetiştiği Afrika ve Madagaskar'da bulunmaktadır. Tercih edilen yetiştirme habitatları orman veya çayırdaki kuru ve kumlu topraktır. *Helichrysum arenarium*, 50 cm'ye kadar ulaşan, grimsi yaprakları ve beyaz kaplamalı gövdeleri ile çok yıllık bir bitkidir (Şekil 1.4). Doğal yaşam alanlarından *H. Arenarium* üzerine yapılan fenotipik çalışmalar, çiçeklerin renginin sarıdan turuncuya değiştiğini göstermektedir (Radusiene, 2002). Çiçek

salkımlarının çoğu sarı renk tonlarındadır ve sadece birkaç bitki (tüm bitkilerin sadece yaklaşık % 7'si) turuncu veya hatta kahverengi rasemlere sahiptir.



Şekil 1.4. Altın otu (*Helichrysum arenarium*)

Helichrysum türlerinin çoğu, güçlü farmakolojik özelliklere (Vernin ve Poite, 1998) sahip olan uçucu yağları veya özleri için incelenmiştir. *H. arenarium*'un (*Helichrysi flos*) çiçekleri, uzun zamandır Avrupa fitoterapi uygulamalarında koloretic diüretik, anti-inflamatuvar, hepatoprotektif, detoksifiye edici ve antiradikal aktivite özellikleri sebebi ile kullanılmaktadır. *H. arenarium* böbrek taşı, üro genital bozukluklar, mide ağrısı, sarılık, ishal, astım, safra kesesi ve mide rahatsızlıkları, sistit ve artrit tedavisinde de kullanılmaktadır. Öksürük ve soğuk algınlığı için de çay şeklinde hazırlanmakta veya yaprakları sütte kaynatılarak içilmektedir. Ağrı kesici etkisi sebebiyle de yaprakları yakılarak dumanı solunmaktadır. Yaprakları ayrıca enfeksiyonu önlemek için yaralarda yaygın olarak kullanılmaktadır. *H. arenarium*'un bu etkileri içerdikleri flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Tüm fenolik sınıflar, serbest radikal giderimi, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite dahil olmak üzere fizyolojik işlevleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Moghadam ve diğ, 2014).

1.2.3. Gül (*Rosa damascena mill.*)

Gül, çiçekçilik endüstrisi için en önemli ürünlerden biridir. Rosaceae familyasına ait *Rosa* cinsi 200 tür ve 18.000'den fazla çeşidi içermektedir. Çoğunlukla, kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerine dağılmışlardır. Kesme çiçekler, saksı bitkileri ve bahçe bitkileri olarak kullanılmasının yanı sıra, güller doğal koku ve lezzet kaynağı olarak da yaprakları için ekonomik öneme sahiptir. Gül yağı üretimi için temel olarak

dört tür vardır ve bunlar *R. damascena* Mill., *R. moschata* Hemmer., *Centifolia* L. ve *R. gallica* L.'dir.

Ekstraksiyon ile elde edilen gül çiçeği kokusu, üretilen en değerli lezzet ve kokulardan biridir. Gülün en yaygın aroma konsantreleri, buhar damıtma ile elde edilen gül yağı ve gül suyudur. *R. damascena*, yüksek yağ içeriğine ulaşmak için çiçeklenme sırasında ılımlı sıcaklıklara ve nemli havaya ihtiyaç duyar. Bu tür güller çoğunlukla ılıman iklimlerde, genellikle 300-1500 m arasındaki bir yükseklikte yetiştirilmektedir (Şekil 1.5). *R. damascena*'nın uçucu yağları, parfüm uygulamaları ve kozmetik preparatlarda kullanımları ile bilinmektedir (Ardogan ve diğ., 2002).



Şekil 1.5. Isparta gülü (*Rosa damascena* Mill.)

Gül yağı sadece parfümeri ve kozmetikte geniş uygulamasıyla değil, aynı zamanda aroma özellikleriyle birlikte, bakteriyostatik, safra iyileştirici, antispazmodik ve rahatlatıcı özelliklerini işlemek için tanınmış değerli bir doğal ilaç ajanıdır (Ozel ve diğ., 2006). Ayrıca bu bitkinin farmakolojik etkileri de incelenmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda *R. damascena* esansiyel yağının antioksidan, antibakteriyel ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir. Dünyadaki ana gül yağı üreticileri Türkiye ve Bulgaristan'dır ve gül yağını *R. damascena*'dan temin etmektedirler (Nejem ve diğ., 2011).

1.2.4. Doğal ekstratların antimikrobial aktiviteleri

Çalışmamızda kullanılan kekik (*Thymus vulgaris*), altın otu (*Helichrysum arenarium*) ve gül (*Rosa damascena mill*) bitikleri geçmişten günümüze dünyanın birçok ülkesinde biyolojik aktiviteleri nedeni ile hem endüstride hem de halk tıbbında birçok

uygulamada kullanılmaktadır. Bu üç tür ile ilgili yapılan biyolojik aktivite çalışmaları Tablo 1.1, 1.2. ve 1.3’de verilmiştir.

Tablo 1.1. Kekik (*Thymus vulgaris*) antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Aktivite	Organizma	Metod	Fitokimyasallar	Bölge	Referans
Antibakteriyel	<i>S. aureus</i> <i>P. Aeruginosa</i>	Disk difüzyon	γ -terpinen, Timol, α -pinen, camphen, oleik asit	İran	Zhiani ve diğ., 2016
Antifungal	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. Tonsurans</i>	Hayvan deneyi	Thymol	Sırbistan	Sokovic ve diğ., 2008
Antibakteriyel	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Disk difüzyon	carvakrol, γ -terpinen para-simen	Tunus	Benmoussa ve diğ., 2016
Antifungal	<i>C. albicans</i> H37 <i>C. glabrata</i> H16 <i>C. Krusei</i> H9	M.i.K	-	Portekiz	Das Nevex ve diğ., 2009
Antibakteriyel	<i>E coli</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. Pneumoniae</i>	M.i.K	-	Yunanistan	Fournomuti ve diğ., 2015
Antibakteriyel Antifungal	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i> <i>C. Albicans</i> <i>A. Flavus</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>L.</i> <i>Monocytogenes</i>	Agar well difüzyon M.i.K	α -tocopherol α -tocotrienol linoleic asit oleik asit	Suudi Arabistan	Assiri ve diğ., 2016

Tablo 1.2. Altın otu (*Helichrysum arearium*) antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Aktivite	Organizma	Metod	Fitokimyasallar	Bölge	Referans
Antibakteriyel Antifungal	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i> <i>K. Pneumoniae</i> <i>A. Baumann</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i>	Mikro dilüsyon	-	Türkiye	Kutluk ve diğ., 2018
Antibakteriyel	<i>A. Hydrophila</i> <i>B. brevis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	Agar difüzyon	Chlorogenic acid Apigenin	Türkiye	Albayrak ve diğ., 2010
Antibakteriyel Antifungal	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>S. cereviciae</i> <i>C. albicans</i> <i>A. Flavus</i> <i>A. Parasiticus</i>	Mikro dilüsyon	Kafeik asit Syringic asit Hidroksibenzoik asit Kumarik asit Apigenin Kuersetin	İran	Moghadam ve diğ., 2014
Antibakteriyel Antifungal	<i>C. Albicans</i> <i>E. coli</i> <i>M. Luteus</i> <i>P. tolaasii</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. typhimurrium</i> <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Mikro dilüsyon	Limonen diepi- α -cedrene α -ylangene	Sırbistan	Rancic ve diğ., 2005

Tablo 1.3. Gül (*Rosa damascena Mill.*) antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Aktivite	Organizma	Metod	Fitokimyasallar	Bölge	Referans
Antibakteriyel	<i>E. coli</i> <i>S. piyogenes</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>E. faecalis</i>	Mikro dilüsyon	β -citronellol geraniol β -phenyl ethyl benzoate	İran	Mahboubi ve diğ., 2011
Antibakteriyel	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Disk difüzyon	Kafeik asit Vanilik asit Gallik asit Kojik asit	Türkiye	Akin ve diğ., 2019

1.3. Fitokimyasal Analiz Yöntemleri

Bitkiler ilaç endüstrisinde geniş yapısal çeşitliliklerinin yanı sıra çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri nedeniyle de tanınmaktadır. Fitokimyasallar ise bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Bu fitokimyasallar, yaprak, çiçek, tohum, kabuk, kök ve hamur gibi bitkilerin çeşitli kısımlarından türetilir ve doğrudan tıbbi ajanların kaynağı olarak kullanılır. Ayrıca daha karmaşık olan yarı sentetik kimyasal bileşiklerin işlenmesi için bir hammadde tabanı görevi de görürler. Bu kısımda temel olarak bitkilerin toplanması, çeşitli kısımlarından aktif bileşiklerin ekstraksiyonu ve fitokimyasalların kalitatif/kantitatif analizleri hakkında bilgi verilecektir.

1.3.1. Bitkilerin toplanması ve temizlenmesi

Söz konusu bitkiler ya vahşi doğadan ya da herbaryumlardan toplanabilir. Bitkiler vahşi doğadan toplandığında, yanlış tanımlanma riski vardır. Yaban hayatı bitkilerinin en büyük avantajı, herhangi bir böcek ilacı içermemesidir. Bitkiler vahşi veya herbaryumdan toplandıktan sonra, bitkilerde bulunan fitokimyasalların bozulmasını önlemek için uygun bir şekilde temizlik için işlenmelidirler. Temizleme işlemi, yaprakların gövdelerinden temizlenmesi, yıkanması ve soyulması adımlarını içerebilir (Altemimi ve diğ., 2017).

1.3.2. Kurutma

Kurutmanın temel amacı, bitkinin depolanabilmesi için su içeriğini uzaklaştırmaktır. Bitkiler, toplanır toplanmaz hemen kurutulmalıdır, aksi takdirde bitki materyallerinin bozulmasına neden olur. Kurutma iki yöntemle yapılabilir; bunlardan biri doğal işlem diğeri ise yapay işlemdir.

Doğal süreç güneşte kurutmayı içerir. Bazen bitkiler, ahırlarda veya kulübelerde hava ile kurutulacak kurutma çerçevelerine veya stantlara yerleştirilir. Ancak bu tam kuruma için birkaç hafta sürebilir. Zaman; sıcaklığa ve neme bağlıdır.

Yapay kurutma, yapay kurutucular yardımıyla yapılabilir. Bu işlem, kuruma süresini birkaç saat veya dakikaya indirebilmektedir. Tıbbi bitkilerin kurutulmasında izlenen yaygın yöntem, sıcak hava ile kurutmaktır. Bu işlemde bitkiler, ılık havanın üflendiği kurutucu plakalarına yerleştirilir. Bu yöntem esas olarak kırılğan çiçek ve yapraklara

uygulanabilir ve bitkilerin yüklenmesi ve boşaltılması manuel olarak yapılması gerektiğinden, doğal kurutmaya göre daha zordur (Altemimi ve diğ., 2017).

1.3.3. Ekstraksiyon metotları

1.3.3.1. Bitki dokusu homojenizasyonu

Çözücüde bitki dokusu homojenizasyonu araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde; kurutulmuş veya ıslak, taze bitki kısımları bir karıştırıcıda ince parçacıklar halinde öğütülür, belirli bir miktarda çözücü içine konur ve 5-10 dakika boyunca kuvvetlice çalkalanır veya 24 saat bekletilir, daha sonra özü süzülür. Süzüntü daha sonra indirgenmiş basınç altında kurutularak konsantrasyonu belirlemek için çözücü içinde yeniden çözündürülür (Das ve diğ., 2010).

1.3.3.2. Seri kapsamlı ekstraksiyon

Çok çeşitli bileşiklerin ekstre edilebilmesini sağlamak için polar olmayandan (heksan) daha polar bir çözücüye (metanol) artan polariteye sahip çözücülerle ardışık ekstraksiyonu içeren bir başka yaygın ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem sıcaklıkla bozunmaya uğrama ihtimali olan bileşikler için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Das ve diğ., 2010).

1.3.3.3. Sokslet ekstraksiyon

Sokslet ekstraksiyonu sadece istenen bileşiğin bir çözücü içinde sınırlı bir çözünürlüğe sahip olması ve safsızlığın bu çözücü içinde çözünmediği durumlarda gereklidir. İstenen bileşik, bir çözücü içinde yüksek bir çözünürlüğe sahipse, bileşiği çözünmeyen maddeden ayırmak için basit bir filtrasyon kullanılabilir. Bu sistemin avantajı, numuneden çok sayıda ılık çözücü geçirilmesi yerine, sadece çözücünün geri dönüştürülmesidir (Nikhal ve diğ., 2010).

1.3.3.4. Maserasyon (Islanıp-yumuşatma)

Maserasyonda (sıvı ekstrakt için), bütün veya iri toz haline getirilmiş bitki parçaları, çözünür madde eriyene kadar sık sık çalkalama ile belirli bir süre boyunca

dondurulmuş bir kap içinde çözücü ile temas halinde tutulur. Bu yöntem, termolabil ilaçlar durumunda kullanım için en uygun yöntemdir (Ncube ve diğ., 2008).

1.3.3.5. Perkolasyon

Bu, tentürlerin ve sıvı ekstraktlarının hazırlanmasında aktif bileşenleri çıkarmak için en sık kullanılan prosedürdür. Genel olarak bir süzücü (her iki uça açık, koni şeklinde dar bir kap) kullanılır. Katı bileşenler, belirtilen çözücünün uygun bir miktarı ile nemlendirilir ve iyi kapanmış bir kapta yaklaşık 4 saat bekletildikten sonra analiz edilmek istenen kısım toplanarak süzgecin üstü kapatılır. Analiz edilecek bitki parçalarının üzerinde sıg bir tabaka oluşturmak için ek çözücü eklenir ve karışımın kapalı süzücüde 24 saat boyunca maserasyonuna izin verilir. Ardından da süzücü çıkışı açılarak içinde bulunan sıvının yavaşça damlaması sağlanır. Daha sonra posa preslenir, elde edilen sıvı perkolata ilave edilir ve ekstra çözücü eklenerek tekrar süzme işlemi ile berraklaştırılır (Handa ve diğ., 2008).

1.3.4. Kalitatif analizler

1.3.4.1. Alkaloidler

Mayer testi; Birkaç ml bitki örneği ekstraktına, test tüpünün kenarları boyunca iki damla Mayer reaktifi eklenir. Beyaz kremalı çökeltinin ortaya çıkması alkaloitlerin varlığını gösterir.

Wagner testi; Test tüpünün kenarları boyunca birkaç ml bitki ekstraktına birkaç damla Wagner reaktifi eklenir. Kırmızımsı kahverengi bir çökelti testi pozitif olarak teyit eder (Evans, 1997).

1.3.4.2. Amino asitler

Ninhidrin testi; 2 ml sulu filtrat'a iki damla ninhidrin çözeltisi (200 ml asetonda 10 mg ninhidrin) ilave edilir. Mor rengin ortaya çıkması, amino asitlerin varlığını gösterir.

1.3.4.3. Karbonhidratlar

Molish testi; 2 ml bitki örneği ekstraktına, iki damla alkollü α -naftol çözeltisi eklenir. Karışım iyice çalkalanır ve test tüpünün kenarları boyunca birkaç damla konsantre sülfürik asit eklenir. Mor bir halka karbonhidratların varlığını gösterir.

Benedict testi; 0.5 ml filtrata, 0.5 ml Benedict reaktifi eklenir. Karışım, sıcak su banyosunda 2 dakika ısıtılır. Karakteristik bir renkli çökelti şekerin varlığını gösterir.

1.3.4.4. Katı ve sıvı yağlar

Spot testi; İki filtre kağıdı arasına az miktarda ekstrakt preslenir. Kağıt üzerindeki yağ lekesi, sabit yağların varlığını gösterir.

Sabunlaşma testi; Bir damla fenolftalein ile birlikte az miktarda ekstrakta birkaç damla 0.5 N alkollü potasyum hidroksit çözeltisi eklenir. Karışım bir su banyosunda 2 saat ısıtılır. Sabun oluşumu veya alkalinin kısmi nötralizasyonu, sabit sıvı ve katı yağların varlığını gösterir (Kokate, 1999).

1.3.4.5. Glikozitler

50 mg özüt, bir su banyosu üzerinde 2 saat boyunca konsantre hidroklorik asit ile hidrolize edilerek süzülür ve hidrolizat aşağıdaki testlere tabi tutulur.

Borntrager testi; 2 ml filtrelenmiş hidrolizata 3 ml kloroform eklenerek çalkalanır, kloroform katmanı ayrılır ve buna %10 amonyak çözeltisi eklenir. Pembe renk glikozitlerin varlığını gösterir.

Legal testi; 50 mg özüt piridin içinde çözülür, sodyum nitroprussid çözeltisi eklenir ve %10 NaOH kullanılarak alkali haline getirilir. Glikozit varlığı pembe renk oluşturur.

1.3.4.6. Fenolik bileşikler ve taninler

Ferrik klorit testi; Ekstrakt (50 mg) 5 ml damıtılmış su içinde çözülür ve birkaç damla nötr %5 demir klorür çözeltisi eklenir. Koyu yeşil renk fenolik bileşiğin varlığını gösterir.

Jelatin testi; Ekstrakt (50 mg) 5 ml damıtılmış su içinde çözülür ve buna %10 NaCl içeren 2 ml %1 jelatin çözeltisi eklenir. Beyaz çökelti, fenolik bileşiklerin varlığını gösterir.

Kurşun asetat testi; Ekstrakt (50 mg) damıtılmış su içinde çözülerek 3 ml %10 kurşun asetat çözeltisi eklenir. Hacimli beyaz bir çökelti, fenolik bileşiklerin varlığını gösterir.

Alkali reaktif testi; Ekstraktın sulu bir çözeltisi, %10 amonyum hidroksit çözeltisi ile işlenir. Sarı floresans flavonoidlerin varlığını gösterir (Mace, 1963).

1.3.5. Kantitatif analizler

1.3.5.1. Toplam fenolik madde

Fenolik bileşikler, meyve ve sebzeler de dahil olmak üzere çoğu bitki dokusunda yaygın olarak bulunan fitokimyasallardır. Bu fitokimyasallar, şikimik asit ve fenilpropanoid biyoreaksiyonları yoluyla sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Fenolik bileşikler çok sayıda biyoaktif özelliğe sahiptirler ve besin maddesi olmamalarına rağmen, diyet ile alımları sağlığa koruyucu etkiler sağlar. Bu nedenle hasat sonrası uygulamalar meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşiklerin içeriğini arttırmak veya korumak için kullanılmaktadır.

Bitkilerde toplam fenolik bileşiklerin hesaplanmasında en yaygın olarak kullanılan yöntem Folin-Ciocalteu yöntemidir. Uygun koşullar altında, test monofenoller ve doğada bulunan fenol tipleri ile öngörülebilir reaksiyonlar verir. Bu analiz yönteminde farklı fenoller farklı derecelerde tepki verdiğiinden, sonuçların litre gallik asit denkliği başına miligram gibi tek bir sayı olarak ifade edilmesi ile sonuçlar belirlenir. Reaksiyon bağımsız, kantitatif ve öngörülebilir olduğundan, bir fenol karışımının analizi, başka herhangi bir standart yöntem kullanılarak da paralel olarak hesaplanabilir (Singleton ve diğ., 1999).

1.3.5.2. Toplam flavanoid madde

Flavonoidler, değişken fenolik yapılara sahip meyve, sebze, tahıl, ağaç kabuğu, kök, sap, çiçek, çay ve şarapta bulunan doğal maddelerdir. Bu doğal ürünler sağlık üzerindeki yararlı etkileri ile bilinir ve flavonoidlerin kaynaklarından izole edilmesine

yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Bu moleküller artık çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Anti-oksidatif, anti-enflamatuar, anti mutajenik ve anti-kanserojen özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Panche ve diğ., 2016).

1.3.6. Kromatografik analizler

Bitki araştırmalarında kullanılan kimyasal yöntemler arasında olan kromatografik analiz, kromatografik yöntemlerin sayısız avantajı olması nedeniyle tıbbi bitki analizinin ayrılmaz bir parçası olarak çok önemli bir rol oynar. Kromatografik yöntemler arasında fitokimyasal analizlerde en sık kullanılan yöntemler; bir ve iki boyutlu kağıt kromatografisi, bir ve iki boyutlu ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı kolon kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve karşı akım kromatografisi (CCC)'dir (Tablo 1.4). Bu yöntemler, bileşenlerin bileşen karışımlarından ayrı ayrı preparatif ve mikro preparatif ölçekte izole edilmesi için de kullanılabilir.

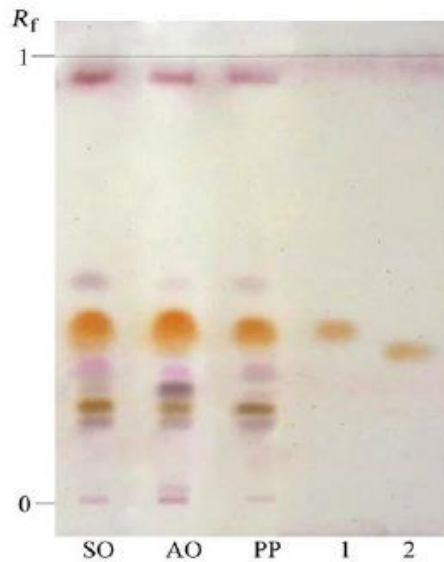
Tablo 1.4. Yaygın olarak kullanılan fitokimyasal ayırma ve tanılama teknikleri

Kromatografi	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)
	Gaz Kromatografisi (GC)
	Yüksek Çözünürlüklü Sıvı Kromatografisi (HPLC)
	Kılcal sıvı kromatografisi (u-LC)
Elektroforez	İnce Tabaka Elektroforezi (TLE)
	Kapiler Elektroforez (CE)
Spektroskopik Teknikler	UV spektroskopisi
	Kızıl ötesi spektroskopisi (IR)
	Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi (NIR)
	Nükleer Manyetik rezonans Spektroskopisi (NMR)
	Kütle Spektroskopisi (MS)

1.3.6.1. İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Hem biyolojik hem de kimyasal tespit yöntemleri ile ince tabaka kromatografisi, bitki özlerinin incelenmesi için etkili ve ucuz bir tekniktir. Böylece hem sofistike laboratuvarlarda hem de minimum ekipmana erişimi olan küçük laboratuvarlarda gerçekleştirilebilmektedir. TLC biyolojik bir tespit yöntemi ile birleştirildiğinde TLC biyo-otografi olarak tanımlanmakta ve bu yöntem tarihsel olarak 1946'dan beri bilinmektedir (Goodall ve Levi, 1946).

İnce tabaka kromatografisi plakalar üzerinde uygun bir çözücü ile yürütülen bir örneğin biyolojik aktivitesini saptamanın bir yoludur. Sadece küçük miktarlarda numune gerektirir ve sıklıkla karmaşık karışımlar olarak ortaya çıkan bitki bileşenlerinin araştırılması için idealdir. Bu bileşenlerin hedefe yönelik izolasyonu için kullanılabilir (Şekil 1.6). HPLC'nin aksine, birçok numune aynı anda TLC üzerinde çalıştırılabilir ve enzimlerin inaktivasyonuna veya canlı organizmaların ölümüne neden olan organik çözücüler, biyolojik saptamadan önce tamamen çıkarılabilir. Birçok biyo-deney TLC ile uyumludur. Kullanılan testler arasında antimikrobiyal, radikal süpürücü, antioksidan aktiviteler ve enzim inhibisyon özelliği bulunmaktadır (Marston, 2011).



Şekil 1.6. TLC uygulamasına bir örnek

1.3.6.2. Gaz kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi çoğunlukla uçucu yağların polar olmayan bileşiklerinin analizi için kullanılır. Son zamanlarda genellikle kütle spektrometresi (GC-MS) ile birleştirilerek kullanılmaktadır. Bu teknik, bir bileşiğin molekül ağırlığının belirlenmesine izin verir ve bir moleküler iyon belirlendikten sonra, bu iyonu, hidrojen, karbon, oksijen ve içinde bulunabilecek diğer atomların tam sayısını belirlemek için doğru bir şekilde ölçmeyi mümkün kılar. MS'de elektron etkisi yaygın olarak kullanılan çeşitli teknikler mevcuttur. Bu teknikler molekülün parçalanmasını sağlar ve fragmanlar molekülde bulunan fonksiyonel gruplara tahsis edilebildiğinden yapı aydınlatılmasında faydalıdır. Kimyasal iyonizasyon (CI), elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve hızlı atom bombardımanı (FAB) kütle spektrometresi gibi daha yumuşak teknikler molekülü daha az enerji ile iyonize eder; sonuç olarak, moleküler iyonlar genel olarak mevcuttur, fakat yapı aydınlatılması amacıyla daha az parçalanma aşaması vardır (Gherman ve diğ., 2000)

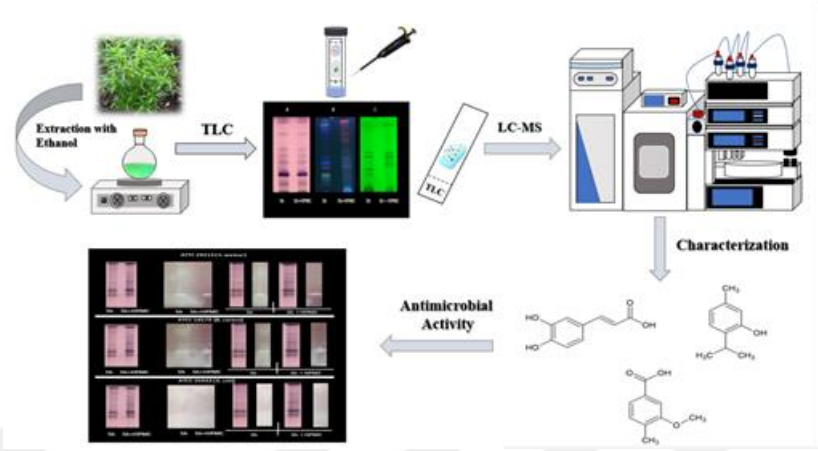
1.3.6.3. Yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi doğal ürünlerin analizi ve izolasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekniğin analitik duyarlılığı, özellikle fotodiyot dizisi gibi UV saptaması ile birleştirildiğinde, 190 ile 800 nm arasında elüsyon piklerinin UV spektrumlarının elde edilmesini sağlar. Bu sistemin akış hızı tipik olarak 0,5 – 2,0 mL / dakikadır ve analitik modda numune yüklemesi bitki ekstresi bileşenlerinin saptanmasına ve ayrılmasına izin verir.

1.3.6.4. Birleştirilmiş yöntemler

Biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin hızlı tespiti, ham bitki ekstraktlarının fitokimyasal incelemesinde stratejik bir rol oynamaktadır. UV fotodiyot dizi tespiti ve kütle spektrometresine (LC-MS, LC-MS-MS, GS-MS) bağlı HPLC kullanılan teknikler (Şekil 1.7), izolasyondan önce metabolitler üzerinde çevrimiçi çok sayıda yapısal bilgi sağlamaktadır. Tüm bu birleşik tekniklerin kullanımı, bilinen bitki bileşenlerinin sadece bir miktar bitki materyali ile hızlı bir şekilde yapısal olarak belirlenmesini sağlar. Böyle bir yaklaşımla, ortak doğal ürünlerin zaman alıcı izolasyonundan kaçınılır ve araya giren spektroskopik veya biyolojik özellikler

gösteren bileşiklerin etkili bir şekilde hedeflenmiş izolasyonu gerçekleştirilebilir (Wolfender ve diğ., 1998).



Şekil 1.7. Bitkiden elde edilen ekstratların fitokimyasal ve biyolojik aktivite belirlenmesinde izlenen yol şeması

1.4. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal duyarlılık testi yeni ilaçların keşfi, epidemiyoloji ve terapötik çalışmaların tahmini için kullanılmaktadır. Neredeyse tüm önemli antibiyotik grupların (tetrasiklinler, sefalosporinler, aminoglisozitler ve makrolidler) keşfedildiği "Altın çağ" da ki devrimden bu yana antibiyotiklere karşı oluşan mikrobiyal direnç artmaktadır ve bu nedenle antibiyotikler etkinliklerini kaybetme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Çoklu ilaca dirençli bakterilerin günümüzdeki etkisi, ilişkili tedavi yöntemlerindeki başarısızlıklar ve halk sağlığı için küresel bir endişe haline gelmiştir (Mayers ve diğ., 2009).

1.4.1. Doğal ekstratlarda antimikrobiyal aktivite

Yeni antibiyotiklerin keşfi oldukça önemli bir amaç olarak araştırmacıların en başta ilgilendiği konular arasındadır. Doğal ürünler, hala yeni ilaç moleküllerinin en önemli kaynaklarından biri konumundadır ve hali hazırda yeni antibiyotikler; prokaryotik bakteriler, ökaryotik mikroorganizmalar, bitkiler ve çeşitli hayvan organizmalarından türetilmektedirler. Bu bağlamda yeni antibiyotik maddelerin keşfedildiği kaynaklar arasında bitkiler ve mikrobiyal kaynaklar ilk sırada yer almaktadır (Bredy, 2005).

Bitkiler ve diğer doğal kaynaklar çok çeşitli kompleks ve yapısal olarak çeşitli bileşikler sağlayabilir. Son zamanlarda, birçok araştırmacı potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak bitki ve mikrobiyal ekstraktlar, uçucu yağlar, saf ikincil metabolitler ve yeni sentezlenmiş moleküllerin araştırılmasına odaklanmıştır (Mabona ve diğ., 2013). Bununla birlikte, bu doğal ürünlerin antimikrobiyal etkisi hakkındaki yayınlanmış makaleler incelendiğinde, suş hazırlama teknikleri, suş aşılama boyutu, büyüme ortamı, kuluçka koşulları gibi farklı standartlaştırılmamış yaklaşımlar nedeni ile sonuçlar arasındaki karşılaştırma genellikle zordur.

1.4.2. Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemleri

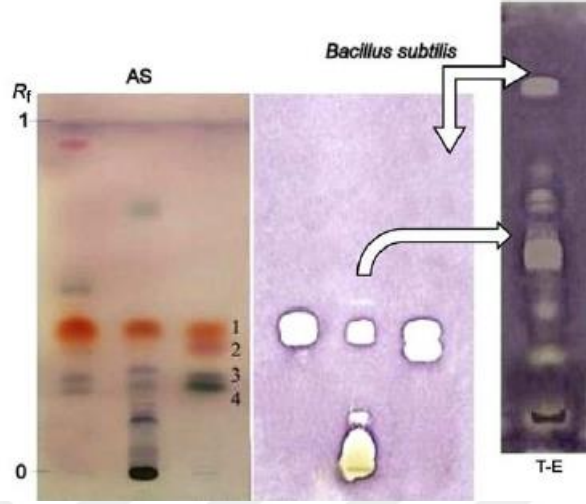
Bir ekstraktın veya saf bir bileşiğin in vitro antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılabilmektedir. En bilinen ve temel yöntemler, disk difüzyon, well difüzyon ve sıvı agar veya agar seyreltme yöntemleridir. Bunun yanı sıra; birçok fitokimyasal bileşiği yapısında bulunduran bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de TLC-biyootografi yöntemidir. Bu yöntem diğerlerine göre daha az zaman gerektiren ve uzun ön hazırlık işlemleri olmayan bir yöntem olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle diğer bilinen yöntemlerde bitki ekstratlarının fitokimyasal bileşiminin aktiviteleri ölçülebilirken, bu yöntemde ekstratta bulunan fitokimyasal maddelerin ayrı ayrı aktiviteleri tespit edilebilmektedir.

1.4.2.1. TLC-Biyootografi

TLC biyo-otografisi, bench-top biyo-analizler kategorisine giren ve kısa sürede minimum numune ile yapılabilen kompakt ve basit testlerdir. Biyo-analizler, canlı bir organizmadan elde edilen bir ekstraktın veya saf bir maddenin biyolojik aktivitesini saptamak için kullanılan testler olarak tanımlanırken, “bench-top” yöntemleri kullanıldığında zaman tasarrufunun oldukça yüksek olduğu bilinmektedir.

Biyo-otografi genellikle biyolojik bir etki veya süreci tespit etmek için kullanılan kimyasal bir yöntemin uygulanmasıdır (Şekil 1.8). TLC-biyo-otografi ise karmaşık bir karışımı ayıran ve aynı zamanda aktif bileşenleri TLC plakası üzerinde lokalize eden basit bir çevrimiçi veya yerinde yöntem olarak bilinmektedir. Bu yöntemde, birçok bileşeni bir arada içeren doğal ekstratların yapısındaki bileşenler uygun bir mobil faz

ile ayrılarak oluşan her bir bandın antimikrobiyal aktivitesi ayrı ayrı belirlenebilmektedir.

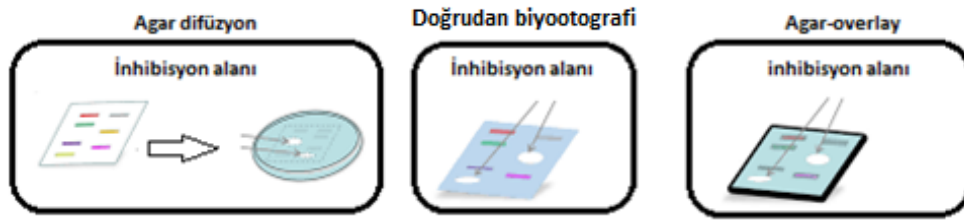


Şekil 1.8. TLC-Biyootografi çalışma örneği

Bu durum, TLC uygulaması olmadan belirlenen antimikrobiyal aktivite yöntemlerine göre oldukça büyük bir avantajdır. TLC uygulaması olmayan yöntemlerde, tek bir bileşimin aktivitesi değil de sadece bir örneğin biyoaktif toplamı belirtilir.

HPLC'den farklı olarak, bu yöntemde aynı anda birkaç numune uygulanabilir ve numunelerin kromatografisi kesinlikle aynı koşullar altında elde edilir. Bu yöntemin HPLC'ye göre bir başka avantajı da enzimlerin veya canlı organizmaların inaktivasyonuna neden olabilecek organik mobil fazın TLC de buharlaşması ve böylece tespiti engellememesidir.

HPLC çevrimiçi biyodeneylemlerin, mobil faz ile de uyumlu olması gerekmektedir (Marston ve diğ., 1999). TLC yönteminin uygulanabilirliğinin kolay olması ve diğer yöntemlere göre daha az maliyetli olması bu yöntem için geliştirilen antimikrobiyal aktivite çalışmalarının da artmasına sebep olmuştur. Bunlardan en yaygın olanları TLC-agar difüzyon, TLC-doğrudan biyoautografi ve TLC-agar overlay yöntemleridir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. TLC-Biyotografi çeşitleri

TLC-agar difüzyon;

Agar difüzyonu (veya temas biyootografisi), antimikrobiyal ajanın kromatogramdan bir mikroorganizma ile inoküle edilmiş bir agar plakasına difüzyonu yoluyla transferini içerir. Bitki özütü uygun mobil faz kullanılarak yürütülür ve plaka kurutulduktan sonra, çalışılacak bakteri ile inoküle edilmiş agar ortamına plakanın ekstratın yürütüldüğü yüzü gelecek şekilde agar ile temas ettirilir.

Uygun ortamdaki üreme sonrası, agar yüzeyinde ekstratın bantlarının geldiği alanlarda üreme olmayan noktalar tespit edilir. Bu yöntemde bileşiklerin kromatogramdan agar plakasına diferansiyel difüzyonundan kaynaklanan sorunlar ortaya çıkabilir. Bu durum, özellikle suda çözünmeyen numuneler için geçerlidir (Chomnawng ve diğ., 2009).

TLC-Doğrudan biyootografi;

Doğrudan biyo-otografide, geliştirilen TLC plakasına bir mantar veya bakteri süspansiyonu püskürtülür veya içine daldırılır. Bu yöntem, doğrudan TLC plakası üzerinde büyüeyebilen mikroorganizmalar için geçerlidir ve özellikle bulaşma riski olan patojen mikroorganizmalar ile çalışıldığında, uygulanan püskürtme ve daldırma işlemleri nedeniyle ekstra dikkatli olunmasını gerektirir.

Doğrudan biyootografik prosedürler, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Cladosporium* (Humans and Fuchs, 1970) gibi spor üreten mantarlar ve ayrıca bakteri (Hamburger and Cordell, 1987) çalışmaları için tanımlanmıştır.

TLC-Agar overlay (bindirme);

Agar-bindirme tekniği diğer iki yöntemin (Direk biyootografi ve Agar difüzyon) bir karışımıdır ve geniş bir mikroorganizma spektrumuna uygulanabilir. İyi tanımlanmış inhibisyon bölgeleri sağlar ve kontaminasyona duyarlı değildir. Agardaki belirli mikroorganizmaların uygun bir sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyonu, geliştirilen TLC plakası üzerine hafifçe eklenir ve daha sonra nemli bir atmosferde birkaç saat inkübe edilerek mikroorganizmaların büyümesine izin verilir.

Aktif bileşikler, sabit fazdan mikroorganizmaya bir difüzyon işlemi ile aktarılır (Hockett ve Baltrus, 2017).

1.4.2.2. Disk difüzyon

İlk olarak 1940 yılında geliştirilen Agar disk difüzyon testi (Heatley, 1944), birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin antimikrobiyal duyarlılık testi için kullanılan resmi bir yöntemdir.

Günümüzde, bakteri ve maya testi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından kabul edilmiş ve onaylanmış birçok standart yayınlanmaktadır (Tablo 1.5) Bütün dirençli bakteriler bu yöntemle doğru bir şekilde test edilemese de, *streptokok*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* gibi bazı dirençli bakteriyel patojenleri test etmek için belirli kültür ortamları, çeşitli inkübasyon koşulları ve yorumlayıcı kriterler kullanılarak standardizasyon yapılmıştır (CLSI dokümanı, 2012).

Bu iyi bilinen prosedürde, agar plakaları test mikroorganizmasının standart bir konsantrasyonunu içeren mikroorganizma süspansiyonu ile inoküle edilir. Ardından da, istenen konsantrasyonda test bileşimini içeren filtre kağıdı diskleri (yaklaşık 6 mm çapında) agar yüzeyine yerleştirilir ve petri kapları uygun koşullar altında inkübe edilir. Genel olarak, antimikrobiyal ajan agar içine yayılarak test mikroorganizmasının gelişmesini ve büyümesini engeller ve daha sonra inhibisyon büyüme bölgelerinin çapları ölçülür.

Tablo 1.5. CLSI tarafından önerilen antimikrobiyal duyarlılık test yöntemleri için kültür ortamı, mikrobiyal inokulum boyutu ve inkübasyon koşulları

Metot	Mikro organizma	Büyüme ortamı	Nihai inokulum kons. (CFU/mL)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	İnkübasyon süresi (saat)
Disk difüzyon	Bakteri	MHA	(1-2)x10 ⁸ (0.5 McFarland)	35 ± 2	16 - 18
	Maya	MHA + GMB	(1-5)x10 ⁶ (0.5 McFarland)	35 ± 2	20 - 24
	Küf	Non-supplemented MHA	(0.4 - 5)x10 ⁶	-	-
Mikrodilüsyon	Bakteri	MHB	5 x 10 ⁵	35 ± 2	20
	Maya	RPMI 1640	(0.5 - 2.5) x 10 ³	35	24 - 48
	Küf	RPMI 1640	(0.4 - 5)x10 ⁴	35	48
Makrodilüsyon	Bakteri	MHB	5 x 10 ⁵	35 ± 2	20
	Maya	RPMI 1640	(0.5 - 2.5) x 10 ³	35	46 - 50
	Küf	RPMI 1640	(0.4 - 5) x 10 ⁴	35	48
Agar dilüsyon	Bakteri	MHA	10 ⁴ CFU/spot	35 ± 2	16 - 20
Time-kill	Bakteri	MHB	5 x 10 ⁵	35 ± 2	0, 4, 18, 24

MHA: Mueller Hinton Agar. MHB: Mueller Hinton broth GMB: ortam,% 2 glüköz ve 0.5 mg / mL metilen mavisi ile desteklenmiştir. RPMI: Roswell Park Memorial Enstitü besi yeri (glutamin ile, bikarbonat olmadan ve pH göstergesi olarak fenol kırmızıyla), 0.165 M'de MOPS (morfolin propan sülfonik asit) ile pH 7.0'a tamponlandı.

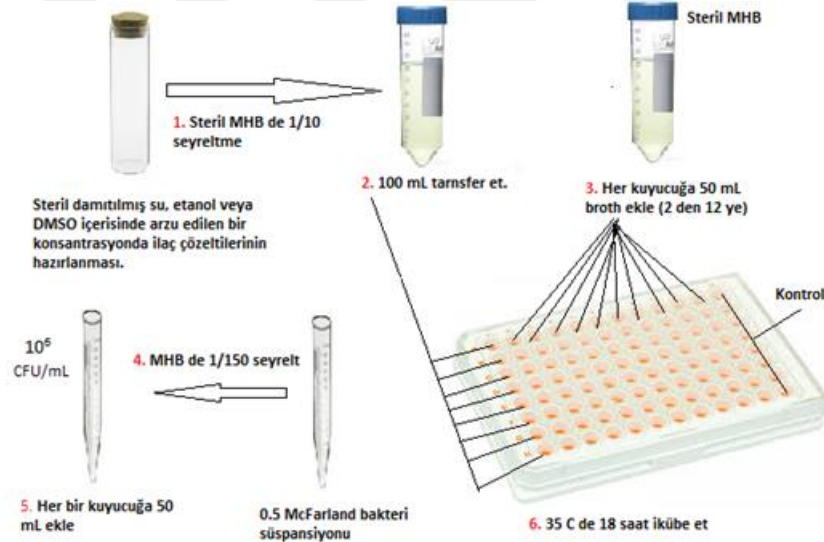
1.4.2.3. Agar well difüzyon

Agar well (kuyu) difüzyon yöntemi, bitkilerin veya mikrobiyal ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Disk difüzyon yönteminde kullanılan prosedüre benzer şekilde, önce agar plak yüzeyi mikrobiyal inokulumun bir hacminin tüm agar yüzeyi üzerine yayılması ile inoküle edilir, daha sonra ise, çapı 6 ila 8 mm olan bir delik, steril bir mantar delici veya bir uç ile septikal olarak delinerek kuyuya istenen konsantrasyonda bir hacim (20-100 mL) antimikrobiyal ajan veya ekstrakt çözeltisi eklenir. Agar plakalarının test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe edilmesinin ardından

antimikrobiyal ajan agar ortamında yayılır ve test edilen mikrobiyal suşun büyümesini engeller (Magaldi ve diğ., 2004).

1.4.2.4. Mikro- ve makro- dilüsyon

Sıvı mikro veya makro dilüsyon, en temel antimikrobiyal duyarlılık test yöntemlerinden biridir. Prosedür, minimum 2 mL (makrodilüsyon) içeren tüplerde veya 96 oyuklu mikrotitrasyon plakası (mikrodilüsyon) kullanılarak daha küçük hacimlerde dağıtılan bir sıvı büyüme ortamında antimikrobiyal ajanın iki kat seyreltilerinin hazırlanmasını içerir. Daha sonra her tüp veya oyuk, 0.5 McFarland ölçeğine ayarlanmış standart mikrobiyal süspansiyonun seyreltilmesinden sonra aynı ortamda hazırlanan bir mikrobiyal süspansiyon ile inoküle edilir. İnoküle tüpler veya 96 oyuklu mikrotitrasyon plakası, iyi bir karıştırmadan sonra, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında (çoğunlukla çalkalama olmadan) inkübe edilir (Balouiri ve diğ., 2016) (Şelil 1.10).



Şekil 1.10. CLSI tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon test protokolü

MİK (Minumum inhibitör konsantrasyonu), tüplerde organizmanın büyümesini veya mikro-dilüsyon kuyularını tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonudur (CLSI metot, M07-A9). Mikrodilüsyon yönteminden farklı olarak, makrodilüsyon yönteminin başlıca dezavantajları; uzun zaman gerektirmesi, manuel işlemlerin çok fazla olması, her test için antimikrobiyal çözeltilerin hazırlanmasındaki hata riski ve nispeten büyük miktarda reaktif gerektirmesi olarak sıralanabilir. Bu

nedenle, testin basitleştirilmesiyle, oluşan reaktiflerin ve alanın hem ekonomik hem de tekrarlanabilirlik özelliği mikrodilüsyon yönteminin başlıca avantajlarıdır.

1.4.2.5. Agar dilüsyon

Agar seyreltme yöntemi, antimikrobiyal ajanın arzu edilen çeşitli konsantrasyonlarının seri iki kat seyreltmeler kullanılarak bir agar ortamına (erimiş agar ortamı) eklenmesini ve ardından da tanımlı bir mikrobiyal suş ile agar yüzeyine inoküle edilmesini içerir. MİK değeri, uygun inkübasyon koşulları altında büyümeyi tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu olarak kaydedilir. Bu teknik hem antibakteriyel hem de antifungal duyarlılık testi için uygundur. Birden fazla izolat tek bir bileşiğe karşı test ediliyorsa veya test edilen bileşik (veya ekstrakt) sıvı ortamdaki mikrobiyal büyümenin renklendirilmesiyle saptanmasını maskeliyorsa, MİK tayini için agar seyreltme yöntemi tercih edilir. Bu yöntem hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı uygulanabilir ve E-Test ile iyi bir korelasyon sunar (Baker ve diğ., 1991).

1.4.2.6. Time-kill

Time-kill testi, bakterisidal veya fungisidal etkiyi belirlemek için kullanılan en uygun yöntemdir ve antimikrobiyal ajan ile mikrobiyal suş arasındaki dinamik etkileşim hakkında bilgi elde etmek için güçlü bir araçtır. Ayrıca; zamana veya konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde de etkilidir. Bu test bakteriler için iyi standardize edilmiş ve CLSI'nin M26-A belgesinde açıklanmıştır (CLSI, M26-A). Çalışma sıvı besi yeri ortamında içerisinde 5×10^5 CFU/mL bakteri süspansiyonu içeren 3 tüp kullanılır. İlk iki tüp test edilecek antimikrobiyal maddenin $1 \times \text{MİK}$ ve $0.25 \times \text{MİK}$ konsantrasyonlarını içerirken, 3. tüp ise kontrol olarak kullanılır. Farklı zaman aralıklarında inkübe edilen örneklerden alınan numuneler agar ortamına inoküle edilerek, agar plak sayma yöntemi kullanılarak numune alınan her bir tüpün canlı hücre sayısı CFU/mL cinsinden hesaplanır. (Konate ve diğ., 2012)

1.5. Sütürler (Dikiş iplikleri)

Yara iyileşmesi sağlanana kadar yara dudaklarını yaklaştırmak ya da karşı karşıya getirerek tespit etmek ve meydana gelen kanamaların kontrolünü sağlamak amacıyla

kullanılan doğal ya da sentetik malzemelere ameliyat ipliği ve Latince “suture” denilmektedir.

Sütürler son 4000 yıldır kullanılmaktadır. Eski Mısır'dan yapılan arkeolojik kayıtlar, Mısırlıların yaraları kapatmak için keten ve hayvan tendonlarını kullandıklarını göstermektedir. Dikişler, yara kapanması ve doku yaklaşımı için en sık kullanılan biyomateryaldir. Yaralanmaların neden olduğu kesikleri veya cerrahi ve yara yaklaşımı gibi diğer tıbbi prosedürlere bağlı insizyonu kapatmak için kullanılırlar. Deride, iç dokularda, organlarda ve kan damarlarında yaygın olarak kullanılırlar. İki farklı sütür çeşidinden biri kendi kendine çözülen emilebilir sütürler, bir diğeri ise, belirli bir süre sonra çıkarılan emilemeyen sütürlerdir. Sütür pazarı şu anda yıllık 1.3 milyar doları aşmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve İngiliz Farmakopeseleri, sütür üretimi için standartlar ve yönergeleri belirleyen sütür endüstrisinin başında gelen kuruluşlardır. Sütür boyutları, 10'dan 1'e kadar verilen sayılar ile adlandırılır ve 1-O ile 12-O arasında değişen çapı temsil eden bir sayı da verilir, 10-O çapı en büyüktür ve 12-O, bir insan saçı ile aynı çapta olmaktadır (Chellamani ve diğ., 2013).

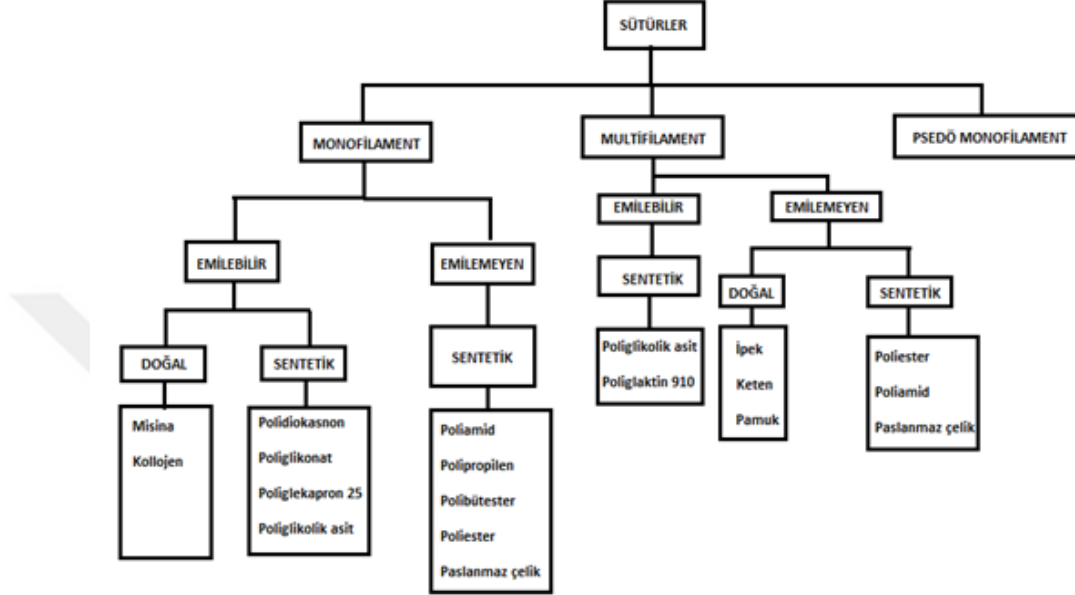
1.5.1. Sütürlerin sınıflandırılması

Dikişler, üretim süreçlerine göre geniş bir şekilde 3 gruba ayrılabilir. Bunlar i) Monofilament sütürler, ii) Multifilament sütürler, iii) Emilebilen sütürler ve iiii) Emilemeyen sütürler (Adanur, 1995). Sütürlerin kapsamlı bir sınıflandırması Şekil 1.11'de gösterilmektedir.

1.5.1.1. Monofilament sütürler

Pürüzsüz bir yüzeye sahip olan monofilament sütürler, sadece polimer ekstrüzyon yöntemi ile sentetik malzemeden üretilmektedirler ve en önemli özellikleri minimal doku reaksiyonu vermeleridir. Bunun nedeni de bu sütürlerin pürüzsüz bir yüzeye sahip olmasıdır. Monofilament sütürlerin, multifilament sütürlere kıyasla yüzeylerinde daha az bakteri hayatta kalabilmektedir ve vücudun deri altında bulunan derin kısımlarına da düğüm yapmak veya yerleştirmek kolaydır. Ayrıca bu sütürler, multifilament sütürlere oranla daha az esnek yapıdadır ve düğüm dayanıklılığı düşüktür. Monofilament sütürlerin üretiminde polyester, poliamid, polipropilen ve

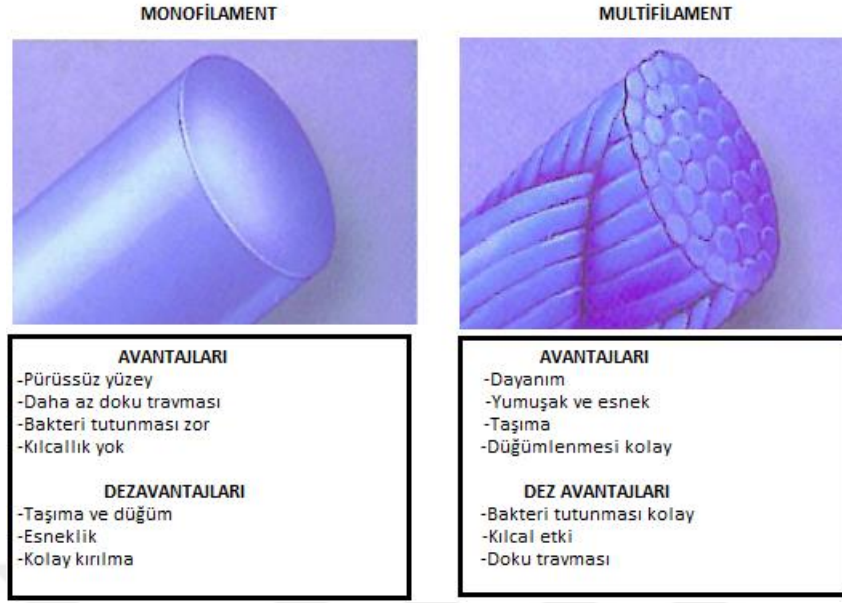
polidioksanon kullanılmaktadır. Polyester, yüksek bir düğüm çekme mukavemetine, iyi esnekliğe ve düşük bozulmaya sahiptir. Polipropilen mükemmel doku sürüklemesi ve stabilitesine sahiptir. Polidioksanon ve poliglikolik asit-polikarbonat kopolimeri ise, vücut dokusunda hidrolitik işlem vasıtasıyla kademeli olarak çözünebilmektedir.



Şekil 1.11. Sütürlerin yapılarına göre sınıflandırılması

1.5.1.2. Multifilament sütürler

Multifilament iplikler örgülü dikişler oluşturmak için birlikte bükülebilir. Örgülü bir sütür oluşturmak için, genellikle sekiz ila on altı monofilament iplik kullanılmaktadır. Üretim yöntemi nedeniyle, örgülü sütürler pürüzlü bir yüzeye sahiptir ve bu da doku sürüklenmesinin (aşınmasının) yüksek olmasına neden olur. Doku aşınmasını azaltmak ve daha iyi bükülebilirlik sağlamak için örgülü sütür malzemesinin yüzeyine bir yağlayıcı uygulanır. Örgüler, monofilament sütürlere kıyasla esnek ve kullanımları kolaydır. Poliesterler, poliamidler ve ipekler örgülü sütürlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Monofilament ve multifilament sütürlerin yapısal görüntüleri, avantaj ve dezavantajları Şekil 1.12’de verilmiştir (Erol ve diğ., 2014).



Şekil 1.12. Monofilament ve multifilament suturelerin avantaj ve dezavantajları

1.5.1.3. Emilebilen sutureler

Emilebilir sutureler, enzimatik bozunma ve birbirini izleyen hidrolitik veya tek başına hidrolitik olarak 60 gün içinde bozunur ve gerilme mukavemeti kaybına uğrar. Bu sutureler doğal ve sentetik olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar.

Katgut (doğal): Yaygın olarak kullanılan suture hayvan bağırsaklarından elde edilir ve %99'dan fazla saf kollajendir. Koyun bağırsaklarının submukozundan veya sığır bağırsaklarının serolarından elde edilir. Monofilamenttir ve bir enzimatik sindirim süreci sonunda eriyerek emilir. Emilim oranı büyüklüğe ve ayrıca bağırsağın düz veya kromize olup olmadığına bağlıdır. Katgut'un en büyük avantajı, emilebilir olması ve enfeksiyon varlığında bile kullanılabilmesidir. Çekme mukavemeti kaybı emilimden daha hızlıdır.

Kollajen (Doğal): Geleneksel katgutun dezavantajlarının üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Kollajen eldesinde; sığır etlerinin fleksör tendonları dağılmış fibrillere dönüştürülerek ekstrüde edilir ve kollajen sutureleri oluşturmak üzere yeniden işleme alınır.

Polidioksanon (sentetik): Monofilament formdadır ve polidioksanon polimerinden türetilir. 180 – 190 günde hidrolize olarak emilir. 14 gün implantasyondan sonra

gerilme direncinin % 26'sını, 28 gün sonra % 42'sini ve 56 gün sonunda ise % 86'sını kaybeder. 6 haftalık implantasyondan sonra hala gerilme mukavemeti yarı ömrüne sahiptir. Düğüm dayanımı yüksek, minimal doku sürüklemesi ve minimal yabancı cisim reaksiyonu vardır.

Poliglikonat (sentetik): Glikolik asit ve trimetilenin kopolimeridir. Monofilament yapıdadır. 60. günden başlayıp 180. günden itibaren hidroliz yolu ile emilimi tamamlanır. Çekme mukavemetini 21 günden daha fazla korur. Kopma mukavemetinin yarı ömrü ise 28 gün civarındadır. Kullanımı kolay ve tüm sentetik monofilament emilebilir sütürlerin arasında en iyi düğüm güvenliğine sahiptir. Tendon onarımı için naylon ve polibutesterden daha etkilidir.

Poliglecarprone (Sentetik): Monofilament formdadır ve kaprolakton ve glikolidin kopolimeridir. Dokuda 90 ila 120 günde hidrolize olarak emilir. İmplantasyonun 7. gününde çekme dayanımının %50'sini, 14. günde %75'ini ve 21. günde çekme dayanımının tümünü kaybeder. Yüksek düğüm güvenliği, minimal doku reaksiyonu ve azalan esnekliği sayesinde iyi kullanım özelliklerine sahiptir. İmplantasyon sonrası hızlı gerilme mukavemeti kaybı nedeniyle, hızla iyileşen dokular için kullanılmalıdır.

Poliglikolik asit (sentetik): Örgülü yapıda olan sütürlere aittir. Glikolik asitten sentezlenir. 100 ila 120 gün içinde hidroliz ile emilir. İmplantasyondan sonraki 7 gün içinde gerilme mukavemetini %33, implantasyondan sonraki 14 gün içinde ise %80 kaybeder. Temiz ve kontamine yaralarda yaygın olarak kullanılır. Katgut sütürlere göre üstün gerilme mukavemetine sahiptir ve dokuya tutunma özellikleri oldukça iyidir. Alkali ortamda düğüm güvenliği zayıftır ve stabilitesini kaybetme gibi dezavantajları vardır.

Polyglactin 910 (sentetik): Örgülü formda mevcuttur. Glikolik asit ve laktik asit kopolimeridir ve kalsiyum stearat ile kaplanmıştır. 100 -120 gün içerisinde hidrolize olur. İlk 14 ila 21 gün implantasyon için çekme mukavemetini korur. Ayrıca kaplanmış formda da mevcuttur. Kaplanmış formdaki polyglactin 910 sütürün kullanımı daha kolaydır ve daha az doku sürüklemesi, minimal doku reaksiyonu verir bu sebeple kontamine olmuş yaralarda kararlıdır. Alkali ortamda kararlı, daha yüksek çekme mukavemeti ve düğüm mukavemeti gibi avantajlara sahiptir (Abdesselam, 2009).

1.5.1.4. Emilemeyen sütürler

Emilemeyen sütürler gerilme mukavemetini 60 günden daha uzun süre korur. Emilebilen sütürlerde olduğu gibi doğal ve sentetik olarak iki ana gruba ayrılırlar.

İpek (doğal): Örgülü formda mevcuttur. İpek solucan larvalarının kozasından yapılır. Bazı durumlarda vaks ya da silikonla kaplanmaktadır. İki yıl sonra gücünü kaybeder. M kemm l kullanım özelliklerine ve düğüm güvenliğine sahiptir. Daha çok oftalmolojide kullanılır. Bu sütürlerin ana dezavantajları, düğüm güvenliğini azaltan, doku reaksiyonunu, enfeksiyonu ve kılcallığı teğvik eden kaplamadır (Chatterjee, 1975).

Keten (doğal): Ketenden yapılır. B k lm ğ biçiminde mevcuttur. Genel cerrahi, jinekoloji, kardiyovasküler cerrahi, gastrointestinal cerrahi ve plastik cerrahi için kullanılmaktadırlar. Keten sütür emilmez ve bu nedenle gerilme mukavemetini kaybetmez. Islak olduğunda %10 gerilme mukavemeti kazanır. Silikon ve polivinil  z eltisi ile iğlenmiğ olarak da mevcuttur (Shalon, 2013).

Pamuk (doğal): II. Dünya Savağı sırasında ipek sütürün yerini almak üzere 1939'da sütür malzemesi olarak kullanılmaya bağlanmığtır. Pamuk bitkisinin tohum tüylerinden çıkarılır. Islakken  ekme mukavemeti ve düğüm güvenliği kazanır. İmplantasyondan sonra gerilme mukavemetini yavağ yavağ kaybeder, 6 ayda % 50 gerilme mukavemeti kaybı ve 2 yılda % 70 gerilme mukavemeti kaybı ger ekleğir. İpekt n daha iyi düğüm güvenliği vardır. Pamuk sütürün dezavantajları; kılcallığı, doku reaktivitesi, elektrostatik özelliklerden ötürü d ğ k kullanım kabiliyeti ve enfeksiyonu artırıcı özelliğidir (Boothe, 1993).

Polyester (sentetik): Polyester sütür, düz ve kaplanmış formlarda bulunan örgülü bir multifilamenttir. Dikiğ dokuya uygulanırken içinden sürtünmeyi azaltan polib tilat, teflon ve silikon içeren kaplamalar uygulanmaktadır. Bu sütür, mevcut en güçlü metalik olmayan s t rlerden biridir ve dokulara implantasyondan sonra gerilme mukavemetinde çok az kayıp olur veya hiç kaybolmaz. Uygun şekilde yerleğtirildikten sonra polyester dikiğler, dokuları yavağ a iyileğtirmek için uzun süreli destek sunar. Polyester sütürün dezavantajları ise; zayıf düğüm dayanımı, yüksek sürtünme katsayısı ve özellikle kontamine ortamlarda doku reaktivitesidir.

Poliamid (sentetik): Naylon ve polimerize kaprolaktam, kolayca temin edilebilen poliamid sütürlerin örnekleridir. Hem monofilament hem de multifilament formda üretilmektedirler. İmplantasyondan sonra, monofilament naylon sütürler kimyasal bozulma nedeniyle 2 yıl boyunca orijinal gerilme mukavemetinin yaklaşık % 30'unu kaybeder. Multifilament naylon, dokuda 6 ay sonra gerilme mukavemetinin tümünü kaybeder.

Polipropilen(sentetik): Monofilament formunda mevcuttur. Poliiolefin plastiklerinden sentezlenir. İmplantasyon sonrası gerilme mukavemetini azaltır. Tüm monofilament metalik olmayan sentetik dikiş malzemelerinden daha yüksek düğüm güvenliğine sahiptir. Cildin kapatılması için en iyi strdr. Bununla birlikte, gerilme mukavemeti, tüm monofilament metal olmayan sütürlere kıyasla daha azdır.

Paslanmaz elik: Paslanmaz elik hala yaygın olarak kullanılan tek metalik strdr. Hem monofilament hem de örgülü formda mevcuttur. Biyolojik olarak inerttir ve doğada kendiliğinden var olmaz. Otoklavlama işlemi ile kolayca sterilize edilebilir. Tüm dikiş malzemelerinin en yüksek gerilme mukavemeti ve düğüm dayanımına sahiptir ve bu mukavemeti dokulara implantasyonda korur.

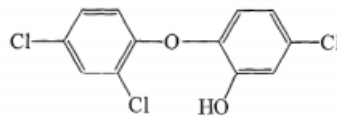
1.5.2. Antimikrobiyal sütürler

Tıp biliminde polimerik biyo-malzemelerin kullanımı son birkaç yılda önemli ölçüde artmıştır. Bu malzemelerin önemli uygulamalarından biri cerrahi sütürler alanındadır. Yara bölgesinde bir sütürün varlığı, dokunun enfeksiyona duyarlılığını artırabilir. Yara enfeksiyonu ile ilişkili mikroorganizmalar hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri içerir. Johnson & Johnson'dan Vicryl plus, antimikrobiyal davranış sergileyen biyolojik olarak znebiyen tek strdr. Bununla birlikte, Edmiston ve arkadaşları (2004), triklosan ile kaplayarak antimikrobiyal Vicryl sütür geliştirmişlerdir. Bu sütürlerin Gram pozitif ve Gram negatif klinik izolatlarla karşı mikrobik yapışmayı önlemede etkili olduğu gözlenmiştir. Halihazırda mevcut olan biyo-sütürler antimikrobiyal aktiviteye sahip değildir ve yara iyileşme sürecinde enfeksiyon oluşabilmektedir. Bu nedenle, çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterecek şekilde fonksiyonel modifikasyon ile sütür geliştirme çalışmaları oldukça ilgi çekmektedir. Antimikrobiyal ajanların polimerik materyallere dahil

edilmesiyle antibakteriyel aktiviteye sahip polimerik materyaller geliştirmek için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (Chung ve diğ., 1998; Stevanato ve Tedesco, 1998; Naagiep ve Gammal, 1986; Freddi ve diğ., 2001).

Ameliyat sonrası yara enfeksiyonları hala sık görölen nozokomiyal enfeksiyon tipleridir ve zayıf iyileşme, ameliyat sonrası da en sık görölen komplikasyonlar arasında olmaya devam etmektedir. Enfeksiyon riski nedeniyle, dikiş malzemelerinin antimikrobiyal aktivite ile kaplanması stratejisi, tıbbi malzemelerin bakteriyel kolonizasyonunu en baştan önlemek için düşünülmüştür.

Howell (1965), dikişe başlamadan önce tüm sütür materyallerinin 1/2.000 klorheksidin çözeltisine batırılmasını önermiştir, ancak birçok üretici kendisine karşı çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda önleyici strateji olarak, biyofilmler oluşmadan önce profilaktik antibiyotikleri veya kolonizasyonu önleyen ya da antimikrobiyal özelliklere sahip 'akıllı' yüzeyler çalışılmıştır. Kaplama yüzeyleri için potansiyel antiseptikler arasında klorheksidin polihexametilen biguanid (PHMB), oktenidin ve triklosan bulunur. Bakteriyel yapışma ve biyofilm oluşumunu önleyen antimikrobiyal emdirilmiş implantlar, uzun süreli, etkisiz, sistemik antibiyotik kullanımını azaltırken, mikrobiyal direnç üretimi riskini ve implantın çıkarılması ihtiyacını azaltabilir. İdeal olarak, antiseptikler, uzun süreli etkileri olan ve antimikrobiyal direnç geliştirme riski olmayan hızlı ve güçlü bir mikrobiyosidal spektruma sahip olmalıdır. Tıbbi ürünlerle biyolojik olarak uyumlu olmalı, iyileşme süreçlerini bozmamalı ve toksisitesi veya sistemik emilimi olmayan yaralarda iyi tolere edilmelidir (Leaper ve diğ., 2010). Son zamanlarda sütürlere antimikrobiyal aktivite kazandırmak için kullanılan en yaygın madde triklosandır (şekil 1.13).



şekil 1.13. Triklosanın yapısı

Triklosan 5-kloro-2 (2,4-diklorofenoksi fenol), 40 yıl önce geliştirilmiş geniş spektrumlu bir antimikrobiyal maddedir (şekil 9). Başlangıçta, etki mekanizmasının bakteri hücre zarının spesifik olmayan bozulması yoluyla olduğu düşünülmekteydi.

Bununla birlikte, daha yeni çalışmalar, triklosan hedefinin, bakteriyel yağ asidi sentezini (özellikle enzim enoil-asil taşıyıcı protein redüktaz) bloke eden Fab I geni olduğunu ortaya koymuştur (Fleck ve diğ., 2007). Triklosanın amoksisilin, gentamisin, nitrofurantoin ve florokinolon gibi diğer antibiyotikler ile sinerjistik etkisinde de önemli artışlar gözlemlenmiştir.

1.5.3. Nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan bakteriler

Cerrahi bölge enfeksiyonu (CBE), cerrahi müdahaleden sonra sık görülen bir komplikasyondur ve CBE oranı, cerrahi alanın anatomik konumuna bağlı olarak % 25'e kadar çıkabilir. CBE başlangıcı, cerrahi dikişler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Owens ve diğ., 2008). Bakterilerin sütür yüzeyine tutunabilmeleri sütürün yapısı ile alakalıdır ve bu tür enfeksiyonların ortaya çıkmasını teşvik eder. Bu enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin başında, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci* ve *Pseudomonas aeruginosa* yer almaktadır (Alves ve Rosa, 2007).

1.5.3.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli, insan kolon florasının baskın fakültatif anaerobudur. Organizma tipik olarak bebeklikten başlayarak gastrointestinal sistemi yaşamı boyunca kolonize eder ve daha sonra bakteri ve konakçı karşılıklı yarar sağlar (Drasar ve Hill, 1974). *E. coli* genellikle bağırsak lümeniyle zararsız bir şekilde sınırlıdır; bununla birlikte, zayıflatılmış veya bağışıklığı baskılanmış konakçıda veya gastrointestinal bariyerler ihlal edildiğinde, bakterinin normal "patojenik olmayan" suşları bile enfeksiyona neden olabilir. Patojenik *E. coli*'ye bağlı enfeksiyonlar mukozal yüzeylerle sınırlı kalabileceği gibi vücutta da yayılabilir. Üç genel klinik sendrom, patojenik *E. coli* suşları ile enfeksiyondan kaynaklanır: (i) idrar yolu enfeksiyonu, (ii) sepsis / menenjit ve (iii) enterik / ishal hastalığı.

Bakteri, Enterobacteriaceae ve *Escherichia* ailesinde çoğunlukla hareketli gram negatif basiller içeren *Escherichia* cinsinin bir alt türüdür (Bettelheim, 1994), aerobik koşullar altında 37 °C'de genel veya seçici ortam üzerinde klinik örneklerden kolayca üretilebilir (şekil 1.14). Epidemiyolojik veya klinik amaçlar için, *E. coli* suşları, varsayımsal görsel tanımlamadan sonra genellikle agar plakalarından seçilir.



Şekil 1.14. *E. coli* elektron mikroskop görüntüsü

1.5.3.2. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus, çok çeşitli klinik belirtilere neden olan önemli bir bakteriyel insan patojendir. Enfeksiyonlar hem toplum kökenli hem de hastane kaynaklı ortamlarda yaygındır ve MRSA (Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*) gibi çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle tedavinin yönetilmesi oldukça zorlaşmaktadır. *S. aureus* çevremizde bulunur ve aynı zamanda normal insan florasında, cilt ve mukoza zarlarında (çoğunlukla burun bölgesi) bulunmaktadır. Bakteri normalde sağlıklı ciltte enfeksiyona neden olmaz; ancak, kan dolaşımına veya iç dokulara girmesine izin verilirse, çeşitli ciddi enfeksiyonlara neden olabilir (Lowy, 1998).

Bakteri, kok-şekilli olan ve “üzüm benzeri” olarak tanımlanan kümelerde düzenlenmeye meyilli olan Gram-pozitif bakterilerdir (Gram lekesi ile mor leke). Bulundukları ortamda %10'a kadar tuzda büyüyebilir ve koloniler genellikle altın rengi veya sarıdır. Bu organizmalar aerobik veya anaerobik (fakültatif) olarak ve 18 °C ile 40 °C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebilirler. Tipik biyokimyasal tanımlama testleri arasında katalaz pozitif (tüm patojenik *Staphylococcus* türleri), koagülaz pozitif (*S. aureus*'u diğer *Staphylococcus* türlerinden ayırmak için) ve manitol fermantasyon pozitif (*Staphylococcus epidermidis*den ayırt etmek için) bulunmaktadır (Rasigade ve Vandenesch, 2014).

S. aureus enfeksiyonlarının tedavisi büyük ölçüde enfeksiyon tipine ve ilaca dirençli suşların varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Antimikrobiyal tedaviye ihtiyaç

duyulduğunda, tedavi süresi ve modu büyük ölçüde enfeksiyon tipine ve diğer faktörlere bağlıdır. Genel olarak, izolatlar duyarlıysa penisilin (MSSA veya metisiline duyarlı *S. aureus* suşları) ve MRSA suşları için vankomisin tercih edilen antibiyotiklerdir (Tong ve diğ., 2015).



2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve özellikleri Tablo 2.1’de liste halinde verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar

Adı	Firma	Adı	Firma
Deiyonize su	Aldrich	Sülfirik asit	Merck
Heksan	Sigma	Timol	Merck
Etanol	Sigma	2,4 metil katekol	Merck
DMSO	Aldrich	Vanilik asit	Merck
Kloroform	Sigma	Gallik asit	Merck
Metanol	Merck	Sinamik asit	Merck
Formik asit	Merck	Kojik asit	Merck
Etil asetat	Merck	Naringin	Merck
Toluen	Merck	Kafeik asit	Merck
Aseton	Merck	Kuersetin	Merck
p-Anisaldehit	Sigma	Pirokatekol	Merck
Asetik asit	Merck	ATCC 25922 suş	ATCC
Seftriakson	Merck	ATCC 25923 suş	ATCC
Hidroksi propil metil selüloz	Acar Kimya	ATCC 29213 suş	ATCC
Karboksi metil selüloz	Acar Kimya	Mueller Hinton Broth	Merck
Arabik gam	Acar Kimya	Mueller Hinton Agar	Merck
Cellan gam	Acar Kimya	3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide	Sigma

2.2. Bitki Materyalleri

2.2.1. Bitki materyallerinin hazırlanması

Thymus vulgaris (Tv) ve *Helichrysum arenarium* (Ha) bitkileri, Mayıs 2018'de Uludağ (Bursa-Türkiye) Kocayayla platosundan 1400 m yükseklikte toplandı. Bitkiler musluk suyu ve deiyonize su ile yıkandı ve su buharlaşana kadar oda sıcaklığında tutuldu. *Helichrysum arenarium* ve *Thymus vulgaris*'in çiçekleri bitki gövdesinden manuel olarak ayrıldı ve çiçek açan bölümler, 10 gün boyunca (30°C ve %15 nem koşullarında) filtre kağıdı üzerinde nem kabininde (memmert) kurutuldu. Kurutulmuş kırmızı *Rosa damascena* Mill. (Rm) çiçekleri yerel bir aktardan (Isparta-Türkiye) satın alındı. Kurutulmuş bitki kısımları, laboratuvar tipi bir değirmende öğütülerek toz haline getirildi ve deneyler yapılana kadar 4°C'de saklandı.

2.2.2. Bitkilerin ekstraksiyonu

İlk olarak 100 g toz haline getirilmiş bitki, oda sıcaklığında 24 saat boyunca 500 mL heksan ile ekstrakte edildi. Whatman (no 6) filtre kağıdından iki kez filtre edildikten sonra, çözücü evaporatörde uçuruldu ve tortu, bir stok çözelti verecek şekilde heksan içerisinde çözüldürüldü. Ekstraksiyon işleminden sonra yapılan filtreleme işleminden elde edilen bitki oda sıcaklığında 5 gün boyunca kurutuldu. Heksan ekstraksiyon işlemi ile bitkinin yapısında bulunan yağ ve yağ asitlerinden arındırılan bitki materyalleri 300 mL etanolde 24 saat boyunca oda sıcaklığında otomatik çalkalayıcıda ekstrakte edildi. 3 kez filtre edildikten sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı, kalan kısım 50 mL DMSO da çözülerek stok çözelti hazırlandı ve deneyler yapılana dek buzdolabında amber renkli şişede muhafaza edildi (20Y).

2.3. Bitki Ekstratlarının Fitokimyasal Analizi

2.3.1. İnce tabaka kromatografisi

10 mg/mL konsantrasyonda ki bitki ekstratı çözeltileri daha önce elde edilen stok çözeltilerden hazırlandı. Ticari olarak satın alınan silika jel TLC alüminyum levhalar (60 F254), 10 cm x 10 cm boyutlarında kesildi. 5 µL ekstrat ve test edilen standart bileşiklerin 3 µL standart çözeltileri (2 mg/mL), plakanın tabanından 10 mm ve kenarlardan 10 mm kalacak şekilde 8 mm genişliğinde bantlar halinde plakalara

yüklendi. Örnekler levhalara manuel olarak 0-100 µL lik otomatik bir pipet kullanılarak yüklendi. Camag ikiz oluklu cam haznesi, bitki ekstratlarının yürütülmesi (20 cm x 20 cm) için kullanıldı ve kromatogramlar, mobil faz buharına 20-30 dakika maruz bırakıldı. Bitki ekstratları uygun mobil faz kullanılarak plakaya yüklendikleri noktadan itibaren 7 cm yütüldü ve kromatografik koşullar, bitkilerin etanol ekstratları için optimize edildi. Bu çalışmada dört farklı mobil faz kullanıldı. mobil faz 1, kloroform: heksan: metanol: formik asit (50: 50: 10: 1 v/v); mobil faz 2, etil asetat: toluen: formik asit (70:30:10 v/v); mobil faz 3, kloroform: heksan: metanol: su: etilasetat (25: 25: 15: 3,5: 45 v/v); ve mobil faz 4 (DPPH analizi), kloroform: etil asetat: aseton: formik asit (40: 30: 20: 10 v/v) olarak hazırlandı. Uygun mobil faz kullanılarak geliştirilen plakalar oda sıcaklığında 5 gün kurutuldu. Kimyasal türevlendirme, anisaldehit-asetik asit-konsantre sülfürik asit-metanolden (5-100-50-850 mL) oluşan anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile gerçekleştirildi. Reaktif, 500 mL'lik bir behere alındı, kurutulmuş plakalar behere 3 saniye boyunca manuel olarak daldırıldı ve 110 °C'de 5 dakika boyunca bir etüvde türevlendirildi.

2.3.2. LC-MS

Bitki ekstratlarında bulunan fenolik asitlerin belirlenmesi için yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi ve kütle spektrofotometre kullanılmıştır. Bu amaçla timol, vanilik asit, gallik asit, kafeik asit ve kojik asitin 10 ppm'lik standart karışımları oluşturulup bitki ekstratlarında tarama yapıldı.

LC-MS analizi, Agilent 1200 serisi HPLC ile birleştirilmiş Agilent 6460 üçlü kuadrupol sistemi (ESI + Agilent jet akışı) ile yapıldı. Sıvı kromatografi çalışmaları için; kromatografik ayırma, 2.1x50 mm, 1.8 mm parçacık boyutlu Zorbax SB-C18 kolonu kullanılarak yapıldı (kolon sıcaklığı 35°C; çalışma süresi 13 dakika; gradyan akış modu). Mobil faz, % 0.05 formik asit + 5 mM amonyum format (solvent A) ve metanol'den (solvent B) oluşmaktadır. Akış hızı 0.3 mL dk⁻¹ ve enjeksiyon hacmi 5 mL olarak ayarlandı. Standart eğri aralığı 0.025–0.05–0.1–0.2–0.5–1–2–5–10 ppm olarak tarandı.

Kütle spektrometrik analiz; Agilent BinPump-SL (G1312B9), Agilent h-ALS-SL + (G1367D) otomatik örnekleyici, Agilent G1316B 1200 serisi Thermost ile bir ESI +

Agilent jet akışı iyonizasyon kaynağı kullanılarak gerçekleştirildi. SL sütun bölmesi, G1379B mikro degazör, MRM tarama modu ve aşağıdaki çalışma parametreleri; 350 C gaz sıcaklığı, 10 mL/dak gaz akışı, 45 psi nebulizatör, 4000V kılcal, kullanılarak analizler yapıldı. Veri analizi için Agilent G3793AA masshunter optimizer yazılımı kullanıldı. LC-MS analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.4. Antimikrobiyal Aktivite

2.4.1. Mikroorganizmalar ve ortam

Escherichia coli (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus*'un (ATCC 25923) mikrobiyal kültürleri, ATCC (American Type culture Collection)' den tedarik edildi. Bakteriyel süspansiyonlar daha önce Grzelak (2013) tarafından optimize edilen prosedüre göre hazırlandı. Bakteriyel koloni stok kültüründen alındı, 10 mL M-H (Mueller Hinton) sıvı besi yerine konuldu ve 37°C 'de 20 saat inkübe edildi. Ön inkübasyondan elde edilen bakteri süspansiyonu, 1: 200 oranında M-H sıvı besi yeri ile seyreltildi. Daha sonra 20 mL M-H sıvı besi yerine 5 mL seyreltilmiş süspansiyon ilave edildi ve manyetik karıştırıcı da 5 saat 37°C 'de karıştırıldı. 20 mL'lik bir M-H sıvı besi yeri (pH 7.2 ± 0.2), ön inkübasyondan elde edilen 1 mL bakteri süspansiyonu ile karıştırıldı ve 7 saat 37°C 'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

2.5. Bitki ekstratlarının antimikrobiyal analizleri

2.5.1. TLC Biyootografi

10 mg/mL stok ekstrat çözeltilerinden 5 µL TLC tabakalarına yüklenerek '2.3.1' de anlatıldığı gibi uygun mobil faz kullanılarak türevlendirildi. TLC plakalar oda sıcaklığında 5 gün kurutuldu. Bakteriyel süspansiyonlar daha önce tarif edilen prosedüre göre hazırlandı (2.4.1). TLC plakaları, hazırlanan bakteriyel süspansiyona 8 saat boyunca daldırıldı ve nem kabininde bir gece 37°C 'de inkübe edildi. Daha sonra kromatogramlara, bir EMD Millipore TLC püskürtücü kullanılarak %0.2 MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) sulu çözeltisi püskürtüldü, 37°C 'de 0.5 ile 3 saat süreyle yeniden inkübe edildi ve biyootogramların

fotoğrafları, bir KODAK pixpro astro zoom AZ421 dijital kamera ile alındı (Jesionek ve diğ., 2017).

2.5.2. Disk difüzyon

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, disk difüzyon yöntemi kullanılarak *E. coli* ve *S. aureus* türlerine karşı araştırıldı (Saki ve diğ., 2018). Bakteriyel kültürler, gece boyunca 37°C 'de Mueller-Hinton (M-H) sıvı besi yeri ortamında inkübe edildi. 5 mL saf su içeren steril tüplere inkübe edilmiş mikroorganizmalar ilave edildi ve spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland standardına (1.5×10^8 CFU / mL bakteri) ayarlandı. Steril swab kullanılarak tüplerden alınan kültürler, Mueller Hinton agar (Katı besi yeri) içeren petri kabı üzerine ekildi. Bitki ekstratları, seri seyreltmelerle 50 mg/mL nihai konsantrasyona ayarlandı. İki disk ayrı ayrı 20 µL ve 10 µL hazırlanan çözeltilerle emdirildi ve ekim yapılmış katı besi yeri üzerine yerleştirildi. Boş diskler, negatif kontrol olarak etanol (her bir boş disk için 20 µL) ile emprenye edildi, seftriakson (30 µg / disk) pozitif referans standartları olarak kullanıldı. Son olarak, ekim yapılan petri kapları 37°C 'de 24 saat boyunca inkübe edildi ve antimikrobiyal aktiviteler test organizmalarına karşı oluşan inhibisyon bölgesinin çapları ölçülerek değerlendirildi.

2.5.3. Well difüzyon

Agar well difüzyon yöntemi, bitki etanol ekstraktlarının test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kullanıldı (Prakash ve diğ., 2016). İlk olarak, test edilen bakteriler gece boyunca 37°C 'de M-H sıvı besi yerinde inkübe edildi. Daha sonra, bakterilerin optik yoğunlukları 600 nm'de UV spektrofotometre kullanılarak 0.5 McFarland standardına (1.5×10^8 CFU/mL) ayarlandı. Her bir petri kabına 30 mL Mueller-Hinton agar döküldü, katılaştıktan sonra steril cork-borrer yardımı ile 6 mm çaplı kuyucuklar açıldı. Test bakteri suşları agarın yüzeyine yayıldı ve açılan kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda bitki ekstratları yüklendi. Petri kapları 24 saat 37°C 'de inkübe edildi ve inhibisyon bölgeleri milimetre (mm) cinsinden ölçüldü.

2.6. Bitki Ekstratı-biyopolimer Karışımlarının Hazırlanması

Biyopolimer-ekstrat karışımlarının hazırlanmasında hidroksi propil metil selüloz (HPMC), karboksi metil selüloz (CMC), arabik gam (AG) ve cellan gam (GG) kullanıldı. 3gr biyopolimer, 100 mL deiyonize suda çözüldü ve her bir karışım 45°C 'de 3 saat karıştırılıp tamamen çözülerek biyopolimer jelleri elde edildi. Daha sonra 10 mg/mL konsantrasyondaki bitki ekstratları ile biyopolimer çözeltileri hacimce 50/50 olacak şekilde hazırlandı. 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra her bir polimer-ekstrat karışımı santrifüjde 1000x10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hiçbir karışımda faz ayrışması olmadığından emin olundu ve elde edilen karışımlar deneyler yapılana kadar buzdolabında saklandı (Ghafoor ve diğ., 2016).

2.7. Ekstrat-biyopolimer Karışımlarının Antimikrobiyal Analizleri

2.7.1. Well difüzyon

Bölüm 2.6'da anlatıldığı gibi hazırlanan ekstrat-biyopolimer karışımlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde well difüzyon yöntemi kullanıldı (Prakash ve diğ., 2016). Test mikroorganizmaları gece boyunca 37°C 'de M-H sıvı besi yerinde inkübe edildi. Daha sonra, bakterilerin optik yoğunlukları 600 nm'de UV spektrofotometre kullanılarak 0.5 McFarland standardına (1.5×10^8 CFU / mL) ayarlandı. Her bir petri kabına 30 mL Mueller-Hinton agar döküldü, katılaştıktan sonra steril cork-borrer yardımı ile 6 mm çaplı kuyucuklar açıldı. Kuyucuklara 20 µL biyopolimer ve biyopolimer-ekstrat karışımları yüklenerek katı besi yerleri 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Test mikroorganizmalarına karşı oluşan inhibisyon alanlarının çapları ölçülerek hesaplamalar yapıldı.

2.8. Sütürler

2.8.1. Cerrahi sütürler

Çalışma kapsamında bitki ekstratı-biyopolimer karışımı ile kaplanarak antibakteriyel aktiviteleri belirlenen sütürlerin yapısal özellikleri Tablo 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan sütürler ve yapısal özellikleri

Üretici	Marka ismi		Yapı		Kodu
ETHİCON	Coated Vicryl	Polyglactin 910	Multi filament	Absorbable	W9230
	Prolene	Polypropylene	Monofilament	Non-absorbable	W8522
	Permahand	Silk	Multiflament	Non-absorbable	7733G
	PDS II	Polyester	Monofilament	Absorbable	Z370T
	Coated Vicryl Plus antibacterial	Polyglactin 910	Multiflament	Absorbable	VCP332

2.8.2. Sütürlerin kaplanması

Bölün 2.6’da hazırlanışı anlatılan bitki ekstratı-biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması için daldırma kaplama yöntemi kullanıldı. Daldırma kaplama çözeltisi, 40 mL dimetilsülfoksit’e (DMSO) 20 gr biyopolimer-ekstrat karışımları eklenerek hazırlanmıştır. Sütürler 3’er cm uzunluğunda kesilerek UV lamba altında sterilize edildi ve daha sonra kaplama çözeltisine 1 saat daldırılıp, ardından 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurutuldu. Sütürlerin kaplandığından emin olmak için, kaplamadan önce ve sonra ipliklerin ağırlıkları ölçülerek kayıt altına alındı.

2.8.3. Antimikrobiyal aktivite

Ekstrat-biyopolimer karışımı kaplı sütürlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde agar difüzyon yöntemi kullanıldı (Obermeier ve diğ., 2015). Bakteriyel kültürler, gece boyunca 37°C 'de Mueller-Hinton (M-H) sıvı besi yeri ortamında inkübe edildi. 5 mL saf su içeren steril tüplere inkübe edilmiş mikroorganizmalar ilave edildi ve spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland standardına (1.5×10^8 CFU / mL bakteri) ayarlandı. Steril swab kullanılarak tüplerden alınan kültürler, Mueller Hinton agar (Katı besi yeri) içeren petri kabı üzerine ekildi. Daha sonra kaplamalı sütürler agar ortamına yerleştirildi. Triclosan kaplı Coated Vicryl Plus antibacterial sütür pozitif kontrol olarak kullanıldı. Petriler 37°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra sütürlerin etrafında oluşan inhibisyon alanlarının çapları ölçülerek antimikrobiyal aktiviteler hesaplandı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bitki Ekstratlarının Fitokimyasal Analizi

Bitki ekstratlarının fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi çalışmanın ilk aşamasını oluşturdu. Bu amaçla; Anadolu’da endemik türler olan Isparta gülü-*Rosa damascena* Mill. (Rm), Altın otu-*Helichrysum arenarium* (Ha) ve Bilye kekik-*Thymus vulgaris* (Tv) bitkilerinin ekstratları elde edilerek fitokimyasal analizleri yapıldı. Bitki etanol ekstratlarının analizlerinde TLC ve LC-MS yöntemleri kullanıldı.

İlk olarak, bitki ekstratlarında bulunan fenolik asitlerin varlığını tespit etmek için TLC yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde ticari olarak elde edilen fenolik asitlerin çözeltileri hazırlanarak bitki ekstratları ile birlikte uygun mobil faz kullanılarak yürütüldü ve oluşan bantların Rf değerleri hesaplandı. TLC yöntemi ile varlığı belirlenen fenolik asitlerin miktarsal analizlerinin yapılabilmesi içinde bitki ekstratları LC-MS analizine tabi tutuldu.

3.1.1. İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, yaygın olarak kullanılan tüm kromatografik yöntemlerin en basitidir. Uygun mobil faz ve kaplanmış bir plaka içeren uygun bir kapalı kap, bileşiklerin ayrılması ve kalitatif ve yarı kantitatif analizlerin gerçekleştirilmesi için yeterlidir. TLC uygulamaları, özellikle yapısında birçok bileşiği bir arada bulunduran bitki ekstratlarına yaygın olarak uygulanmaktadır.

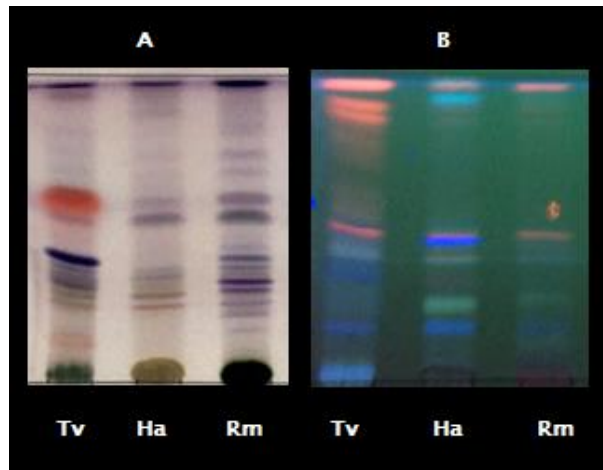
Bitkilerden elde edilen ekstratların TLC plakalara uygulanmasında en verimli sonuca ulaşabilmek için doğru mobil fazın belirlenmesi oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bitki ekstratlarının yapısında bulunan bileşiklerin farklı polaritelere sahip olması, kullanılacak mobil fazın polaritesi ile ayrılma performansına direkt etki etmektedir. Üç farklı bitkiden elde edilen ekstratların her biri için ayrı ayrı mobil faz çalışmaları gerçekleştirilerek her üç bitki ekstratı için de en uygun mobil faz belirlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Mobil faz belirleme çalışmaları (x: Ayırışma hiç olmadı, √: Ayırışma oldu)

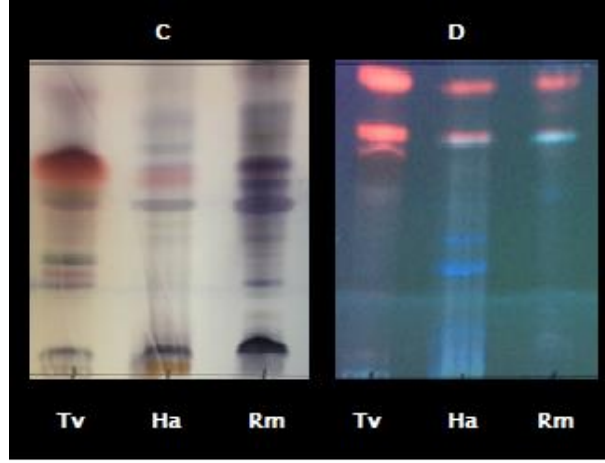
Mobil Faz	Bilye kekik	Altın otu	Gül
Hekzan	x	x	x
Etanol	x	x	x
Etil Asetat	x	x	x
Kloroform	x	x	x
Su	x	x	x
Toluen	x	x	x
Metanol	x	x	x
Aseton	x	x	x
Mobil faz 1	√	√	√
Mobil faz 2	√	√	√
Mobil faz 3	√	√	√

Mobil faz 1: Kloroform: Hekzan: Metanol: Formik asit (50:50:10:1 (v/v)); Mobil faz 2: Etil asetat: Toluen: Formik asit (70:30:10 (v/v)); Mobil faz 3: Kloroform: Hekzan: Metanol: Su: Etil asetat (25:25:15:3.5:45 (v/v)))

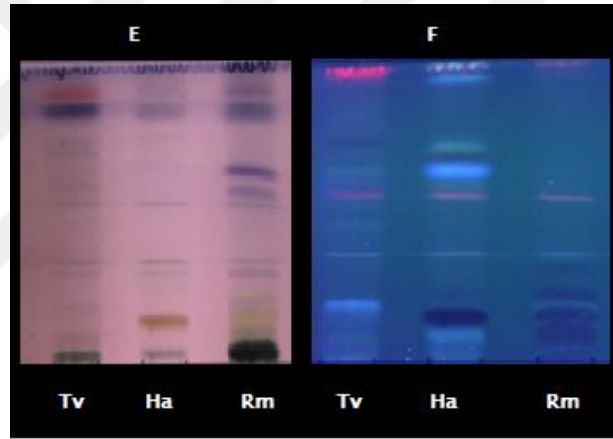
Yapılan denemelerde solventlerin tek başına kullanımlarının bitki ekstratlarının ayırışmaları üzerinde olumlu bir etkileri görülmedi. Farklı solventlerin karıştırılması ile elde edilen karışımlarda ise bitki ekstratlarının bileşenlerine ayırışması gözlemlendi. Her üç bitki ekstratı için de en uygun taşıyıcı faz mobil faz 1 olarak belirlendi. Bitki ekstratlarının farklı mobil fazlarda plakalardaki ayırışmaları Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3 de verilmiştir.



Şekil 3.1. Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 1) A, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; B, UV366 lamba altında görüntüleme



Şekil 3.2. Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 2) C, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; D, UV366 lamba altında görüntüleme



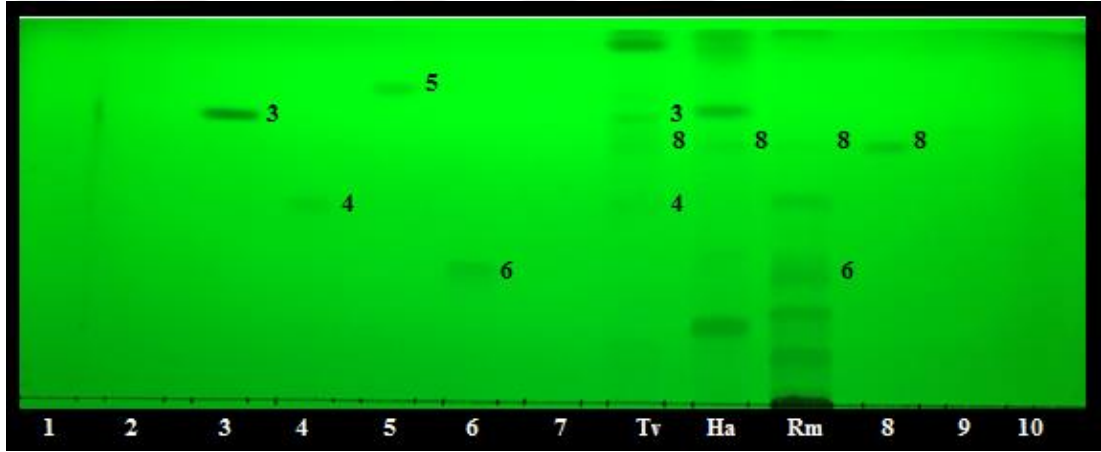
Şekil 3.3. Bitki ekstratlarının TLC kromatogramları (mobil faz 3) E, anizaldehit ajanı ile görüntüleme; F, UV366 lamba altında görüntüleme

TLC kromatografisi kullanılarak yapılan fitokimyasal tarama, farklı bitki ekstratlarında farklı kimyasal bileşenlerin varlığını desteklemektedir. Bu durum, kullanılan görüntüleme ajanının sprey reaktifi ile reaksiyonları nedeniyle farklı renklerde bantlar vermeleriyle açıklanabilmektedir. Örneğin terpenler, görüntüleme ajanı olarak vanilin/sülfürik asit reaktifi kullanıldığında kromatogramlarında kırmızı veya mavi renk verirler (Gibbons and Gray, 1998).

Jesionek ve ark. (2015), bitki ekstratlarındaki polifenollerin analizinde kullanılan en yaygın mobil fazı etil asetat; asetik asit; formik asit; su (100: 11: 11: 26 v/v) olarak

belirlemişlerdir. Fenolik asitler polaritesi yüksek olan mobil fazlarda daha iyi ayrılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan her üç faz da polaritesi yüksek fazlardan oluşmaktadır.

Bitki ekstratlarının fitokimyasal analiz taramalarında, ekstratların yapısında bulunan fenolik asit ve polifenollerin tespiti; timol, 4 metilkatekol, vanilik asit, gallik asit, sinamik asit, kojik asit, naringin, kafeik asit, kuersetin ve pirokatekol gibi fenolik asitleri içeren on standart bileşik kullanılarak gerçekleştirildi. Standart fenolik malzemeler ile bitki ekstratları, kloroform: etil asetat: aseton: formik asit (40:30:20:10 v/v) mobil faz kullanılarak türevlendirildi ve alıkonma süreleri (retention time) belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bitki ekstratlarında bulunan standart fenolik bileşiklerin TLC yöntemi ile UV 254 nm altındaki kromatogram görüntüsü. Mobil faz: kloroform: etil asetat: aseton: formik asit (40:30:20:10 v/v). Rm:Rosa damascena Mill., Ha:Helichrysum arenarium, Tv:Thymus vulgaris. 1:timol, 2:4-metilkatekol, 3:vanilik asit, 4:gallik asit, 5:sinamik asit, 6:kojik asit, 7:naringin, 8:kafeik asit, 9:quercetin, 10:pirokatekol

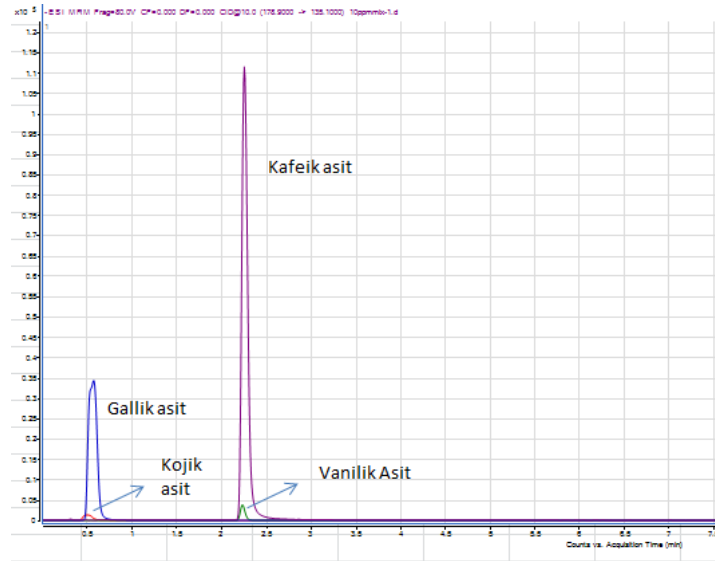
Her üç bitki ekstratında da kafeik asit ($R_f = 0.68$) tespit edildi ve bu sonuçlar Jesionek ve ark. (2015) 'nın çalışmasıyla benzerlik gösterdi. Bu çalışmada beş farklı bitki türünde (*Hypericum perforatum* L., *Matricaria recutita* L., *Achillea millefolium* L., *Thymus vulgaris* L., ve *Salvia officinalis* L.) yapılan çalışmalarda on farklı fenolik bileşik ince tabaka kromatografisi kullanılarak tespit edilmiştir. Görüntüleme ajanı olarak polietilen glikol reaktif kullanıldı ve kafeik asit ($R_f = 0.68$) bütün ekstratlarda tespit edildi.

Çalışmamızda; vanilik asit ($R_f = 0.75$) ve gallik asit ($R_f = 0.51$) Tv ekstratında tespit edilirken, kojik asit ($R_f = 0.36$) Rm ekstratında tespit edildi. Doğal ekstratların analizlerinde TLC yönteminin yanı sıra başka yöntemlerde kullanılmaktadır. Önemli bir tıbbi bitki olan *Oxalis corniculata* 'nın fenolik asit profili, yüksek çözünürlüklü ince tabaka kromatografisi kullanarak tespit edildi. Bitkinin etanolik ekstratlarında kafeik asit, vanilik asit ve siringik asit tespit edildi (Gupta ve diğ., 2018).

3.1.2. LC-MS analizi

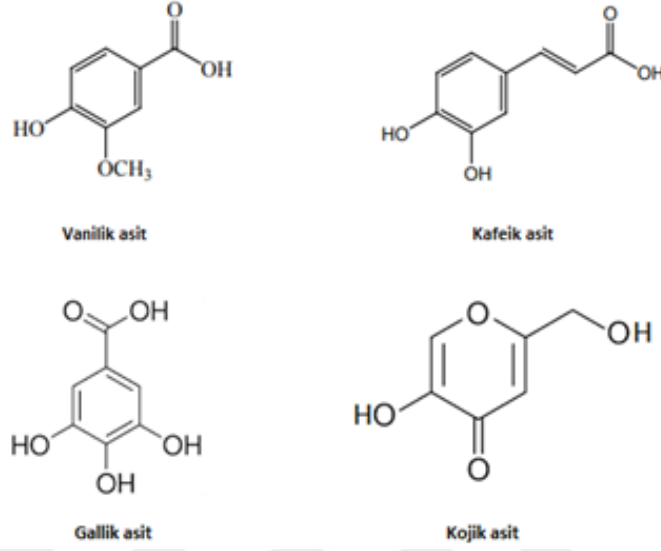
Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS), sıvı kromatografisinin (HPLC) fiziksel ayırma yeteneklerini kütle spektrometrisinin (MS) kütle analiz kabiliyetleriyle birleştiren analitik bir kimya tekniğidir. Sıvı kromatografisi, karışımları çoklu bileşenlerle ayırırken, kütle spektrometrisi, yüksek moleküler özgüllük ve algılama duyarlılığı ile bileşenlerin yapısal kimliğinin saptanmasını sağlar. Bu yöntem doğal ekstratların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tez kapsamında fitokimyasal bileşimleri incelenen Rm, Tv ve Ha ekstratlarının TLC yöntemi kullanılarak tespit edilen fenolik bileşikleri LC-MS yöntemi ile de teyit edilerek fenolik asitlerin varlığı kanıtlanmıştır. Bu amaçla; TLC çalışmalarında tespit edilen kafeik asit, vanilik asit, kojik asit ve gallik asitin 10 ppm lik standart çözeltileri hazırlanarak standart garfikleri elde edilmiştir (Şekil 3.5).



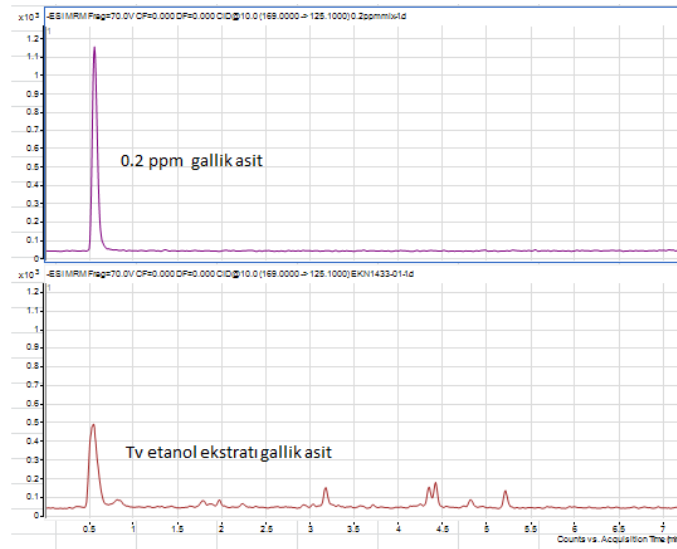
Şekil 3.5. Gallik asit, kojik asit, kafeik asit ve vanilik asitin 10 ppm lik standart LC-MS grafiği

Taranan standart fenolik asitlerin alıkonma süreleri (dak.); kojik asit-0.494, Gallik asit-0.550, vanilik asit-2.203 ve kafeik asit-2.223 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen fenolik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 3.6 'da verilmiştir.

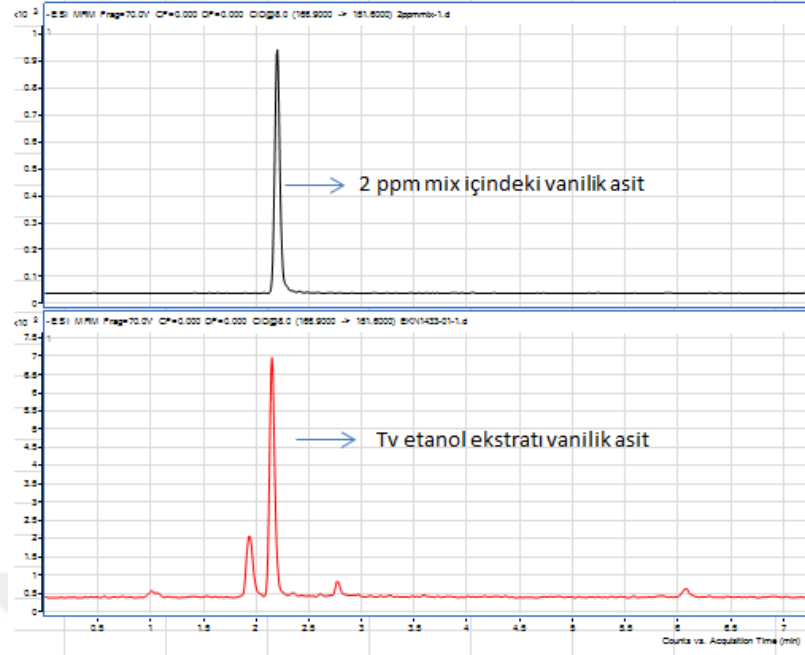


Şekil 3.6. LC-MS yöntemi ile ekstratlarda tespit edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.

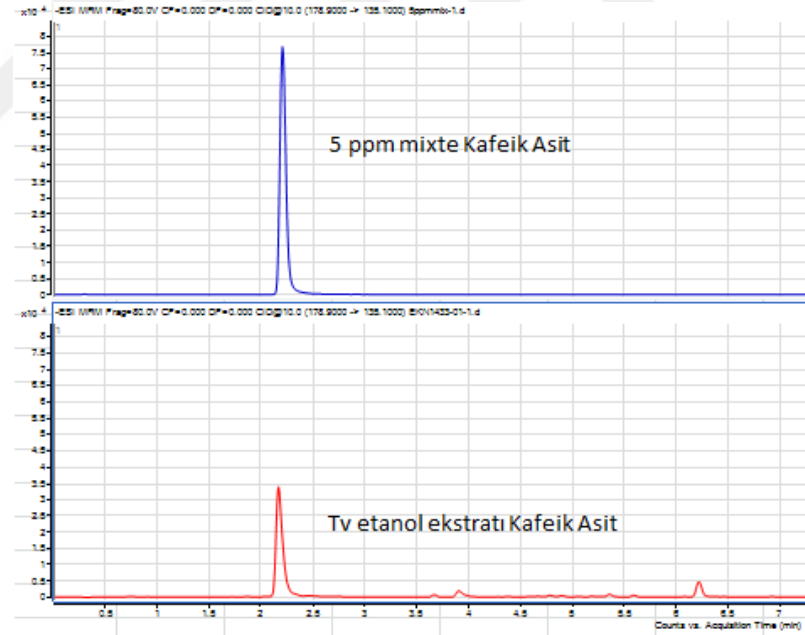
Thymus vulgaris (Bilye kekik-Tv) etanol ekstratında yapılan analizlerde gallik asit (Şekil 3.7), vanilik asit (Şekil 3.8), kafeik asit (Şekil 3.9) ve timol (Şekil 3.10) tespit edilmiştir.



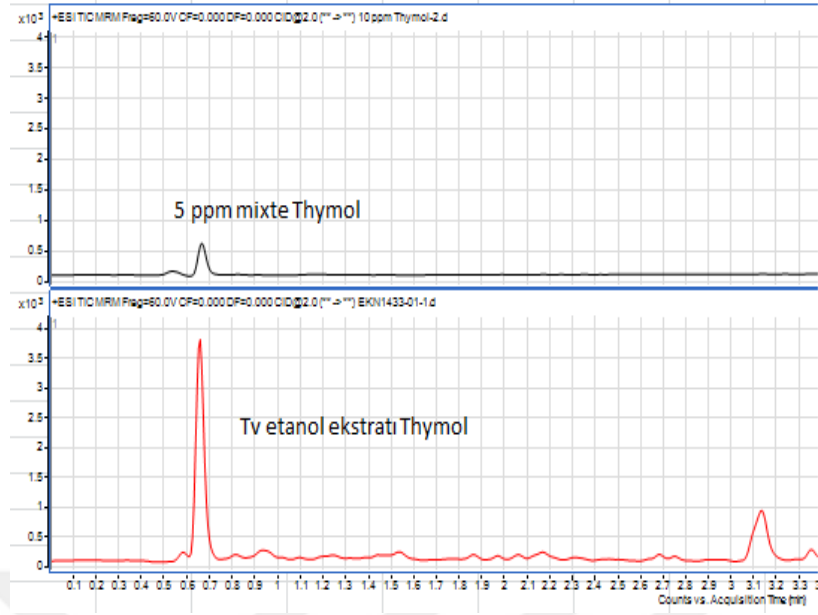
Şekil 3.7. Tv (Bilye kekik), gallik asit 0,2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.



Şekil 3.8. Tv (Bilye kekik), vanilik asit 0,2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği

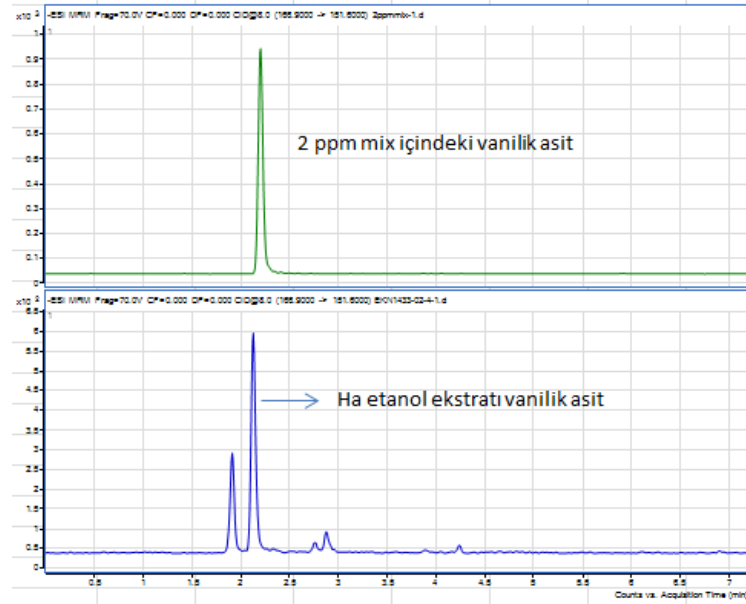


Şekil 3.9. Tv (Bilye kekik), kafeik asit 0,5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.

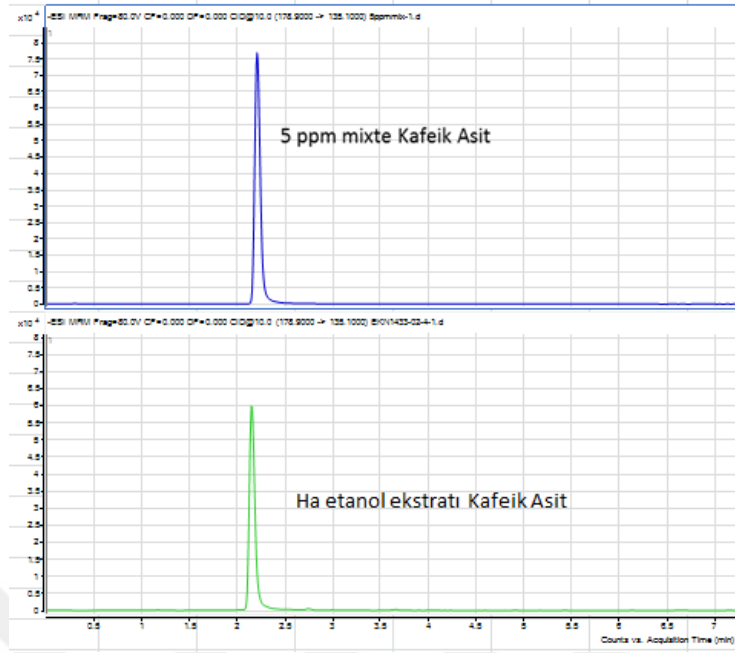


Şekil 3.10. Tv (Bilye kekik), timol 0,5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.

Helichrysum arenarium (Altın otu-Ha) etanol ekstratında yapılan analizlerde vanilik asit (Şekil 3.11) ve kafeik asit (Şekil 3.12) tespit edilmiştir.

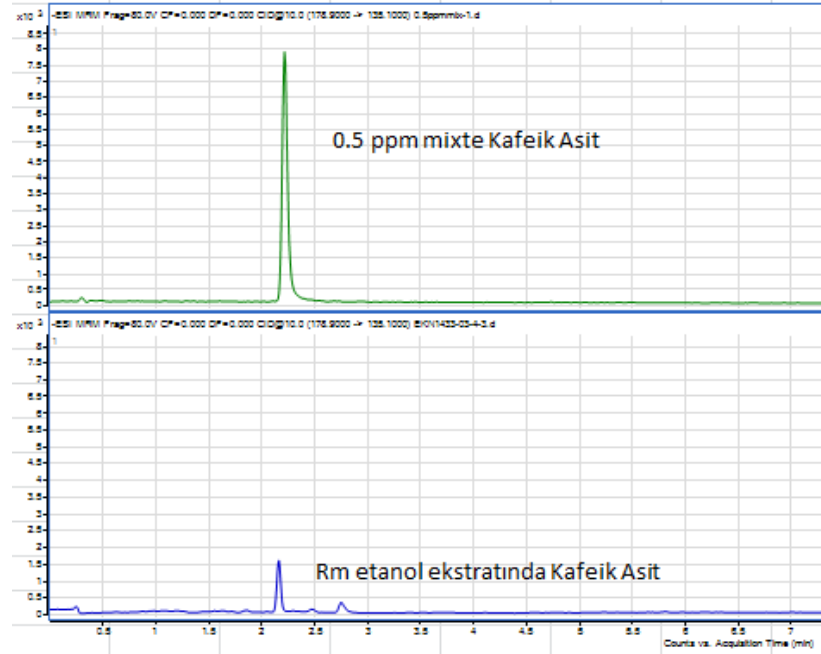


Şekil 3.11. Ha (Altın otu), vanilik asit 0,2 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği

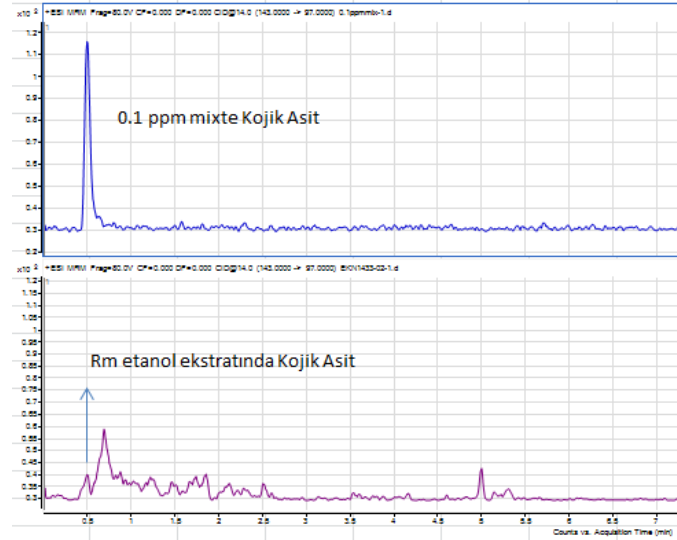


Şekil 3.12. Ha (Altın otu), kafeik asit 0,5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği.

Rosa damascena Mill. (Gül-Rm) etanol ekstratında yapılan analizlerde kafeik asit (Şekil 3.13) ve kojik asit (Şekil 3.14) tespit edilmiştir.



Şekil 3.13. Rm (Gül), kafeik asit 0,5 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği



Şekil 3.14. Rm (Gül), kojik asit 0,1 ppm standart çözelti ve etanol ekstratı LC-MS grafiği

LC-MS yöntemi ile varlığı tespit edilen fenolik asitlerin ppm cinsinden miktarsal analizleri de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Bitki ekstratlarında tespit edilen fenolik asitlerin ppm değerleri

	ppm			
	<i>Vanillic acid</i>	<i>Gallic acid</i>	<i>Caffeic acid</i>	<i>Kojic acid</i>
<i>Thymus vulgaris</i>	1.4291 ± 0.0214	0.1371 ± 0.0008	2.4549 ± 0.0242	-
<i>Helichrysum arenarium</i>	4.6297 ± 0.1195	-	16.36 ± 0.4820	< 0.1
<i>Rosa damascena Mill.</i>	-	1579.9 ± 1.2058	0.2829 ± 0.0241	< 0.1

Bitkilerden elde edilen ekstratlar; antimikrobiyal aktivite başta olmak üzere, antioksidan, antifungal ve enzim inhibiyonu gibi birçok aktivitesi açısından incelenmiştir (Hasan ve diğ., 2017; Akın ve diğ., 2013). Bu çalışmalarda genellikle ekstrat bileşenleri analiz edilmeksizin aktivite ölçümleri alınmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise araştırmacılar doğal ekstratların kimyasal bileşenlerini tespit ettikten sonra biyolojik aktivitelerini belirleme çalışmalarına yoğunluk vermektedirler.

Literatürde yer alan bazı çalışmaların sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir. *Thymus vulgaris* ekstratının kimyasal bileşiminin incelendiği bir çalışmada toplam içeriğin yaklaşık %40’ının timol olduğu tespit edilmiştir (Vinciguerra ve diğ., 2019) ve yine yapılan başka bir çalışmada *Thymus vulgaris*

esansiyel yağında GC-MS analiz yöntemi kullanılarak timol varlığı tespit edilmiştir (Scalas ve diğ., 2018). *Thymus vulgaris* esansiyel yağı ve etanol ekstratlarının kimyasal içeriğinin incelendiği başka bir çalışmada ise, esansiyel yağ bileşiminin % 50'sinin timol bileşiğinden oluştuğu ve etanol ekstratında yapılan HPLC analizinde ise gallik asidin varlığı tespit edilmiştir (Gedikoğlu ve diğ., 2019).

Helichrysum arenarium bitkisinden elde edilen metanol ve etanol ekstratları asit hidrolizine tabi tutularak fenolik bileşikler LC-MS yöntemi ile analiz edilmiş ve en yüksek fenolik bileşik içeriği kuersetin olarak ifade edilmiştir (Babota ve diğ., 2018).

Helichrysum arenarium sarı ve portakal rengi çiçeklerinin esansiyel yağ içerikleri incelendiğinde ise, içeriğinde 80'den fazla bileşiğin olduğu ve bu bileşenlerin arasında da β -caryophyllene baskın olan bileşik olarak belirlenmiştir (Judzentiene ve Butkiene, 2006).

Rosa damascena Mill ve *R. Alba hydrosol* türleri üzerine yapılan bir çalışmada bitkilerden elde edilen esansiyel yağlarda fitokimyasal bileşenler analiz edilmiş ve en yüksek oranda β -citronellol (%28) bileşiği tespit edilmiştir (Georgieva ve diğ., 2019). Isparta Güneykent bölgesinde yetişen güller üzerinde yapılan bir çalışmada ise polar kimyasal bileşen analizlerinde 2-methyl-4-keto-pentan-2-ol (%25.99) en yüksek miktarda bulunmuştur (Özcana ve Dönmez, 2018).

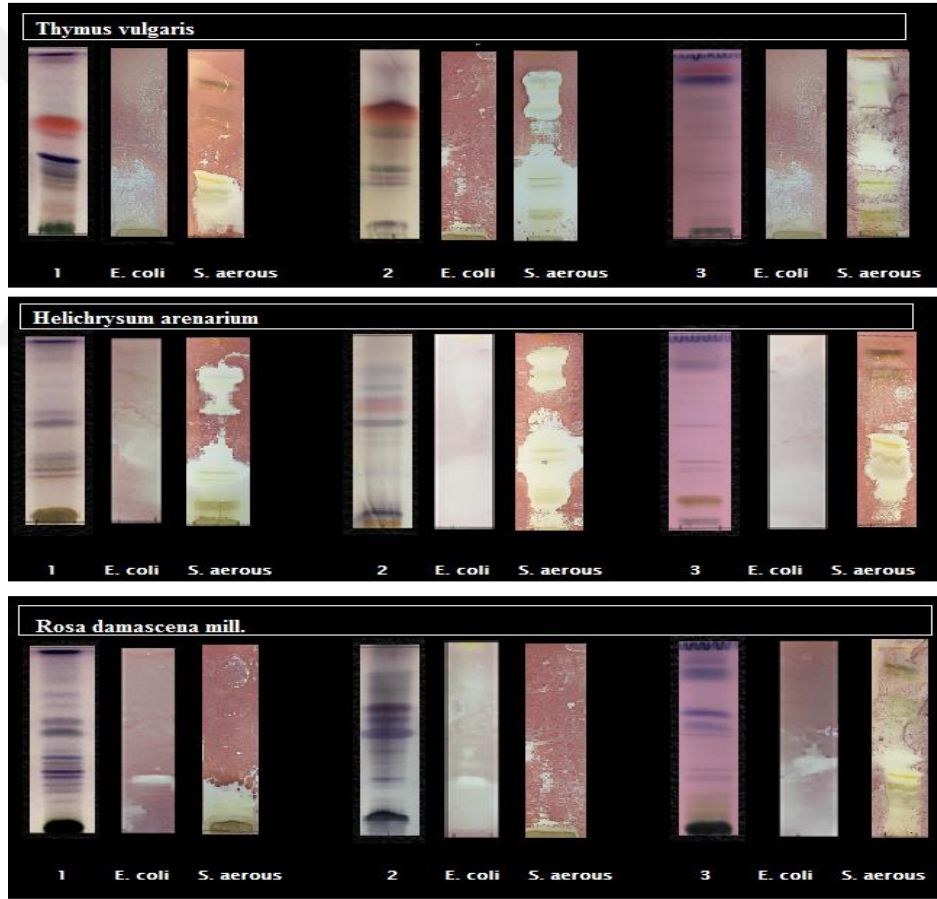
3.2. Antimikrobiyal Aktivite

Tez kapsamında ilk aşamada fitokimyasal profilleri araştırılan bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri TLC-Biyootografi, disk difüzyon ve well difüzyon yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir. Daha sonra, bu bitki ekstratları biyopolimerler ile karıştırılarak hem TLC-biyootografi hem de well difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Son aşamada ise, hazırlanan biyopolimer-ekstrat karışımları farklı özelliklerdeki sütürlere kaplanarak agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.1. Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitesi

3.2.1.1. TLC-Biyootografi

Bir düzlemsel tabaka kromatografi tekniğinin (TLC) bir biyo-tahlil ile kombinasyonu olan TLC-DB (TLC-Biyootografi), *Rosa damascena* Mill., *Helichrysum arenarium*, ve *Thymus vulgaris* etanol ve heksan ekstratlarının, *E. coli* ve *S. aureus*'e karşı antibakteriyel aktivite sergileyen fraksiyonlarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Bu amaçla, bitki ekstratlarının bileşiklerinin TLC ile ayrılması, mobil faz 1, 2 ve 3 kullanılarak gerçekleştirildi. Bitkilerin etanol ekstratlarının TLC-Biyootografi kromatogramları Şekil 3.15 de verilmiştir.



Şekil 3.15. TLC biyo-otografi kromatogramları; *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill etanol ekstratları. *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş üç farklı mobil faz kullanılarak TLC plakaları üzerinde ayrılmıştır. 1, 2 ve 3 sayıları mobil faz 1, 2 ve 3'ü temsil etmektedir

Thymus vulgaris etanol ekstratı her üç mobil faz kullanılarak yapılan türevlendirmelerde *E. coli* üzerinde inhibisyona sebep olan herhangi bir fraksiyon gözlemlenmedi. Gram pozitif tür olan *S. aureus* türü üzerine her üç mobil fazla yapılan türevlendirmede ise farklı fraksiyonlarda inhibisyon etkisi gözlemlendi.

Helichrysum arenarium etanol ekstratları için de aynı sonuçlar elde edildi. Gram negatif bir tür olan *E. coli* üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermezken, gram pozitif bir tür olan *S. aureus* üzerine her üç mobil fazla yapılan türevlendirmelerde antimikrobiyal aktivite görüldü.

Rosa damascena Mill etanol ekstratlarının mobil faz 1 kullanılarak yapılan türevlendirmede hem *E. coli* hem de *S. aureus* türleri üzerine inhibisyon aktivitesi tespit edildi. Mobil faz 2 ile yapılan türevlendirmede ise elde edilen fraksiyonlardan sadece *E. coli* üzerinde antimikrobiyal aktivite görüldü.

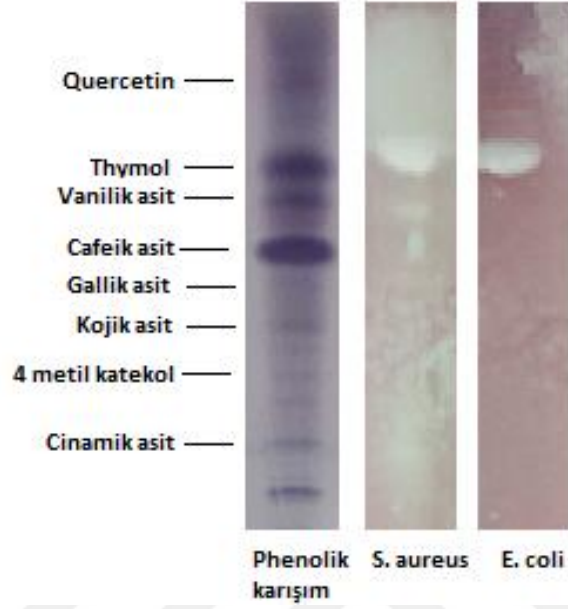
Mobil faz 3 ile yapılan türevlendirmede ise her iki tür için de fraksiyonlar antimikrobiyal aktivite gösterdi. Yapılan çalışmada TLC plakalarda farklı mobil fazlarda türevlendirilerek inhibisyon aktivitesi gösteren fraksiyonların alıkonma zamanları Tablo 3.3 de verilmiştir.

Tablo 3.3. Antimikrobiyal aktivite gösteren fraksiyonların alıkonma değerleri

		Mobil faz 1	Mobil faz 2	Mobil faz 3
<i>Thymus Vulgaris</i> Bilye kekik	<i>E.coli</i>	TE	TE	TE
	<i>S. aureus</i>	0.035 - 0.3	0 - 0.481 0.614 - 0.843	0.324 - 0.505 0.614 - 0.983
<i>Helichrysum arenarium</i> Altın Otu	<i>E.coli</i>	TE	TE	TE
	<i>S. aureus</i>	0 - 0.277 0.565 - 0.843	0.107 - 0.59 0.686 - 0.903	0.107 - 0.445
<i>Rosa damascena</i> Mill Gül	<i>E.coli</i>	0.241	0.241	0.33
	<i>S. aureus</i>	0 - 0.237	TE	0.33

Bitkilerin fitokimyasal analizleri yapılırken hem TLC hem de LC-MS teknikleri kullanılarak fenolik asit tayini yapılmış ve bu fenolik asitlerin bir kısmı bitkilerin yapılarında tespit edilmiştir.

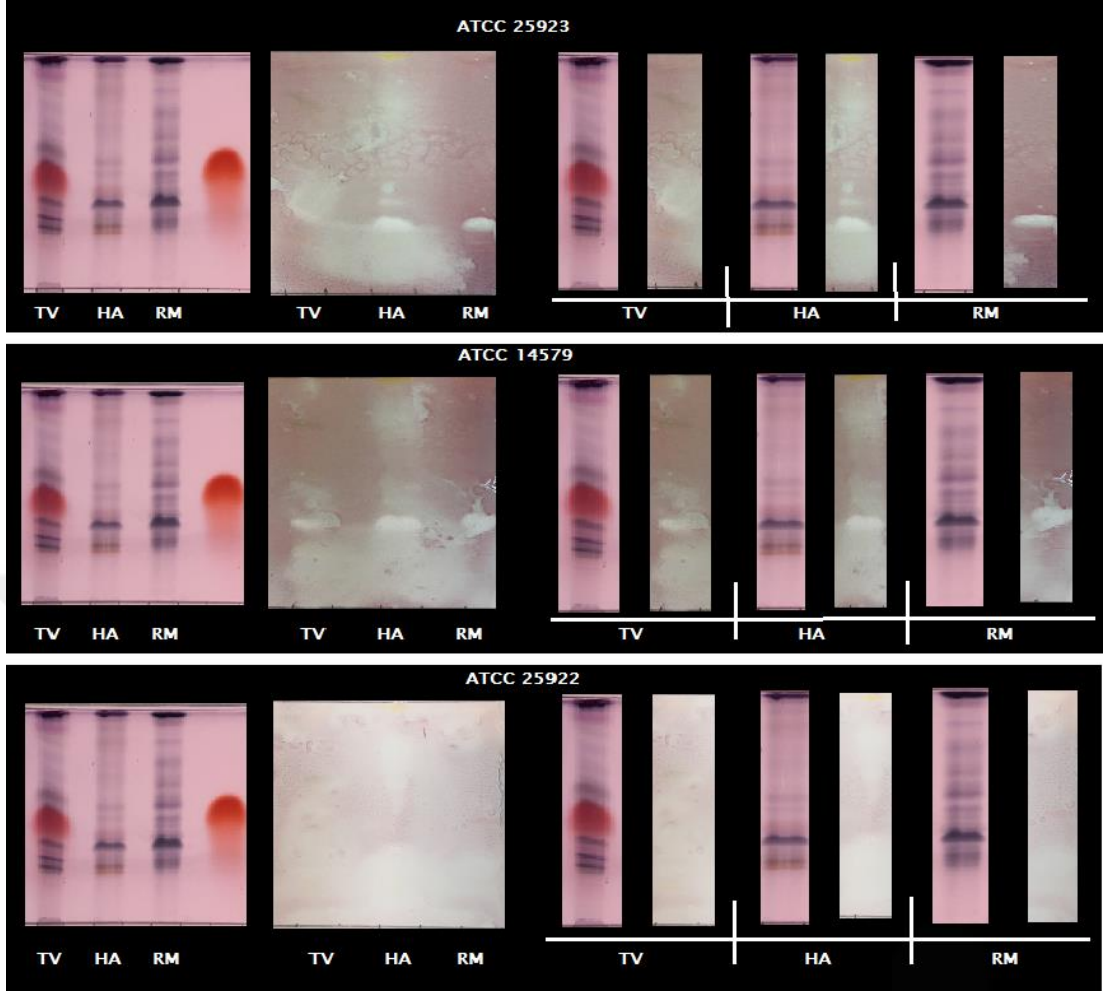
Antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilirken standart fenolik asit karışımı oluşturularak TLC-Biyootografi yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.16’da verilmiştir.



Şekil 3.16. Standart fenolik asit karışımının TLC-Biyootogram grafiği

Bu yöntem ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen standart fenolik asitlerden timol hem *S. aureus* hem de *E. coli* üzerine inhibisyon aktivitesi gösterirken, vanilik asit ve kafeik asit sadece *S. aureus* üzerine inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Bu bağlamda, yapısında bu fenolik asitleri içeren bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerine katkıları olduğu söylenebilir.

Bitki ekstratları hazırlanırken elde edilen hekzan ekstratları da TLC-Biyootografi yöntemi ile analiz edilmiştir. Burada, solvent polaritesine bağlı olarak ekstrata geçen fitokimyasalların yapılarındaki farklılıkların test sonuçlarına da yansıdığı görülmektedir (Şekil 3.17).

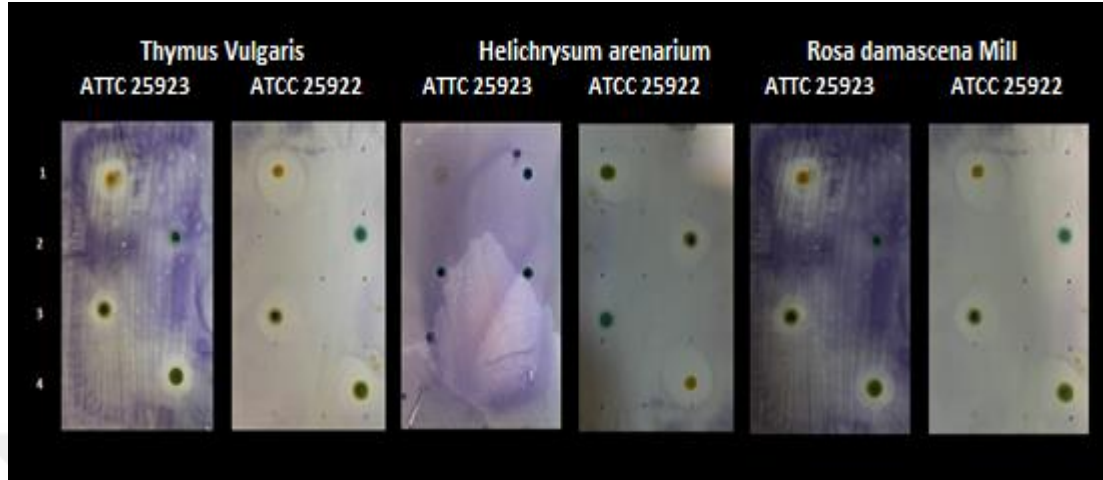


Şekil 3.17. TLC biyo-otografi kromatogramları; *Thymus vulgaris* (TV), *Helichrysum arenarium* (HA), *Rosa damascena* Mill. (RM) hekzan ekstratları. *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş TLC plakaları üzerinde ayrılmıştır. Mobil faz: hekzan: etanol (80:20 v/v)

Hekzan ekstratları ile yapılan TLC-Biyootografi çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde her üç ekstrat da ATCC 25923 üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. Gram pozitif türlere karşı inhibisyon aktivitesi gösteren ekstratlar gram negatif tür olan ATCC 25922 üzerine inhibisyon aktivitesi göstermemiştir.

Doğal ekstratların antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili ön bilgi edinme amaçlı hem hızlı hem de kolay uygulanabilen bir teknik olan TLC-Biyotografi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, doğal ekstratlar mobil faz kullanılmadan yani türevlendirme yapılmaksızın direk TLC plaka üzerine uygulanarak da anti mikrobiyal aktivite testleri yapılmaktadır (TLC–direkt (doğrudan) biyootografi yöntemi).

Çalışmamızda, bitkilerin etanol ve hekzan ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri bu yöntem kullanılarak da belirlenmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. TLC-doğrudan biyootografi kromatogramları; *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill. hekzan ve etanol ekstratları. *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bakteriyel süspansiyonları ile püskürtülmüş TLC plakaları üzerine doğrudan uygulanmıştır. 1 ve 2 hekzan ekstratı 10 ve 20 µL uygulanmış, 3 ve 4 etanol ekstratı 10 ve 20 µL uygulanmıştır

TLC-DB (İnce tabaka kromatografi-doğrudan kromatografi), *C. incanus* ekstratlarının *B. subtilis* ve *A. Fischeri* bakteriyel suşlarına karşı antibakteriyel aktivite sergileyen bileşiklerinin hedeflenmemiş taraması için uygulanmıştır.

Bu amaçla, *C. incanus* ham ekstrelerinin bileşiklerinin TLC ile ayrılması, kloroform - etil asetat - metanol (75:10:15, V / V / V) mobil fazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çalışmada *B. subtilis* türü üzerine inhibisyon aktivite tespit edilmiştir (Szeremeta ve diğ., 2018).

Diğer bir çalışmada ise *Chna natalitia*, *Khaya anthotheca*, *Loxostylis alata* ve *Commiphora harveyi* bitkilerinin hekzan, aseton, diklorometan ve metanol ekstratları 3 farklı polaritede mobil faz kullanılarak TLC-Biyootografi yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmada, bu bitkilerin *E. coli* ve *S. aureus* türlerine karşı inhibisyon aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde en iyi inhibisyon aktiviteleri kloroform/etilasetat/formik aist: (5:4:1) mobil fazı kullanılarak elde edilen fraksiyonlarda gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile, bitki ekstratlarının farklı polariteye

sahip mobil fazlar ile türevlendirilmesinin antimikrobiyal aktivite üzerine etkisi ortaya konmuştur (Suleimana ve diğ., 2010).

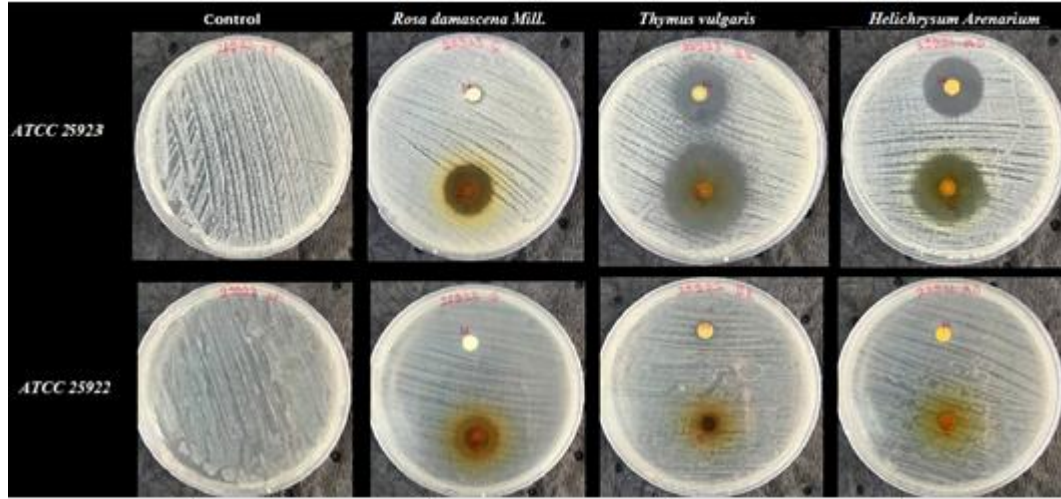
Sambucus nigra L. metanol ekstratlarının TLC-biyootografi yöntemi kullanılarak *B. subtilis* türü üzerine inhibisyon aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada anti bakteriyel aktivite gözlemlenen bantların alıkonma zamanları 0.18, 0.39 ve 0.47 olarak belirlenmiştir (Jesionek ve diğ., 2014).

Farklı bölgelerden toplanan *Thymus vulgaris L.* ve *Salvia officinalis L.* esansiyel yağlarının *B. subtilis* türü üzerine inhibisyon aktiviteleri TLC-biyootografi yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Thymus vulgaris L.* esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitesinin yapısında bulunan Timol ve Karvakrol maddeleri kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Jesionek ve diğ., 2017).

P. erecta, *P. collina*, *P. Megalantha* ve *P. crantzii* türlerinden elde edilen ekstratların *B. subtilis* türü üzerine inhibisyon aktiviteleri belirlenirken (kloroform-dietil eter-metanol-formik asit (30:10:1:0,2 v/v)), öncelikle ekstratlar TLC tabakaya direk damlatılarak daha sonrada türevlendirilerek antimikrobiyal aktiviteler belirlenmiştir. Buradan yola çıkılarak, aktivite gösteren fraksiyonlar izole edilip kütle spektroskopisi ile yapıları aydınlatılmıştır (Jozwiaka ve diğ., 2016).

3.2.1.2. Disk difüzyon

Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem de disk difüzyon yöntemidir. Bu yöntem doğal bitki ekstratlarının ve antibiyotik moleküllerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemede sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Çalışma kapsamında bitkilerden elde edilen etanol ve hekzan ekstratları boş disklere 10 µL ve 20 µL yüklenerek *S. aureus* ve *E. coli* türleri üzerine inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir (Şekil 3.19 ve 3.20).

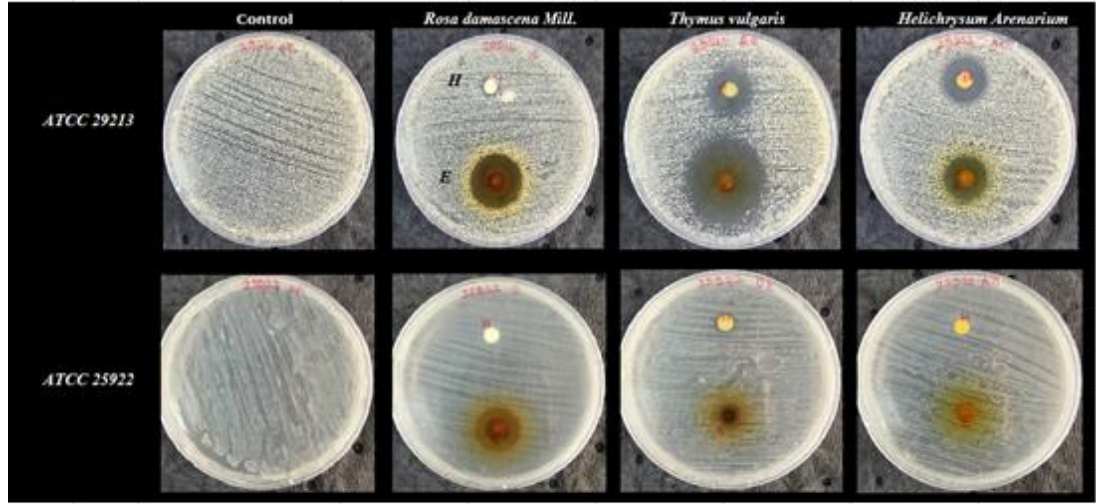


	<i>Helichrysum arenarium</i>		<i>Rosa damascena Mill.</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		Ceftriaxone 30µg
	10µL	20µL	10µL	20µL	10µL	20µL	-
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	10	0	0	23 ± 1.03
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 ± 0.03	18 ± 0.13	0	15 ± 0.02	17 ± 0.071	22 ± 0.11	20 ± 0.72

Şekil 3.19. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena Mill.* etanol ekstratlarının *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) bakterileri üzerine inhibisyon etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

Şekil 3.19 incelendiğinde; *Rosa damascena Mill.* etanol ekstratları, 10 µL yüklenen disklerde her iki tür üzerinde de inhibisyon etkisi göstermemiştir. 20 µL yükleme yapılan disklerde ise *S. aureus* bakterisine karşı 15 ± 0.02 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E.coli* bakterisine karşı ise 10 ± 1.03 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur.

Thymus vulgaris etanol ekstratı 10 µL yükleme yapılan diskte *S. aureus* türüne karşı 17 ± 0.071 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E. coli* türü üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. 20 µL yüklenen diskler ise *S. aureus* türüne karşı 22 ± 0.11 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E. coli* türü üzerinde aktivite göstermemiştir. *Helichrysum arenarium* etanol ekstratı 10 µL yükleme yapılan disklerde *S. aureus* türüne karşı 16 ± 0.03 mm inhibisyon alanı oluşturmuş ve 20 µL yüklemede ise 18 ± 0.13 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur.

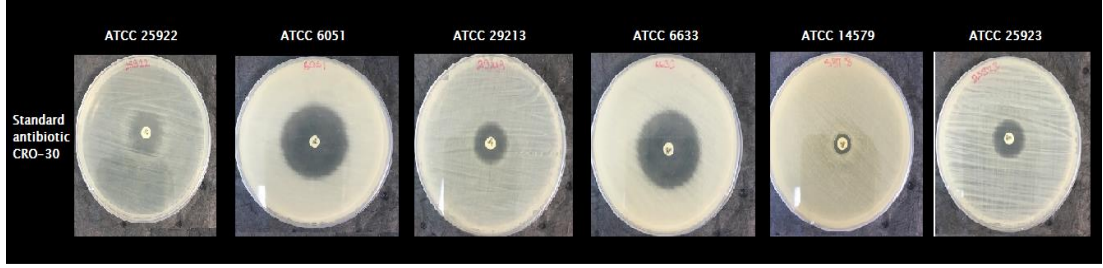


		<i>Helichrysum arenarium</i>		<i>Rosa damascena Mill</i>		<i>Thymus vulgaris</i>	
		10µL	20µL	10µL	20µL	10µL	20µL
	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	6 ± 0.02	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ± 0.07	10 ± 0.20	0	16 ± 0.23	8 ± 1.02	26 ± 0.04

Şekil 3.20. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena Mill.* hekzan ekstratlarının *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) bakterileri üzerine inhibisyon etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

Şekil 3.20 incelendiğinde, *Rosa damascena Mill.* hekzan ekstratları 10 µL yüklenen disklerde her iki tür üzerinde de inhibisyon etkisi göstermemiştir. 20 µL yükleme yapılan disklerde ise *S. aureus* bakterisine karşı 16 ± 0.23 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E.coli* bakterisine karşı ise 6 ± 0.02 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur. *Thymus vulgaris* hekzan ekstratı 10 µL yükleme yapılan diskte *S. aureus* türüne karşı 8 ± 1.02 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E. coli* türü üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermemiştir. 20 µL yüklenen diskler ise *S. aureus* türüne karşı 26 ± 0.04 mm inhibisyon alanı oluştururken, *E. coli* türü üzerinde aktivite göstermemiştir. *Helichrysum arenarium* etanol ekstratı 10 µL ve 20 µL yükleme yapılan disklerde *S. aureus* türüne karşı 10 ± 0.07 mm inhibisyon alanı oluşturmuş ve *E. coli* türü üzerine aktivite göstermemiştir.

Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri incelenirken seftriakson 30 mg'lık yüklü diskler pozitif kontrol olarak kullanılmış ve 6 farklı tür üzerinde inhibisyon değerleri belirlenerek Şekil 3.21 de verilmiştir.



Şekil 3.21. Seftriakson (30 mg) standart antibiyotik yüklü disklerin farklı türler üzerine inhibisyon değerleri. *E.coli* (ATCC 25922) 20 mm; *B. subtilis* (ATCC 6051) 38 mm; *S. aureus* (ATCC 29213) 21mm; *B. subtilis* (ATCC 6633) 38 mm; *B. cereus* (ATCC 14579) 11 mm; *S. aureus* (ATCC 25923) 20 mm

Birçok bulaşıcı hastalığın insanlık tarihi boyunca bitkisel ilaçlarla tedavi edildiği bilinmektedir. Bugün bile, bitki materyalleri, gelişmekte olan birçok ülkede tedavi edici ilaçlar olarak birinci basamak sağlık hizmetlerinde önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. Bu bağlamda yapılan bilimsel çalışmalarda her geçen gün artmaktadır.

Malezya’da, *Andrographis paniculata*, *Vitex negundo*, *Morinda citrifolia*, *Piper sarmentosum* ve *Centella asiatica* gibi bazı yaygın tıbbi bitkilerde antibakteriyel aktivitenin varlığını saptamak amacı ile bitki yaprak ekstratlarının *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* türleri üzerine inhibisyon aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *M. citrifolia*, *P. sarmentosum* ve *C. asiatica* metanol ekstratları ve *A. paniculata* (su ekstratı) hem gram pozitif *S. aureus* hem de metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) için potansiyel antibakteriyel aktivite göstermiştir (Zaidan ve diğ., 2005).

Başka bir çalışmada, *Moringa oleifera*'nın sulu ekstraktı, gıda kaynaklı beş bakteri izolatına (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı antimikrobiyal aktivite açısından disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. *M. oleifera* sulu ekstresi, test edilen tüm mikroorganizmalar karşılaştırıldığında, gram pozitif türler üzerine daha güçlü antimikrobiyal aktivite sergilerken, *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 26.2 ± 0.55 ve 24.26 ± 0.71 (mm), gram negatif bakterilere karşı ise inhibisyon etkisi 18.23 ± 0.81 ile 21.73 ± 0.55 arasında değişen sonuçlar vermiştir (Sofy ve diğ., 2017).

On farklı bitkiden elde edilen esansiyel yağların bileşimlerinin GC-FID yöntemi ile belirlendiği ve her birinin antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendiği bir diğer çalışma da da *Thymus vulgaris* L. uçucu yağının en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği tespit edildi. *Thymus vulgaris* L esansiyel yağı *Staphylococcus aureus* türüne karşı 33 ± 0.25 mm, *Escherichia coli* türüne karşı 12.66 ± 0.33 mm, *Enterococcus faecalis* türüne karşı 27.26 ± 0.60 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur (Salamon ve diğ., 2019).

Slovakya’da yapılan bir çalışmada *Tymus vulgaris* esansiyel yağının tek başına ve sefotaksim ile kombinasyonları yapılarak bakteri türleri üzerine inhibisyon aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile analiz edildi. *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* ve *Salmonella sp* türleri üzerine inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edildi (Benameur ve diğ., 2019).

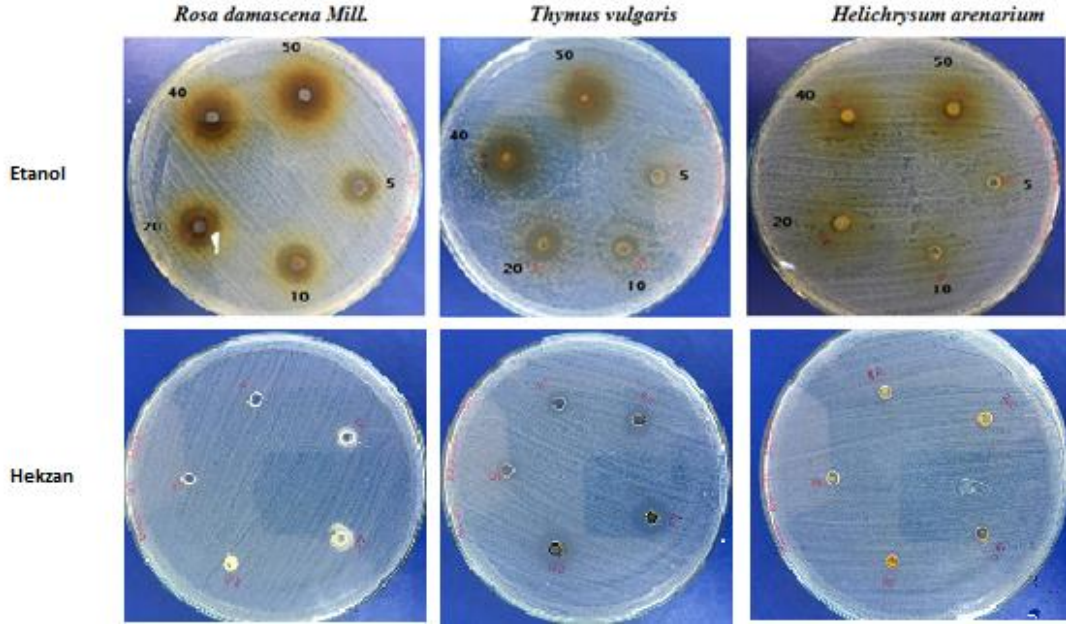
Helichrysum arenarium metanol ekstratları hazırlanıp *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* türleri üzerine inhibisyon aktiviteleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre metanol ekstratlarının minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) sırasıyla 0.62 ve 1.25 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Gradinarua ve diğ., 2014).

R. damascena yağının antimikrobiyal aktivitesi, gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve maya dahil olmak üzere çok sayıda mikroorganizmaya karşı mikrodilüsyon deneyi ile belirlenmiştir. Yağın MİK değerleri 0.125-1 µl / ml arasında tespit edildi. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*’ın, *R. damascena* yağına daha az duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Mahboubi ve diğ., 2011).

3.2.1.3. Well difüzyon

Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de well difüzyon yöntemidir. Agar difüzyon veya agar well difüzyonunun prensibi, agar disk difüzyon yöntemiyle aynıdır. Standart bir bakteri kültürü katı agar yüzeyine eşit olarak yayılır. Steril mantar delme aleti ile 6-8 mm çapında kuyucuklar açılır ve antimikrobiyal madde buraya yüklenerek aktivite ölçümü alınır.

Çalışmada, etanol ve hekzan ekstratları elde edilen bitkiler 5 – 50 mg/mL arasındaki konsantrasyonlarda well difüzyon yöntemi kullanılarak *E. coli* (Şekil 3.22) ve *S. aureus* (Şekil 3.23) türlerine karşı belirlenmiştir.



Şekil 3.22. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterisi üzerine inhibisyon etkilerinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

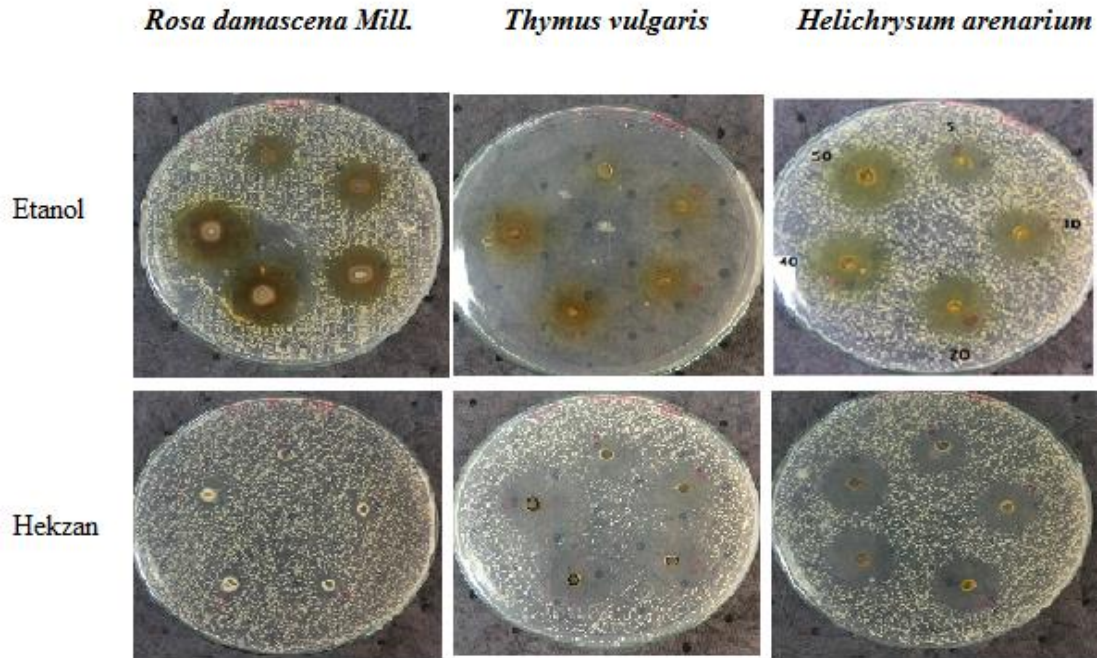
Bitkilerden elde edilen hekzan ve etanol ekstratlarının *E. coli* üzerine inhibisyon etkileri well difüzyon yöntemi kullanılarak incelendiğinde, *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratı 5 – 50 mg/mL konsantrasyonları arasında yapılan bütün denemelerde inhibisyon aktivitesi gösterdi.

Hekzan ekstratı ise hiç aktivite göstermedi. *Thymus vulgaris* etanol ekstratı 20, 40 ve 50 mg/mL konsantrasyonlarda inhibisyon aktivitesi gösterirken hekzan ekstratı 5-50 mg/mL konsantrasyonları arasında yapılan bütün denemelerde inhibisyon aktivitesi gösterdi. *Helichrysum arenarium* etanol ekstratı 50 mg/mL konsantrasyonda etkili olurken, hekzan ekstratları aktivite göstermedi. Çalışma kapsamında bitki ekstratlarının oluşturduğu inhibisyon alanları Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterisi üzerine oluşturdıkları inhibisyon alanları (mm).

mg/mL	<i>Rosa damascena</i> Mill		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Helichrysum arenarium</i>	
	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan
5	16 ± 0.02	0	11 ± 1.17	10 ± 1.09	0	0
10	18 ± 1.04	0	14 ± 1.41	11 ± 1.11	0	0
20	20 ± 0.75	0	19 ± 0.74	15 ± 0.06	0	0
40	20 ± 0.41	0	23 ± 1.58	18 ± 0.19	0	0
50	20 ± 0.19	0	25 ± 1.03	20 ± 0.39	0	0

Tablo incelendiğinde *E. coli* türüne karşı en büyük inhibisyon alanı *Thymus vulgaris* etanol ekstratının 50 mg/mL konsantrasyonundaki denemede elde edilmiştir (25 ± 1.03 mm). Sadece *Thymus vulgaris* hekzan ekstratları patojene karşı inhibisyon aktivitesi göstermiştir. *Helichrysum arenarium* bitikisinin etanol ve hekzan ekstratları gram negatif tür üzerine hiçbir aktivite göstermezken, *Rosa damascena* Mill bitikisinin etanol ekstratları patojen üzerine aktivite göstermiştir.



Şekil 3.23. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda *S. aureus* (ATCC 25923) bakterisi üzerine inhibisyon etkilerinin well difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

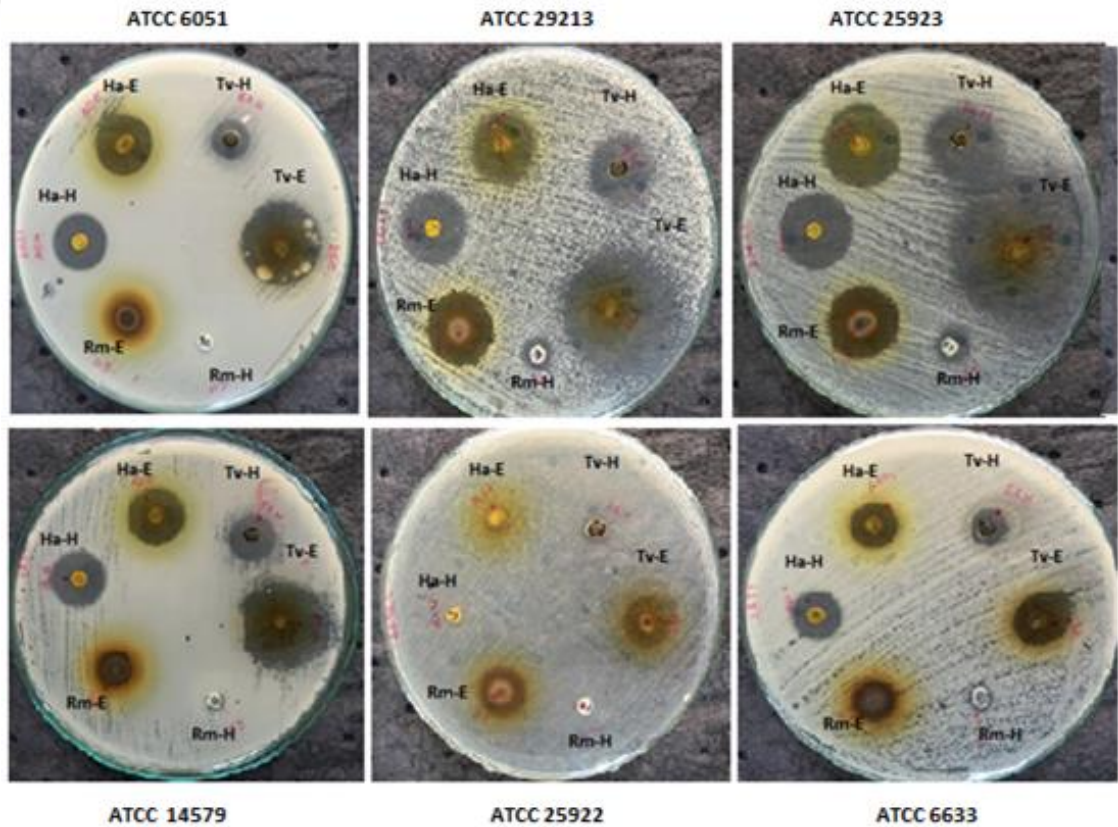
Bitkilerden elde edilen hekzan ve etanol ekstratlarının *S. aureus* üzerine inhibisyon etkileri well difüzyon yöntemiyle incelendiğinde, *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratı 5 – 50 mg/mL konsantrasyonları arasında yapılan bütün denemelerde inhibisyon etkisi gösterdi. Hekzan ekstratı ise hiç aktivite göstermedi. *Thymus vulgaris* etanol ekstratı 10 - 50 mg/mL konsantrasyonları arasında aktivite gösterirken, hekzan ekstratı ise çalışılan bütün konsantrasyonlarda aktivite göstermiştir. *Helichrysum arenarium* etanol ve hekzan ekstratı ise bütün konsantrasyonlarda patojene karşı inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Ekstratların *S.aureus* türü üzerine oluşturdukları inhibisyon alanları Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5. *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium*, *Rosa damascena* Mill. etanol ve hekzan ekstratlarının 5- 50 mg/ml konsantrasyonlarda *S. aureus* (ATCC 25923) bakterisi üzerine oluşturdukları inhibisyon alanları (mm).

mg/mL	<i>Rosa damascena</i> Mill		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Helichrysum arenarium</i>	
	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan
5	20 ± 1.02	0	0	20 ± 1.09	22 ± 1.13	20 ± 0.61
10	25 ± 1.04	0	0	23 ± 1.11	23 ± 0.07	23 ± 0.17
20	29 ± 0.75	0	0	30 ± 0.06	25 ± 0.49	26 ± 1.06
40	32 ± 0.41	0	0	32 ± 0.19	28 ± 1.24	32 ± 0.09
50	35 ± 0.19	0	0	32 ± 0.39	28 ± 0.81	32 ± 1.73

Bitki etanol ekstratları 20 mg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda yaklaşık 30 mm civarında inhibisyon alanı oluşturmuşlardır. *Helichrysum arenarium* bitkisinin hem etanol hem de hekzan ekstratları inhibisyon yapmıştır. *Rosa damascena* Mill etanol ekstratları ve *Thymus vulgaris* bitkisinin de hekzan ekstratları ise *S. aureus* türü üzerine etki göstermişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalarda birçok bitki ekstratının antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. *Mentha pulegium* (30.4 ± 1.12), *Satureja calamintha* (16.9 ± 1.18) ve *Lavandula stoechas* (28.0 ± 0.7) ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde *S. aureus* türü üzerine oluşturdukları inhibisyon alanlarının çapları 30.4 – 16.9 mm arasında değişiklik göstermiştir (Cherrat ve diğ., 2014). *Coriandrum sativum* esansiyel yağının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, *E. coli* üzerinde oluşturduğu inhibisyon alanı 13.0 ± 1.4 iken *S. aureus* üzerinde oluşturduğu inhibisyon alanı 31.0 ± 1.4 olarak tespit edilmiştir (Matasyoh ve diğ., 2009).

Tez çalışmasında well difüzyon yöntemi ile bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri 5 – 50 mg/mL konsantrasyon aralığında belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak antimikrobiyal aktivitelerde de artış gözlemlenmiştir. Ekstratların patojen türler üzerine zamana bağlı etkilerinin de incelenebilmesi için inkübasyon süreleri 120 saate çıkarılarak çalışmalar tekrar edilmiş ve oluşturdukları inhibisyon çaplarının zamana bağlı değişimleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.24’de verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, *E. coli* (ATCC 5922) ve *S. aureus* (ATCC 25923) türlerinin yanı sıra *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) ve *S. aureus* (ATCC 29213) türleri de incelenmiştir.



Şekil 3.24. *Thymus vulgaris* (Tv), *Helichrysum arenarium* (Ha), *Rosa damascena* Mill. (Rm) etanol ve hekzan ekstratlarının 50 mg/ml konsantrasyonlarda *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 5922) ve *S. aureus* (ATCC 25923), *B. subtilis* (ATCC 6051), *B. subtilis* (ATCC 6633), *B. cereus* (ATCC 14579) ve *S. aureus* (ATCC 29213) bakterileri üzerine etkilerinin well difüzyon yöntemi ile 120 saat inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon alanları (H; hekzan ekstratı, E; etanol ekstratı)

Yapılan çalışmada bitkilerden elde edilen hekzan ve etanol ekstratlarının inhibisyon aktiviteleri 37° C de 120 saatlik inhibisyon sonrasında gram pozitif türler üzerinde

etkili olmuştur. Rm hekzan ekstratı deneme yapılan gram pozitif türlerde etkili olmamıştır. Gram negatif bakteri *E. coli* ile yapılan çalışmalarda ise Tv etanol ve Rm etanol ekstratları etkili olmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde çalışmamızda kullanılan bitki ekstratlarının patojenler üzerindeki uzun süreli etkinlikleri de ortaya konmuştur. Özellikle etanol ekstratlarının hem gram pozitif hem de gram negatif türler üzerine inhibisyon etkilerinin daha baskın olduğu görülmüştür. Şekil 3.24’de elde edilen inhibisyon alanlarının çapları Tablo 3.6’ da verilmiştir.

Tablo 3.6. *Thymus vulgaris* (Tv), *Helichrysum arenarium* (Ha), *Rosa damascena* Mill. (Rm) etanol ve hekzan ekstratlarının 50 mg/ml konsantrasyonlarda bakteriler üzerine etkilerinin well difüzyon yöntemi ile 120 saat inkübasyon sonrası oluşturduğu inhibisyon alanları (mm)

	<i>Helichrysum arenarium</i> (Ha)		<i>Thymus vulgaris</i> (Tv)		<i>Rosa damascena</i> Mill. (Rm)	
	Hekzan	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan	Etanol
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6051)	20 ± 0.01	22 ± 0.19	8 ± 0.07	30 ± 0.14	0	5 ± 0.61
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	24 ± 1.09	23 ± 0.82	23 ± 0.08	37 ± 1.14	3 ± 0.29	23 ± 0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	24 ± 1.13	23 ± 0.19	23 ± 1.24	38 ± 1.18	3 ± 1.26	23 ± 0.07
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	20 ± 0.58	22 ± 0.11	8 ± 0.19	30 ± 1.34	0	6 ± 0.19
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	0	0	0	9 ± 1.03	0	8 ± 1.12
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	11 ± 0.71	11 ± 0.18	4 ± 1.25	22 ± 1.54	0	12 ± 1.12

3.2.2. Bitki ekstratı-biyopolimer karışımlarının antimikrobiyal aktivitesi

Tez konusunun uygulama aşaması olan ameliyatlarda kullanılan sütürlere antimikrobiyal aktivite kazandırma aşamasında, daha önceki bölümlerde antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen bitki ekstratlarının uygulanabilmesi için taşıyıcı

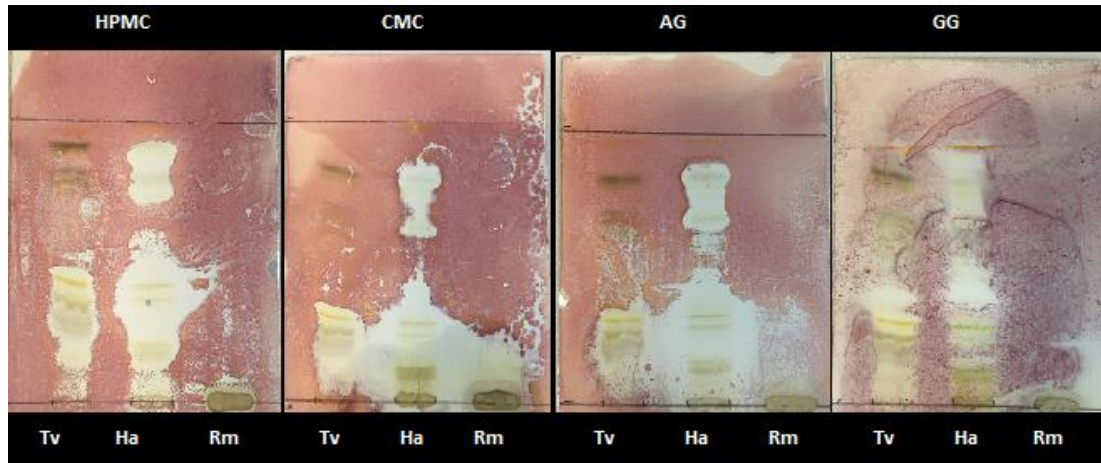
biyomalzemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu biyo malzemeler bitki ekstratları ile karıştırılarak sütür yüzeyine tutunmasını kolaylaştırmaktadır.

Çalışmamızda taşıyıcı biyo malzemeler olarak hidroksi propil metil selüloz (HPMC), karboksi metil selüloz (CMC), arabik gam (AG) ve cellan gam (GG) kullanılmıştır. Hazırlanan biyopolimer-ekstrat karışımlarının antimikrobiyal aktiviteleri TLC-biyootografi ve well difüzyon yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir.

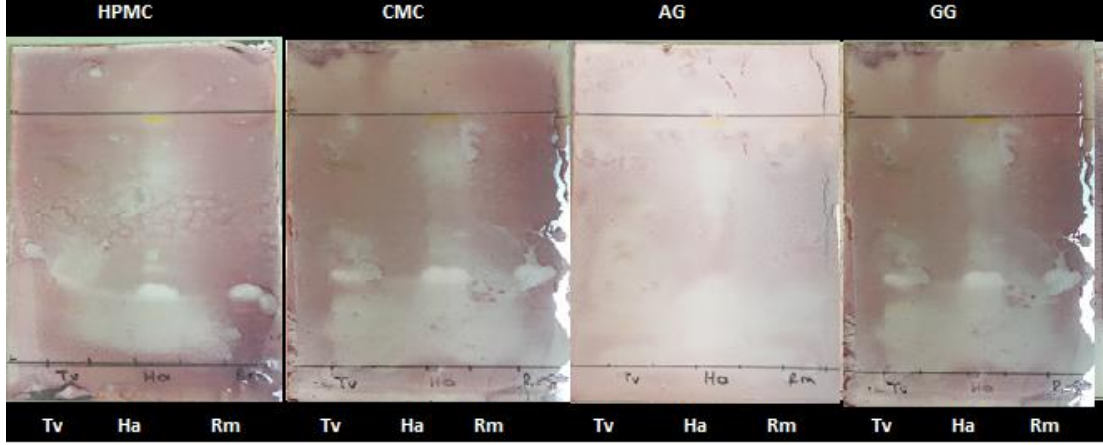
3.2.2.1. TLC-biyootografi

Biyopolimer-ekstrat karışımlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için TLC-Biyootografi yöntemi kullanılmıştır. Her bir biyo polimer ile bitki ekstratı hacimce %50 oranında karıştırılıp TLC plakalarda uygun mobil fazda yürütülüp türevlendirilmiştir.

Daha sonra plakalar *S. aureus* (Şekil 3.25) ve *E. coli* (Şekil 3.26) türlerinin hazırlanan süspansiyonları püskürtülerek inhibisyon alanları belirlenmiştir. Bu yöntem sayesinde biyopolimerlerin bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitelerine olan etkisi ile ilgili ön bilgi sahibi olunmuştur.



Şekil 3.25. Biyopolimer- bitki ekstratlarının (etanol) *S. aureus* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin TLC-Biyootografi yöntemi ile belirlenmesi. Tv; *Thymus vulgaris*, Ha; *Helichrysum arenarium*, Rm; *Rosa damascena* Mill.



Şekil 3.26. Biyopolimer- bitki ekstratlarının (etanol) *E. coli* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitelerinin TLC-Biyootografi yöntemi ile belirlenmesi. Tv; *Thymus vulgaris*, Ha; *Helichrysum arenarium*, Rm; *Rosa damascena* Mill.

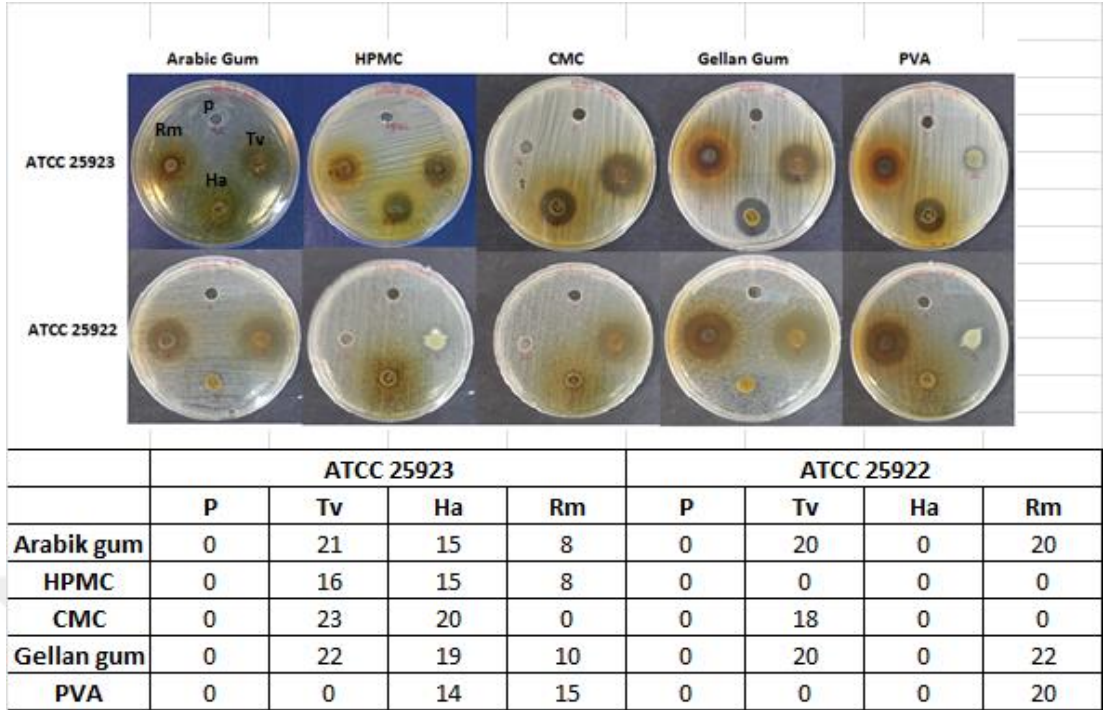
Şekil 3.25 ve 3.26 incelendiğinde biyopolimerlerin bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı anlaşılmaktadır. Bitki ekstratlarının tek başına TLC-biyotogramları ile benzer sonuçlar vermektedir.

Buradan yola çıkarak, seçilen biyopolimerlerin kullanılabilirliği de açıklanmış olmaktadır. TLC-Biyootografi yöntemi, doğal maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri konusunda ön bilgi edinmek için kullanılan hızlı ve karmaşık ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir.

Bu yöntem kullanılarak uygun mobil fazlarda yürütülen biyopolimer-bitki ekstratı karışımlarının, bitki ekstratlarının tek başlarına iken gösterdikleri antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bir etki göstermedikleri anlaşılmıştır. Hem garm (+) hem de gram (-) tür üzerine inhibisyon aktiviteleri kromatogramlarda gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların daha net anlaşılabilmesi için başka antimikrobiyal aktivite tanımla yöntemleri de kullanılarak sonuçlar desteklenmiştir.

3.2.2.2. Well difüzyon

Biyopolimer- ekstrat karışımlarının antimikrobiyal aktiviteleri well difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Karışımların oluşturdukları inhibisyon alanları Şekil. 3.27 de verilmiştir.



Şekil 3.27. Biyopolimer-bitki ekstratı karışımlarının well difüzyon yöntemi ile analizi. P- polimer, Tv- *Thymus vulgaris*, Ha; *Helichrysum arenarium*, Rm; *Rosa damascena* Mill

Analiz sonuçlarına göre; Tv ekstratı *S. aureus* türü için en yüksek inhibisyon aktivitesini CMC ile oluşturduğu karışımda göstermiştir. Arabik gum ile olan karışımında 21 mm, HPMC ile olan karışımında 16 mm, Gellan gum ile olan karışımında 22 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur. Ha ekstratı da en yüksek inhibisyon aktivitesini CMC ile olan karışımında göstermiştir.

Arabik gum ve HPMC ile 15 mm, Gellan gum ile 19 mm, PVA ile de 14 mm inhibisyon alanı oluşturmuştur. Rm ise PVA ve Gellan gum ile olan karışımlarında kayda değer bir aktivite göstermiştir.

E. coli türü için ise Tv ekstratı Arabik gum, CMC ve gellan gum ile 18-20 mm arasında inhibisyon çapı oluşturmuştur. Ha ekstratı hiç aktivite göstermezken Rm ekstratı Arabik gum, gellan gum ve PVA ile olan karışımlarında aktivite göstermiştir. Biyopolimerlerin bitki ekstratları ile karışmamış hallerinde ise hiçbir aktivite görülmemiştir.

3.3. Sütürler

3.3.1. Sütürlerin kaplanması

Dikişlerin kaplanması için daldırma kaplama yöntemi kullanılmış ve daldırma kaplama için, çözelti 40mL DMSO içinde 20 gr ekstrat-biyopolimer karışımı eklenerek hazırlanmıştır. Sütürler (3 cm uzunluk) sterilize edilip daldırma kaplama çözeltisine (60 dakika) daldırıldıktan sonra çıkarılarak 24 saat boyunca havada kurumaları sağlandı. Dikişin kaplanmasının teyidi, kaplamadan önce ve sonra ağırlık ölçülerek yapıldı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Biyopolimer-ekstrat karışımlarının sütürlere kaplanmadan önce ve sonraki % kütle değişimleri. AG-Arabik gum, HPMC-Hidroksipropil metil selüloz, CMC-karboksi metil selüloz, GG-gellan gum, PVA-polivinil alkol.

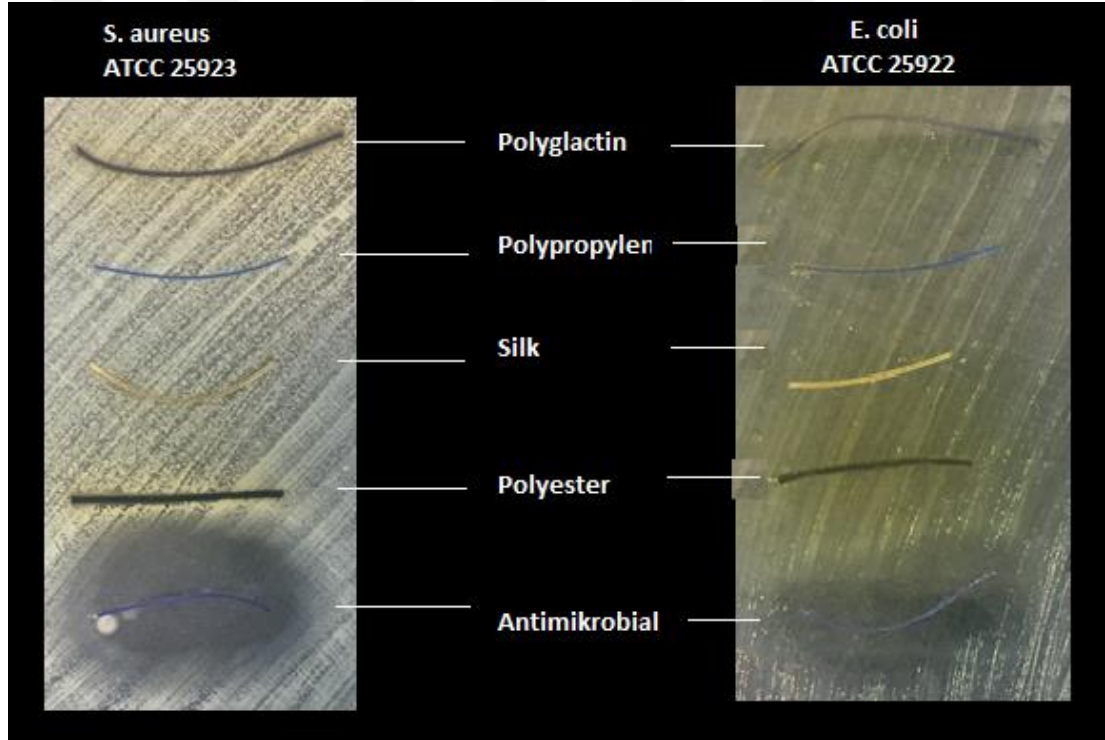
	Coted Vicryl	Prolene	Permehand	PDS II
AG-Tv	0.78	0.71	0.27	0.66
AG-Ha	0.72	0.66	0.25	0.69
Ag-Rm	0.69	0.68	0.25	0.71
HPMC-Tv	0.84	0.77	0.18	0.68
HPMC-Ha	0.87	0.83	0.16	0.72
HPMC-Rm	0.81	0.81	0.14	0.7
CMC-Tv	0.92	0.88	0.21	0.82
CMC-Ha	0.96	0.9	0.19	0.86
CMC-Rm	0.89	0.85	0.16	0.79
GG-Tv	0.24	0.37	0.05	0.3
GG-Ha	0.33	0.38	0.11	0.27
GG-Rm	0.29	0.41	0.09	0.29
PVA-Tv	0.52	0.62	0.12	0.41
PVA-Ha	0.56	0.57	0.12	0.44
PVA-Rm	0.48	0.61	0.14	0.51

Sütürlerin kaplanması işlemi kaplama öncesi ve sonrası kütle değişimleri hesaplanarak belirlenmiştir. Kütlelerde meydana gelen % artışlar sütür yüzeyine kaplanan

biyopolimer-ekstrat karışım oranını vermektedir. Sütürlerin kaplama işlemi tamamlandıktan sonra antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır.

3.3.2. Kaplı sütürlerin antimikrobiyal aktivitesi

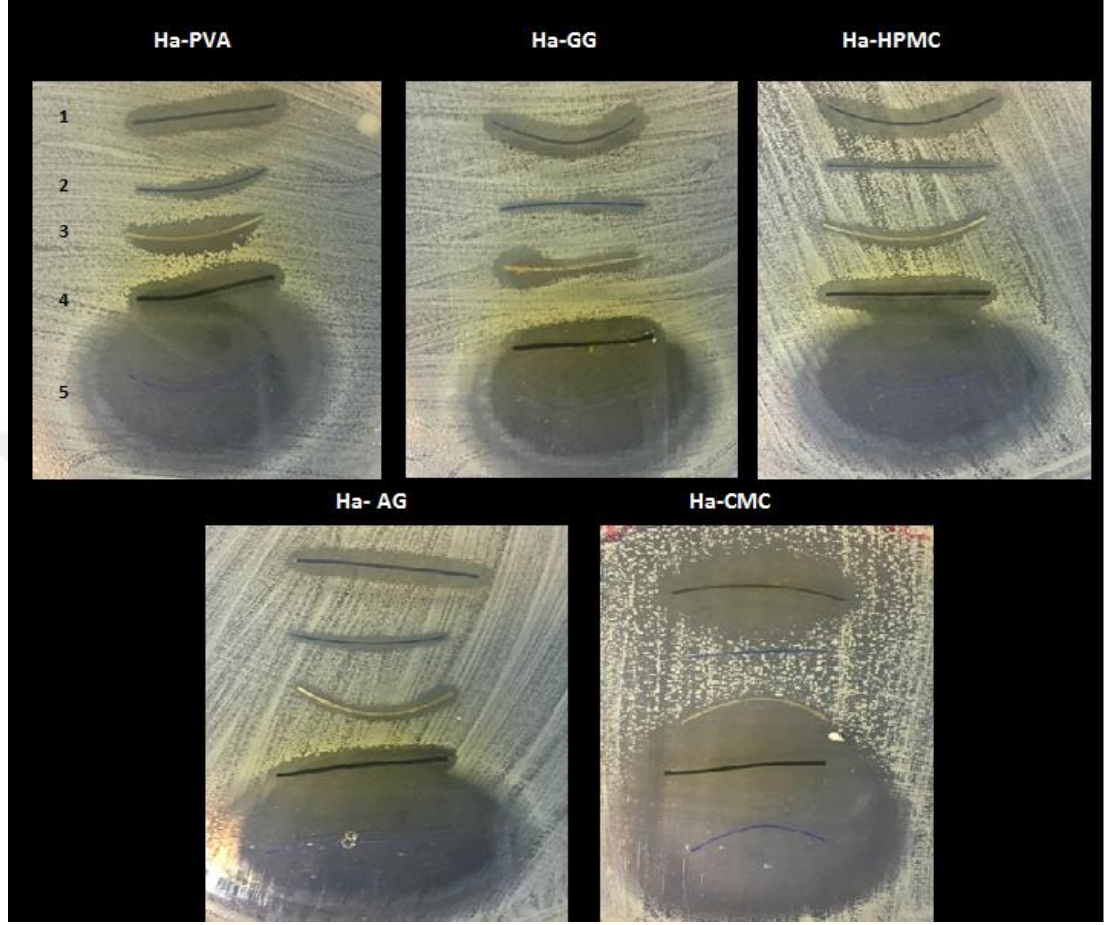
Sütürlere antimikrobiyal aktivite kazandırmak amacı ile hazırlanan biyopolimer-ekstrat karışımları, daldırma yöntemi ile sütürlere kaplanmış ve antimikrobiyal aktivite testleri için saklanmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan farklı özelliklerdeki 4 adet sütür kaplama yapılmadan negatif kontrol olarak antimikrobiyal aktivite açısından incelenmiştir. Ticari olarak antimikrobiyal sütür olarak satılan Triclosan kaplı Coated Vicryl Plus antibakteriyel sütür pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. Kaplama yapılmamış sütürlerin ve ticari olarak antimikrobiyal kaplamalı satılan sütürün *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri üzerine inhibisyon aktiviteleri

Çalışma kapsamında; kaplama yapılarak antimikrobiyal aktivite kazandırılması planlanan sütürlerin, kaplamasız hallerinin çalışma yapılan türler üzerinde herhangi bir aktivitesinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla negatif ve pozitif kontroller analiz edilmiştir. Bu bağlamda sütürlerin kaplamasız hallerinin *E. coli* ve *S. aureus* türleri üzerine herhangi bir aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olan

triclosan kaplı antimikrobiyel sütür ise *E. coli* zerinde 3 ± 0.04 mm ve *S. aureus* zerine 4 ± 0.14 mm inhibisyon göstermiştir.

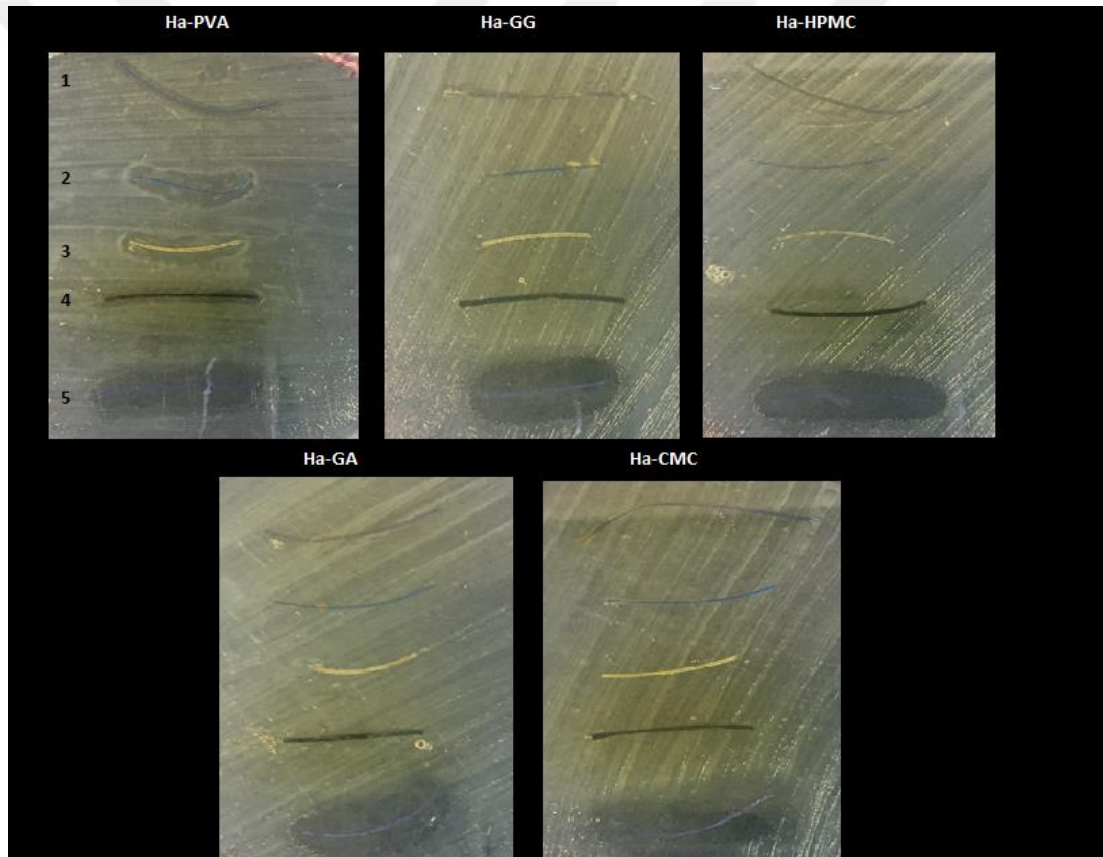


şekil 3.29. Ha- *Helichrysum arenarium* etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *S. aureus* zerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol

Helichrysum arenarium etanol ekstratı – biyopolimer karışımları ile kaplanan 4 farklı sütürün *S. aureus* gram pozitif bakteri türü üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ha-CMC karışımı ile kaplı olan Polipropilen (2) yapısındaki sütür haricindeki diğer bütün sütürlerin inhibisyon alanı oluşturduğu görülmektedir. Polyglactin (1) ve Polyester (4) yapısında olan sütürlerin oluşturdukları inhibisyon alanları diğer türlere oranla daha büyüktür. Bütün denemelerde en büyük inhibisyon alanını pozitif kontrol oluşturmuştur. Kaplı sütürlerin oluşturdukları inhibisyon alanları Tablo 3.8’ de verilmiştir.

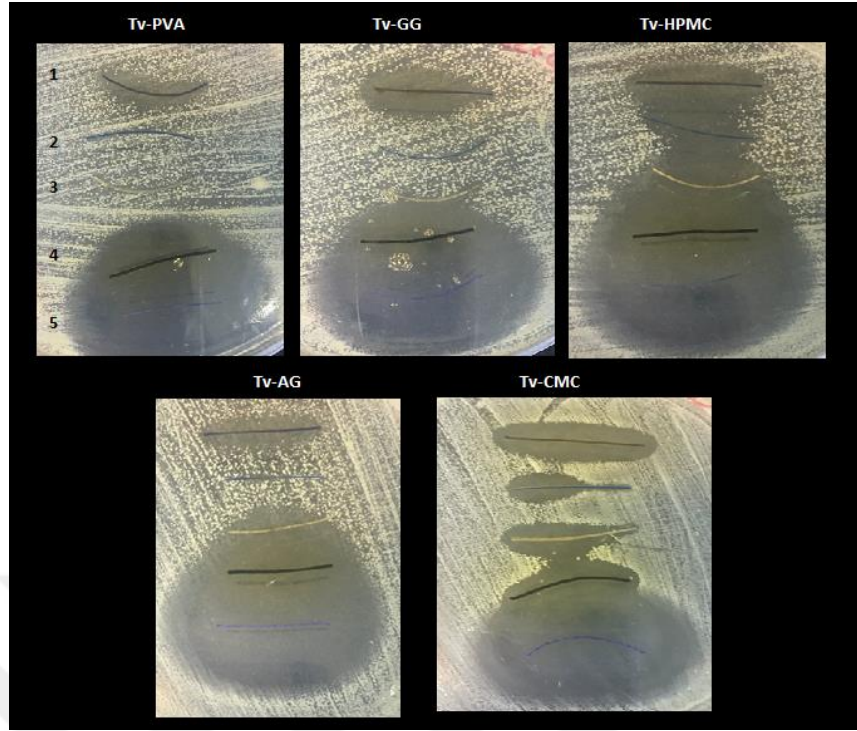
Tablo 3.8. *Helichrysum arenarium* etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı sütürlerin *S. aureus* türü üzerine inhibisyon çapları (mm)

	Polyglactin	Polypropylene	Silk	Poliester	Pozitif kont.
Ha-PVA	0.97 ± 1.13	0.2 ± 2.07	0.92 ± 1.09	1.2 ± 1.42	4 ± 0.14
Ha-GG	0.97 ± 1.07	0.2 ± 0.17	0.41 ± 0.03	T.E	
Ha-HPMC	0.97 ± 1.15	0.2 ± 1.82	0.38 ± 0.56	1.18 ± 0.81	
Ha-AG	0.94 ± 0.91	0.2 ± 0.23	0.41 ± 0.91	1.05 ± 0.79	
Ha-CMC	2 ± 0.07	0	0	T.E	



Şekil 3.30. Ha- *Helichrysum arenarium* etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *E. coli* üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol

Helichrysum arenarium etanol ekstratı-biyopolimer karışımları ile kaplanan sütürler *E. coli* üzerine inhibisyon aktivitesi göstermemiş, sadece pozitif kontrol Triclosan kaplı sütür aktivite göstermiştir.

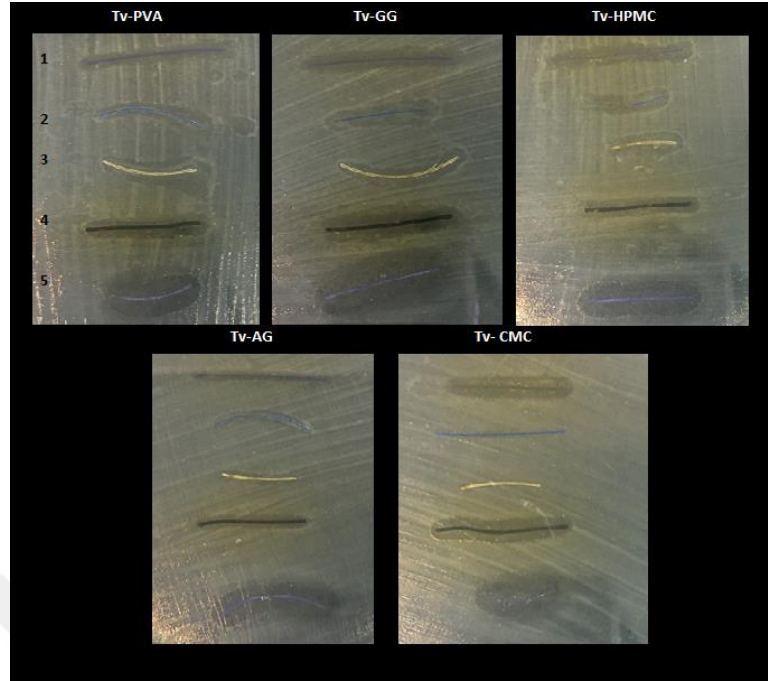


Şekil 3.31. Tv- *Thymus vulgaris* etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *S. aureus* üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol

Şekil 3.31 incelendiğinde *Thymus vulgaris* ekstratı – biyopolimer karışımları ile kaplanan 1 ve 4 numaralı sütürlerin *S. aureus* gram pozitif bakteri türü üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tv-CMC ve Tv-HPMC ile kaplı olan sütürlerin tamamı inhibisyon aktivitesi gösterirken, Tv-PVA ve Tv-GG ile kaplı 2 ve 3 numaralı sütürlerde inhibisyon aktivitesi gözlemlenmemiştir. Kaplı sütürlerin oluşturdukları inhibisyon alanları Tablo 3.9’ da verilmiştir.

Tablo 3.9. *Thymus vulgaris* etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı sütürlerin *S. aureus* türü üzerine inhibisyon çapları (mm)

	Polyglactin (1)	Polypropylene (2)	Silk (3)	Polyester (4)	Pozitif kont. (5)
Tv-PVA	0.91 ± 0.63	0	0	T.E	4 ± 0.14
Tv-GG	1.18 ± 1.27	0	0	T.E	
Tv-HPMC	0.98 ± 0.36	0.21 ± 1.24	0.34 ± 1.92	T.E	
Tv-AG	0.94 ± 0.72	0	0.95 ± 0.026	T.E	
Tv-CMC	1.4 ± 1.09	0.87 ± 0.04	0.91 ± 1.93	1.23 ± 0.51	



Şekil 3.32. Tv- *Thymus vulgaris* etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının sütürlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı sütürlerin *E. coli* üzerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol

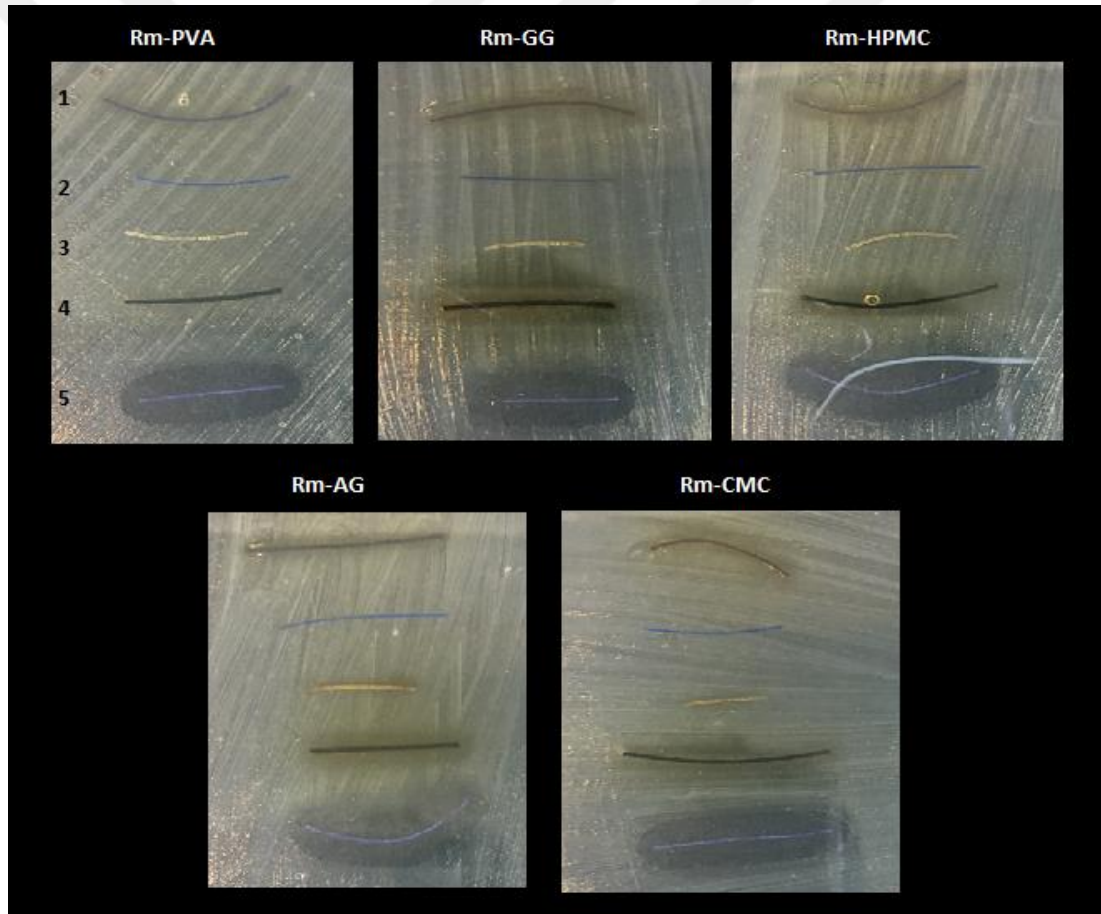
Şekil 3.32 incelendiğinde Tv-biyopolimer karışımları ile kaplanan sütürlerin *E. coli* üzerine inhibisyon aktiviteleri görülmektedir. Polyester (4) yapıda olan sütür bütün kaplama karışımlarında aktivite göstermiştir. Polyglactin (1) yapıda olan sütür ise AG karışımı hariç bütün karışımlarda inhibisyon alanı oluşturmuştur. Bütün biyopolimer-ekstrat karışımı kaplamalarında en yüksek aktiviteyi pozitif kontrol sergilemiştir. Kaplı sütürlerin oluşturdukları inhibisyon alanları Tablo 3.10' da verilmiştir.

Tablo 3.10. *Thymus vulgaris* etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı sütürlerin *E. coli* türü üzerine inhibisyon çapları (mm)

	Polyglactin (1)	Polypropylene (2)	Silk (3)	Poliester (4)	Pozitif kont. (5)
Tv-PVA	0.21 ± 1.02	0.18 ± 0.92	0	0.67 ± 1.09	3 ± 0.14
Tv-GG	0.81 ± 1.83	0	0	0.97 ± 1.72	
Tv-HPMC	0.83 ± 0.07	0.76 ± 1.43	0.91 ± 1.26	0.62 ± 0.04	
Tv-AG	0	0	0	0.35 ± 1.38	
Tv-CMC	1.09 ± 1.73	0	0	0.85 ± 0.41	

Tablo 3.11. *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratları biyopolimer karışımları ile kaplı s  t  rlerin *S. aureus* t  r     zerine inhibisyon   apları (mm)

	Polyglactin (1)	Polypropylene (2)	Silk (3)	Poliester (4)	Pozitif kont. (5)
Rm-PVA	0	0	0	0	4 ± 0.14
Rm-GG	2.01 ± 0.71	0	0	1.96 ± 1.02	
Rm-HPMC	0	0	0	0	
Rm-AG	0	0	0	0	
Rm-CMC	1.32 ± 0.72	0	0	0.97 ± 0.65	



  ekil 3.34. Rm- *Rosa damascena* Mill. etanol ekstratları biyopolimer karışımlarının s  t  rlere kaplanması ile elde edilen kaplamalı s  t  rlerin *E. coli*   zerine inhibisyon etkileri. 1; polyglactin 910, 2; polypropylene, 3; ipek, 4; polyester, 5; pozitif kontrol

  ekil 3.34 incelendi  inde Rm-biyopolimer karışımlarının kaplanmasıyla elde edilen s  t  rlerin *E. coli*   zerine antimikrobiyal aktiviteleri g  r  lmektedir. Rm-PVA

kaplamalı sütürler *E. coli* türüne kar   aktivite göstermedi. Rm-GG kaplamalı sütürler Polyglactin (1) ve Polyester (4) sütürler aktivite gösterirken diğerleri göstermedi. Rm-HPMC, Rm-AG ve Rm-CMC kaplamalı s t rlerden polyester (4) yapıda olanı aktivite göstermiştir.

Antimikrobiyal aktiviteye sahip sütürlere olan ilgi her geçen yıl artmaktadır. Hali hazırda Ethicon tarafından üretilip satılmakta olan Vicryl plus coated antimikrobiyal sütür bir çok cerrahi operasyonda kullanılmaktadır. Bu sütüre antimikrobiyal aktivite kazandıran madde triklosandır, günümüzde bir çok gıda katkı olarak kullanılmakta olan madde sütürlerde de bir çok bakteriye kar   etki göstermektedir. Bilindiği üzere patojen bakteriler zamanla antibiyotiklere kar   direnç geliştirmektedir. Bu durum göz önüne alındığında sütürlere uygulanabilen yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında literatürde konu ile alakalı bir çok araştırmaya rastlamak mümkündür.

Belirgin bir antibakteriyel ve fungisidal etkiye sahip geniş bir spektrum antiseptik olarak Decamethoxin'in ve bu maddenin taşıyıcısı olarak BF-6 phenol-polyvinylacetal birlikte sütürleri modifiye edici bir kompozit olarak kullanılmıştır. Bu kompozitteki Decamethoxin oranı toplam içeriğin %10 u olduğunda sütürün *E. coli*'ye olan inhibisyon aktivitesinin 4 kat, *S. aureus*'a olan inhibisyon aktivitesinin de 8 kat arttığı tespit edilmiştir (Kovtun ve di ., 2000). Başka bir çalışmada kitosan, örgülü ipek diki lere    farklı konsantrasyonda uygulanmış ve kitosan kaplamanın örgülü ipek sütürün özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kitosan konsantrasyonu %1'e y kselti inde kaplı sütürün *S. aureus*'e kar   oluşturduğu inhibisyon alanı 3 mm iken *E. coli*'ye kar   oluşturduğu alan 4.5 mm olarak ölçülmüştür (Viju ve Thilagavathi, 2011). Polivinil alkol ve Aloe vera karışımının hazırlanarak sütürlere kaplandığı ve antimikrobiyal aktivitelerinin ara tırıldı ı başka bir çalışmada, aloe vera konsantrasyonunun % 5 olduğu kaplamada test edilen bakterilere kar   en yüksek inhibisyon aktiviteleri elde edilmiş ve oluşturulan PVA-aloevera kompozisyonu *E. coli*'ye kar   4.6 mm ik inhibisyon çapı oluşturmuştur (Ghafoor ve di ., 2016). Lokal enfeksiyonların başlangıcında proliferasyon için kritik bir faktör olan klorheksidin veya oktenidin kullanılarak kaplanmış cerrahi sütürlerde, meydana gelen bakteri yapı maları azaltılmıştır.

Klorheksidin-palmitat kullanılarak uygulanan kaplamada *S. aureus* üzerinde oluşan inhibisyon çapı 2 mm'den 8 mm'ye kadar yükselmiştir (Obermeier ve diğ., 2018). Ameliyatlarda kullanılan sutureler için geliştirilen bir kaplama kompozisyonunda antimikrobiyal madde olarak totarol, *Podocarpus totara* bitkisinden izole edilen diterpenoid ve taşıyıcı olarak da poly(lactide-co-glycolide)asit kullanılmıştır. Bu kaplama monofilament yapıda bir suture uygulanmış ve 15 gün boyunca *S. aureus* türüne karşı etki gösterdiği tespit edilmiştir (Reinbold ve diğ., 2017). Antimikrobiyal peptitlerden esinlenerek sentezlenen bir amfifilik polimerin, poli [(aminoetil metakrilat) -co- (butil metakrilat)] (PAMBM) suture kaplama materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada, *S. aureus* türü üzerinde Etighon'un antimikrobiyal Vicryl Plus sutureüne oranla 2 kat daha fazla antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Li ve diğ., 2012).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yara enfeksiyonu, ameliyat sonrası tedavide korkulan bir komplikasyondur, hasta için önemli sonuçlara ve toplum için yüksek tıbbi maliyetlere yol açar. Yara enfeksiyonlarındaki en yaygın patojenler, cerrahi implantları veya sütürleri kolonize eden *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'dir. Bu enfeksiyonlardan mümkün olduğunca kaçınmak çok önemlidir. Olası bir yol, cerrahi dikişlerin antiseptikler gibi antimikrobiyal ilaçlarla kaplanmasıdır. Bu kaplamaları birçok durumda, son derece lipofilik biyomalzemelerin yüzeyindeki hidrofilik ajanlara bağlamak için bir aracı ajan gereklidir. Bu ajanlar genel olarak biyopolimerler ve bunların modifiye yapıları olmaktadır.

Önerilen tez çalışmasında ilk aşamada sütürlere antimikrobiyal aktivite kazandıracak maddelerin elde edilmesi için Anadoluda yetişen endemik Bilye kekik-Tv (*Thymus vulgaris*), Altın otu-Ha (*Helichrysum arenarium*) ve Isparta gülü-Rm (*Rosa damascena* Mill) bitkileri toplanmış ve ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bitkiler yapılarındaki yağlı kısımların uzaklaştırılması için önce hekzan ardından da etanol ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstratların fitokimyasal analiz çalışmaları TLC ve LC-MS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TLC çalışmalarında; yapıda bulunması olası fenolik standart bileşikler kullanılarak tayinler yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarında kafeik asit bütün bitki ekstratlarında tayin edilirken ($R_f=0.68$), vanillik asit ($R_f=0.75$) ve gallik asit ($R_f=0.51$) Tv ekstratında tespit edilmiştir. Rm ekstratında ise kojik asit ($R_f=0.36$) tespit edilmiştir. TLC yöntemi ile varlıkları tahmin edilen fenolik bileşiklerin tespiti aynı zamanda LC-MS yöntemi kullanılarak da araştırılmıştır. LC-MS analizleri sonucunda Tv ekstratında gallik asit, vanillik asit ve kafeik asitin; Ha ekstratında vanillik asit, kojik asit ve kafeik asitin; Rm ekstratında ise gallik asit, kojik asit ve kafeik asitin varlığı tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında bitki ekstratlarının *S. aureus* ve *E.coli* bakterileri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Bu amaçla TLC-Biyootografi, disk difüzyon ve well difüzyon yöntemleri kullanılmıştır.

TLC-Biyootografi çalışmaları Tv ve Ha ekstratlarının *S. aureus* bakteri türü ve Rm ekstratlarının *E. coli* bakteri türü üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Disk difüzyon yöntemi ile de bu sav doğrulanmıştır. Ayrıca well difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Tv, Ha ve Rm ekstratlarının hem gram pozitif hem de gram negatif tür üzerine olan antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite taşıdığı tespit edilen bitki ekstratlarının sütür yüzeylerine tutunabilirliğinin artırılması için kullanılacak olan biyopolimerler ile karışımları hazırlanmış ve bu karışımların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Polimer-ekstrat karışımlarının *S. aureus* üzerine inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde Tv ve Ha ekstratlarının 5 farklı biyopolimer ile elde edilen karışımı da antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Rm ekstratı ise arabik gum, gellan gum ve PVA ile elde edilen karışımlarında antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Polimer-ekstrat karışımlarının *E. coli* üzerine inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde sadece Rm ekstratının arabik gum, gellan gum ve PVA ile olan karışımları antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Tezin üçüncü aşamasında hazırlanan bitki ekstratı-biyopolimer karışımları 4 farklı yapıda sütür materyaline kaplanarak bu sütürlerin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Sütürler daldırma yöntemi ile kaplanıp kurutulduktan sonra, kaplama öncesi ve sonrası ağırlıkları tartılarak kaplama işleminin başarısından emin olunmuştur. Kaplama yapılan sütürlerin antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Altın otu (Ha) etanol ekstratı ile PVA, gellan gum, HPMC ve arabik gum karışımlarının tamamı polyglactin (1) emilebilen, polipropilen (2) emilemeyen, ipek (3) emilemeyen ve poliester (4) emilebilen sütürlere kaplandığında *S. aureus* türü üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Aynı kaplamalı sütürler *E. coli* türü üzerine inhibisyon aktivitesi göstermemiştir. Bilye kekik (tv) etanol ekstratı ile PVA ve gellan gum karışımları sadece 1 ve 4 nolu sütürlere kaplandığında *S. aureus* türü üzerinde inhibisyon aktivitesi göstermiş, HPMC ve CMC karışımlarıyla kaplama yapılan bütün sütürlerde ise inhibisyon alanı oluşturmuştur. Tv-AG karışımı ise polipropilen (2) sütür hariç diğerlerinde aktivite göstermiştir. Tv ekstratı ile polimer karışımları ile kaplanan sütürler *E. coli* türüne karşı inhibisyon aktivitesi gösterirken özellikle 1 ve 4 numaralı emilebilen sütürlere yapılan kaplamalarda aktivite görülmüştür. Gül (Rm) ekstratı polimer karışımları ile yapılan kaplamalarda, Rm-GG karışımı ve Rm-CMC karışımlarında 1 numaralı sütür *S. aureus* türü üzerine

inhibisyon aktivitesi oluşturmuştur. Rm-Polimer karışımları ile kaplanan sũtũrler *E. coli* tũrũne karşı belirgin bir aktivite sergilememiştir.

Çalışmamızdan elde edilen çıktılar;

Bilye kekik-Tv (*Thymus vulgaris*), Altın otu-Ha (*Helichrysum arenarium*), Isparta gũlũ-Rm (*Rosa damascena Mill*) bitkileri fitokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Vanilik asit Tv ekstratında 1.4291 ppm, Ha ekstratında 4.6297 ppm; gallik asit Tv ekstratında 0.1371 ppm, Rm ekstratında 1579.9 ppm; kafeik asit Tv ekstratında 2.4549 ppm, Ha ekstratında 16.36 ppm ve Rm ekstratında 0.2829 ppm; kojik asit Ha ve Rm ekstratlarında 0.1 ppm in altında tespit edilmiştir.

Bitki ekstratlarının 3 farklı yũntemle antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş ve *S. aureus* tũrũ üzerine en yũksek inhibisyon alanı Tv etanol ekstratı ile elde edilmiştir (22 mm). *E. coli* tũrũ üzerine en yũksek inhibisyon alanı ise Rm etanol ekstratı ile elde edilmiştir (10 mm).

Well difũzyon yũntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda bitki ekstratlarının bakteriler üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir.

Bitki ekstratları- polimer karışımlarının antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiş ve polimerlerin tek başlarına inhibisyon aktivitesi gũstermezken bitki ekstratları ile birlikte aktivite gũsterdikleri ortaya konulmuştur. Bitki ekstratlarının polimerlerle karıştırıldıklarında antimikrobiyal aktivitelerinde belirgin bir değişim olmadığı gũzlemlenmiřtir.

Ekstrat-biyopolimer karışımlarının sentetik ve doğal, emilebilir ve emilemeyen yapıdaki 4 farklı sũtũre kaplanarak antimikrobiyal aktiviteleri test edildiğinde, kaplanan sũtũrlerin gram pozitif bakteri üzerine gram negatif bakteriye oranla daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Oluşan inhibisyon çapları 0.2 – 2.1 mm arasında değişkenlik gũstermiř ve emilebilen sũtũrler emilemeyen sũtũrlere oranla her iki bakteri tũrũ için de daha iyi sonuçlar vermiştir.

Tez kapsamında cerrahi operasyonlar sonrası meydana gelen enfeksiyonların ve bunların yol açtığı ölüm ve maddi kayıpların azaltılabilmesi amacı ile yeni doğal antimikrobiyal kaynaklar karakterize edilmiştir. Bu kaynaklar sütür materyallere uygulanabilir hale getirilip cerrahi operasyon sonrası enfeksiyona sebep olan en yaygın bakteri türleri üzerine etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar bu yeni doğal kaynakların nozokomiyal enfeksiyonların önüne geçmede kullanılabilir olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle antibiyotik direnci geliştiren bakterilerle olan savaşta doğal antibiyotiklerin keşfinin oldukça önemli olduğu bu dönemde literatüre yeni doğal kaynaklar kazandırılmıştır.



KAYNAKLAR

Aazza S., Lyoussi B., Megías C., Cortés-Giraldo I., Vioque J., Figueiredo A. C., Anti-oxidant: Anti-inflammatory and Anti-proliferative Activities of Moroccan Commercial Essential Oils, *Natural Product Communications*, 2014, **9**, 587–594.

Abdessalem S. B., Debbai F., Jedda H., Elmarzougui S., Mokhtar S., Tensile and Knot Performance of Polyester Braided Sutures, *Textile Res. J.* 2009, **79**(3), 247-252.

Adanur S., Wellington Sears Hand Book of Industrial Textiles, Wellington sears company. 1995, 335-337.

Akin M., Arabaci G., Saki N., Total Phenols, Antioxidant Potential and Tyrosinase Inhibitory Activity of Walnut (*Juglans Regia* L.) Leaf, Husk and Seed, *Asian journal of Chemistry*, 2013, **25**(16), 9337-9340.

Al Laham S. A., Al Fadel F. M., Antibacterial Activity of Various Plants Extracts Against Antibiotic-resistant *Aeromonas Hydrophila*, Jundishapur, *Journal of Microbiology*, 2014, **7**, 11370.

Al-Menhali A., Al-Rumaihi A., Al-Mohammed H., Al-Mazrooey H., Al-Shamlan M., AlJassim M., *Thymus Vulgaris* (Thyme) Inhibits Proliferation, Adhesion, Migration: And Invasion of Human Colorectal Cancer Cells, *Journal of Medicinal Food*, 2015, **18**, 54–59.

Alamgeer A., Jabeen M. S., Khan Q., Maheen H. U., Haroon-Ur-Rash S., Pharmacological Evaluation of Antihypertensive Effect of Aerial Parts of *Thymus Linearis* Benth, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2014, **71**, 677–682.

Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O., Hamzaoglu E., Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Helichrysum* (Asteraceae) Species Collected from Turkey, *Food Chemistry*, 2010, **119**, 114–122.

Altemimi A., Lakhssassi N., Baharlouei A., Watson D. G., Lightfoot D. A., Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts, *Plants*, 2017, **6** (42), 1-23.

Alves R. R. N., Rosa I. M. I., Biodiversity, Traditional Medicine and Public Health: Where Do They Meet? *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2007, **3**, 14-2.

Ashour M., Wink M., Gershenzon J., Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. In Wink M. (ed) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Annual Plant Reviews, Second edition, Wiley-Blackwell, 2010.

Assiri A. M. A., Elbanna K., Abulreesh H. H., Ramadan M. F., Bioactive Compounds of Cold-pressed Thyme (*Thymus vulgaris*) Oil with Antioxidant and Antimicrobial properties, *Journal of Oleo Science*, 2016, **65**(8), 629 – 640.

Babota M., Mocan A., Vlase L., Cris O., Ielciu I., Gheldiu A., Vodnar D. C., Cris G., Păltinean R., Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Helichrysum Arenarium* (L.) Moench and *Antennaria Dioica* (L.) Gaertn. Flowers, *Molecules* 2018, **23**, 409.

Badhani B., Gallic Acid: A Versatile Antioxidant with Promising Therapeutic and Industrial Applications, *R.S.C. Adv*, 2015, **5**, 27540–27557.

Baker C. N., Stocker S. A., Culver D. H., et al., Comparison of the E-Test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 533–538.

Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S. K., Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, **6**, 71–79.

Benameur Q., Gervasi T., Pellizzeri V., Pľuchtová M., Tali-Maama H., Assaous F., Guettou B., Rahal K., Gruľová D., Dugo G., Marino A., Ben-Mahdi M., Antibacterial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Alone and in Combination with Cefotaxime Against blaESBL Producing Multidrug Resistant Enterobacteriaceae Isolates, *Natural Product Research*, 2019, **33**(18), 2647-2654.

Benmoussa H., Elfalleh W., Farhat A., Bachoual R., Nasfi Z., Romdhane M., Effect of Extraction Methods on Kinetic, Chemical Composition and Antibacterial Activities of Tunisian *Thymusvulgaris*. L. Essential Oil, *Separation Science and Technology*, 2016, **51**(13), 2145-2152.

Berdy J., Bioactive Microbial Metabolites, *J. Antibiot.*, 2005, **58**, 1–26.

Bettelheim, K. A., *Biochemical characteristics of Escherichia coli*, p. 3–30. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1994.

Bodini S. F., Manfredini S., Epp M., Valentini S., Santori F., Quorum Sensing Inhibition Activity of Garlic Extract and P-coumaric Acid, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009, **49**, 551–555.

Boothe H.W., *Suture materials, tissue adhesives, staplers and ligating clips*, *Text book of small animal surgery*, Volume-II, Saunders, Elsevier Science, USA, 1993

Buckingham J., *Dictionary of Natural Products*, Abingdon: Taylor & Francis, USA, 1993.

Campos F. M., Couto J. A., Figueredo A.R., Toth I. V., Rangel A. O. S. S., Hogg T. A., Cell Membrane Damage Induced by Phenolic Acids on Wine Lactic Acids Bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **135**, 144–151.

Chatterjee S., Comparative Trial of Dexon (polyglycolic acid), Collagen, and Silk Sutures in Ophthalmic Surgery, *British J. Ophthalmol.* 1975, **59**, 736-740.

Chellamani K. P., Veerasubramanian D., Balaji R. S. V., Surgical Sutures: An Overview, *J. Acad. Indus. Res.*, 2013, **1**(12), 778-782.

Cherrat L., Espin L., Bakkali M., Pagán R., Laglaoui A., Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Mentha Pulegium*, *Lavandula Stoechas* and *Satureja Calamintha* Scheele Essential Oils and an Evaluation of Their Bactericidal Effect in Combined Processes, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2014, **22**, 221–229.

Chirinos R., Betalleluz-Pallardel I., Huamán A., Arbizu C., Pedreschi R., Campos D., HPLC-DAD Characterisation of Phenolic Compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) Tubers and Their Contribution to the Antioxidant Capacity, *Food Chem.*, 2009, **113**, 1243–1251.

Chomnawang M. T., Trinapakul C., Gritsanapan W., In Vitro Antigonococcal Activity of *Coscinium Fenestratum* Stem Extract, *J. Ethnopharmacol.*, 2009, **122**(3), 445-449.

Chung Y. K., Lee K. K., Kim J. W., Durable Press and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabrics with a Citric Acid and Chitosan Treatment. *Textile Res. J.*, 1998, **68**(10), 772.

CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI Document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

Cueva C., Moreno-Arribas M. V., Martín-Alvarez P. J., Bills G., Vicente M. F., Basilio A., Rivas C. L., Requena T., Rodríguez J. M., Bartolomé B., Antimicrobial Activity of Phenolic Acids Against Commensal, Probiotic and Pathogenic Bacteria, *Res. Microbiol.*, 2010, **161**, 372–382.

Das K., Tiwari R. K. S., Shrivastava D. K., Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Productsas Antimicrobial Agent: Current Methods and Future Trends, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010, **4**(2), 104-111.

Das Neves J., Pinto E., Amaral M. H., Bahia M. F., Antifungal Activity of a Gel Containing *ThymusVulgaris* Essential Oil Against *Candida* Species Commonly Involved in Vulvovaginal Candidosis, *Pharmaceutical Biology*, 2009, **47**(2), 151-153.

Drasar, B. S., and M. J. Hill., Human intestinal flora, p. 36–43. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom, 1974.

Edmiston C., Schmitt A., Krepel C., Seabrook G., Impact of Triclosan-impregnated Suture on in Vitro Adherence of Nosocomial Surgical Pathogens. *Am. J. Inf. Conf.*, 2004, **32**, 108.

Ekor M., The Growing Use of Herbal Medicines: Issues Relating to Adverse Reactions and Challenges in Monitoring Safety, *Front. Pharmacol.*, 2013, **4**, 1– 10.

Elegir G., Kindl A., Sadocco P., Orlandi M., Development of Antimicrobial Cellulose Packing Through Laccase-mediated Grafting of Phenolic Compounds, *Enzyme Microb. Technol.*, 2008, **43**, 84–92.

Erol E., Özdiñç Ö., Kalebek N. A., Ameliyat İpliklerinin Özellikleri, *Electronic Journal of Textile Technologies*, 2014, **8**(3), 35-48.

Evans W. C., *Trease and Evans Pharmacognosy*, Harcourt Brace and company. Asia pvt. Ltd. Singapore, 1997.

Fleck T., Moidl R., Blacky A., et al., Triclosan-coated Sutures for the Reduction of Sternal Wound Infections: Economic Considerations. *Ann. Thorac. Surg.*, 2007, **84**, 232-236.

Fournomiti M., Kimbaris A., Mantzourani I., Plessas S., Theodoridou I., Papaemmanouil V., Kapsiotis I., Panopoulou M., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E. E., Alexopoulos A., Antimicrobial Activity of Essential Oils of Cultivated Oregano (*Origanum vulgare*), Sage (*Salvia officinalis*), and Thyme (*Thymus vulgaris*) Against Clinical Isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2015, **26**(1), 232-289.

Freddi G., Arai T., Colonna G. M., Boschi A., Tsukada M., Binding of Metal Cations to Chemically Modified Wool and Antimicrobial Properties of the Wool-metal Complexes. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, **82**, 3513.

Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M. P. M., New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Medicinal Research Reviews*, 2006, **26**(6), 747–66.

Fukutake M., Takahashi M., Ishida K., Kawamura H., Sugimura T., Wakabayashi K., Quantification of Genistein and Genistin in Soybeans and Soybean Products, *Food Chem. Toxicol.*, 1996, **34**, 457-461.

Gedikoğlu A., Sökmen M., Çivit A., Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* Essential Oils and Plant Extracts for Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Properties, *Food Sci Nutr.* 2019, **7**, 1704–1714.

Georgieva A., Dobрева A., Tzvetanova E., Alexandrova A., Mileva M., Comparative Study of Phytochemical Profiles and Antioxidant Properties of Hydrosols from Bulgarian *Rosa Alba* L. and *Rosa Damascena* Mill., *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2019, **22**(5), 1362-1371.

Ghafoor B., Ali M. N., Ansari U., Bhatti M. F., Mir M., Akhtar H., Darakhshan F., New Biofunctional Loading of Natural Antimicrobial Agent in Biodegradable Polymeric Films for Biomedical Applications, *International Journal of Biomaterials*, Volume 2016, Article ID 6964938, 1-9.

Gherman C., Culea M., Cozar O., Comparative Analysis of some Active Principles of Herb Plants by GS/MS, *Talanta*, 2000, **53**, 253.

Gibbons, S., Gray, A.I., *Isolation by planar chromatography*. In: *Natural Products Isolation*. R.J.P. Cannel, ed., Humana Press, New Jersey, 1998.

Giron, J. A., Qadri F., Jarvis K. J., Kaper J. B., Albert M. J., Monoclonal Antibodies Specific for the Bundle-forming Pilus of Enteropathogenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 4949–4952.

Goodall R., Levi A. A., Microchromatographic Method for the Detection and Approximate Determination of the Different Penicillins in a Mixture, *Nature*, 1946, **158**, 675–676.

Gradinarua A. C., Silionb M., Trifana A., Mirona A., Ana C., Aprotosoiaie. Helichrysum arenarium subsp. arenarium: Phenolic Composition and Antibacterial Activity Against Lower Respiratory Tract Pathogens, *Natural Product Research*, 2014, **28**(22), 2076–2080.

Grzelak, E. M., Majer-Dziedzic B., Choma, I. M., Pilorz, K. M., Development of a Novel Direct Bioautography–Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Positive Bacteria, *Bacillus subtilis*. *J. A.O.A.C. Int.* 2013, **96**, 386–391.

Gupta A., Kumar P., Goshain O., Rai A. K., Dwivedi J., High-performance Thin-Layer Chromatography Analysis for Simultaneous Quantifications of Phenolic Biomarkers in Oxalis corniculata L. Methanolic Fraction, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 2018, **31**, 327–331.

Hamburger M. O., Cordell G. A., A Direct Bioautographic Tlc Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity, *J. Nat. Prod.*, 1987, **50**(1), 19–22.

Handa S. S., Khanuja S. P. S., Longo G., Rakesh D. D., Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, International Centre for Science and High Technology, *Trieste*, 2008, 21–25.

Hasan m. M., Hossain A., Shamim A., Rahman M. M., Phytochemical and Pharmacological Evaluation of Ethanolic Extract of Lepisanthes rubiginosa L. Leaves, *B. M. C. Complementary and Alternative Medicine*, 2017, **17**, 496.

Haslam E., *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. 1st Edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1998.

Heatley N. G., A method for the Assay of Penicillin, *Biochem.J.*, 1944, **38**, 61–65.

Heleno S. A., Martins A., Queiroz M. J., Ferreira I. C., Bioactivity of Phenolic Acids: Metabolites Versus Parent Compounds: a review, *Food Chem.*, 2015, **173**, 501–513.

Herrman K., Flavonols and Flavones in Food Plants: a review, *J. of Food Technol.*, 1976, **11**, 433–448.

Hockett K. L., Baltrus D. A., Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds, *J. Vis. Exp.*, 2017, **119**, 550–564.

Howell J. J., Chlorhexidine and Suture Materials. *Br. Med. J.* 1965, **1**, 449–450.

Huang W. Y., Cai Y. Z., Zhang Y., Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for Cancer prevention, *Nutr. Cancer*, 2010, **62**, 1–20.

Humans A. L., Fuchs A., Direct Bioautography on Thin Layer Chromatograms as a Method for Detecting Fingitoxic Substances, *J. Chromatography*, 1970, **51**, 325–327.

Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Camporese A., Sosa S., In vivo Topical Anti-inflammatory and in Vitro Antioxidant Activities of Two Extracts of Thymus Satureioides Leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, **91**, 31–36.

Jamali C. A., El Bouzidi L., Bekkouche K., Lahcen H., Markouk M., Wohlmuth H., Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan Thymus species. *Chemistry & Biodiversity*, 2012, **9**, 1188–1197.

Jeffery E. H., Araya M., Physiological Effects of Broccoli Consumption, *Phytochemistry Reviews*, 2009, **8** (1), 283–298.

Jesionek W., Choma I. M., Majer-Dziedzic B., Malinowska I., Screening Bacterial and Radical Scavenging Properties of Chosen Plant Extracts Using Thin-layer Chromatography-Direct Bioautography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2014, **37**, 2882–2891.

Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., Choma, I. M., Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2015, **38**, 1147–1153.

Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., Choma, I. M., TLC–Direct Bioautography as a Method for Evaluation of Antibacterial Properties of Thymus Vulgaris L. and Salvia Officinalis L. essential Oils of Different Origin, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2017, **40**, 292–296.

Jozwiaka G. W., Majer-Dziedzic B., Jesionek W., Zielińska W., Waksmundzka-Hajnosa M., Thin-layer Chromatography: Direct Bioautography as a Method of Examination of Antimicrobial Activity of Selected Potentilla Species. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2016, **39**(5–6), 281–285.

Judzentiene A., Butkiene R., Chemical Composition of the Essential Oils of Wild Helichrysum arenarium (L.) with Differently Colored Inflorescences from Eastern Lithuania, *J. Essent. Oil Res.*, 2006, **18**, 80-83.

Keller R. B., Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources, Newyork, 2009.

Khoddami A., Wilkes M. A., Roberts T. H., Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, *Molecules*, 2013, **18**, 2328–2375.

King A., Young G., Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals, *J. of the American Dietetic Association*, 1999, **99**, 213-218.

Kohiyama C. Y., Yamamoto Ribeiro M. M., Mossini S. A., Bando E., da Silva Bomfim N., Nerilo S. B., Antifungal Properties and Inhibitory Effects Upon Aflatoxin Production of Thymus Vulgaris L. by Aspergillus Flavus Link, *Food Chemistry*, 2015, **173**, 1006–1010.

Kokate C. K., *Practical pharmacognosy*, 4 th edition, Vallabh Prakashan Publication, New Delhi, India, 1999.

Konate K., Mavoungou J. F., Lepengue A. N., et al., Antibacterial Activity Against β -lactamase Producing Methicillin and Ampicillin-resistants Staphylococcus aureus: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2012, **11**, 18.

Kovtun E. A., Plygan E. P., Gudz O. V., Sergeev V. P., Creation of Sutures with Antimicrobial Properties. *Fibre Chemistry*, 2000, **32**(4), 287-292.

Kumar N., Pruthi V., Potential Applications of Ferulic Acid From Natural Sources, *Biotechnol. Rep.*, 2014, **4**, 86–93.

Kumar N., Pruthi V., Goel N., Structural, Thermal and Quantum Chemical Studies of p-coumaric and Caffeic acids, *J. Mol. Struct.*, 2015, **1085**, 242–248.

Kumar N., Pruthi V., Structural Elucidation and Molecular Docking of Ferulic Acid from Parthenium Hysterophorus Possessing COX-2 Inhibition Activity, *3 Biotech*, 2015, **5**, 541–551.

Kumar N., Gupta S., Yadav T. C., Pruthi V., Varadwaj P. K., Goel N., Extrapolation of Phenolic Compounds as Multi-target Agents Against Cancer and Inflammation, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2019, **37** (9), 2355–2369.

Kumara N., Goelb N., Phenolic Acids: Natural Versatile Molecules with Promising Therapeutic Applications, *Biotechnology Reports*, 2019, **24**, 1 – 10.

Kutluk I., Aslan M., Orhan I. E., Özçelik B., Antibacterial, Antifungal and Antiviral Bioactivities of Selected Helichrysum Species, *South African Journal of Botany*, 2018, **119**, 252–257.

Lea A. G. H., Beech F. W., The Phenolics: Effect of Cultural Conditions, *J. of Sci. Food Agric.*, 1978, **29**, 496-499.

Leaper D., McBain A. J., Kramer A., et al., Healthcare Associated infection: Novel Strategies and Antimicrobial Implants to Prevent Surgical Site Infection. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 2010, **92**, 453-458.

Li Y., Kumar k. N., Dabkowski J. M., Corrigan M., Scott R. W., Nüsslein K., Tew N. G., New Bactericidal Surgical Suture Coating, *Langmuir*, 2012, **28**, 12134–12139.

Lowy F. D., Staphylococcus aureus Infections. *N. Engl. J. Med.*, 1998, **339**(8), 520-532.

Mabona U., Viljoen A., Shikanga E., Antimicrobial Activity of Southern African Medicinal Plants with Dermatological Relevance: from an Ethnopharmacological Screening Approach, to Combination Studies and the Isolation of a Bioactive Compound, *J.Ethnopharmacol.*, 2013, **148**, 45–55.

Mace M. D., Histichemical localization of phenols in healthy and diseased tomato roots, *Phytopathology*, 1963, **16**, 915-925.

Magaldi S., Mata-Essayag S., Hartungde Capriles C., Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing, *Int.J.Infect.Dis.*, 2004, **8**, 39–45.

Mahboubi M., Kazempour N., Khamechian T., Fallah M. H., Kermani M. M., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Rosa damascena Mill Essential Oil, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2011, **1**(1), 19-26.

Marston A., Hostettmann K., in: L. Bohlin, J.G. Bruhn (Eds.), *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.

Marston A., Thin-layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry, *Journal of Chromatography A*, 2011, **1218**, 2676–2683.

Masahiko I., Hara M., Fukino N., Kakizaki T., Morimitsu Y., Glucosinolate Metabolism, Functionality and Breeding for the Improvement of Brassicaceae Vegetables, *Breeding Science*, 2014, **64** (1), 48–59.

Matasyoh J. C., Maiyo Z. C., Ngure R. M., Chepkorir R., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Coriandrum sativum, *Food Chemistry*, 2009, **113**, 526–529.

Mayers D. L., Lerner S. A., Ouelette M., *Antimicrobial Drug Resistance C: Clinical and Epidemiological Aspects*, vol.2, Springer Dordrecht Heidelberg, London, 2009.

Medina I., Gallardo J. M., Gonzalez M. J., Lois S., Hedges N., Effect of Molecular Structure of Phenolic Families as Hydroxycinnamic Acids and Catechins on Their Antioxidant Effectiveness in Minced Fish Muscle, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 3889–3895.

Mendoza N., Silva E. M. E., Introduction to Phytochemicals: Secondary Metabolites from Plants with Active Principles for Pharmacological Importance 3. Basim, 2018.

Middleton Jr E., Kandaswami C., Theoharides T. C., The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer, *Pharmacol. Rev.*, 2000, **52**, 673–751.

Moghadam H. D., Sani A. M., Sangatash M. M., Inhibitory Effect of Helichrysum Arenarium Essential Oil on the Growth of Food Contaminated Microorganisms, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2014, **17**(5), 911-921,

Mori H., Kawabata K., Yoshimi N., Tanaka T., Murakami T., Okada T., Murai H., Chemopreventive Effects of Ferulic Acid on Oral and Rice Germ on Large Bowel Carcinogenesis, *Anticancer Res.*, 1999, **19**, 3775–3778.

Nagieb Z. A., El Gammal A. A., Grafting of Cellulose- thiocarbamate with Vinyl monomers: Antimicrobial activity, *J. Appl. Polym. Sci.* 1986, **31**, 179.

Najem W., El Beyrouthy M., Wakim L. H., Neema C., Ouaini N., Essential Oil Composition of Rosa Damascena Mill. from Different Localities in Lebanon, *Acta Botanica Gallica*, 2011, **158**(3), 365-373.

Ncube N. S., Afolayan A. J., Okoh A. I., Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methods and Future Trends, *African Journal of Biotechnology*, 2008, **7**(12), 1797-1806.

Nikhal S. B., Dambe P. A., Ghongade D. B., Goupale D. C., Hydroalcoholic Extraction of Mangifera Indica (leaves) by Soxhletion, *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **2**(1), 30-32.

Obermeier A., Schneider J., Föhr P., Wehner S., Kühn K. D., Stemberger A., Schieker M., Burgkart R., In vitro Evaluation of Novel Antimicrobial Coatings for Surgical Sutures Using Octenidine, *BMC Microbiology*, 2015, **15**, 186.

Obermeier A., Schneider J., Harrasser N., TuÈbel J., MuÈhlhofer H., PfoÈrringer D., et al., Viable Adhered Staphylococcus aureus Highly Reduced on Novel Antimicrobial Sutures Using Chlorhexidine and Octenidine to Avoid Surgical Site Infection (SSI), *Plos one*, 2018, **13**(1), 1-20.

Owens C. D., Stoessel K., Surgical Site Infections: Epidemiology, Microbiology and Prevention, *J Hosp Infect.*, 2008, **70**(2), 3–10.

Ozcana K., Dönmez I. E., Isparta Güneykent Bölgesinde Yetişen Gül Odununun (Rosa damascena Mill.) Kimyasal Bileşimi ve Lif Özellikleri, *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 2018, **19**(4), 442-446 .

Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R., Flavonoids: an Overview, *Journal of Nutritional Science*, 2016, **5**(47), 1-15

Pereira D. M., Valentao P., Pereira J. A., Andrade P. B., Phenolics: from Chemistry to Biology, *Molecules*, 2009, **14** (6), 2202–2211.

Pierpont W. S., Flavonoids in the Human Diet, In: Cody V., Middleton E. J., Harbry J. B., eds. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structur-Activity Relationship*, Newyork, 1986.

Prakash S., Ramasubburayan R., Ramkumar S. V., Kannapiran E., Palavesam A., Immanuel G., In Vitro— Scientific Evaluation on Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Properties and Phytochemical Constituents of Traditional Coastal Medicinal Plants, *Biomed. Pharm*, 2016, **83**, 648–657.

Radusiene J., Phenotypic Variation in *Helichrysum Arenarium* (L.) Moench from Natural Habitats, *Biologija*, 2002, **201**, 65-68.

Rancic A., Sokovic M., Vukojevic J., Simic A., Marin P., Duletic-Lausevic S., Djokovic D., Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Myrrhisodorata* (L.) Scop, *Hypericumperforatum* L and *Helichrysumarenarium* (L.) Moench, *Journal of Essential Oil Research*, 2005, **17**(3), 341-345.

Rasigade J. P., Vandenesch F., *Staphylococcus aureus*: a Pathogen with Still Unresolved Issues, *Infect. Genet. Evol*, 2014, **21**, 510-514.

Reinbold J., Uhde A., Müller I., Weindl T., Geis-Gerstorfer J., Schlensak C., Wendel H., Krajewski S., Preventing Surgical Site Infections Using a Natural, Biodegradable, Antibacterial Coating on Surgical Sutures, *Molecules*, 2017, **22**, 1570.

Saki N., Akin M., Atsay A., Karaoglu H. R. P., Kocak M. B., Synthesis and Characterization of Novel Quaternized 2,3- (Diethylmethylamino)Phenoxy Tetrasubstituted Indium and Gallium Phthalocyanines and Comparison of Their Antimicrobial and Antioxidant Properties with Different Phthalocyanines, *Inorg. Chem. Comm.*, 2018, **95**, 122–129.

Salamon I., Kryvtsova M., Bucko D., Tarawneh A. H., Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Some Essenial Oils After Their Industrial Large-scale Distillation, *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 2019, **8** (4), 984-988.

Sanchez G., Aznar R., Evaluation of Natural Compounds of Plant Origin for Inactivation of Enteric Viruses, *Food and Environmental Virology*, 2015, **7**, 183–187.

Scalas D., Mandras N., Roana J., Tardugno R., Cuffini A. M., Ghisetti V., Benvenuti S., Tullio V., Use of *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae), *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), and *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) Essential Oils and Their Main Components to Enhance Itraconazole Activity Against Azole Susceptible/not-susceptible *Cryptococcus Neoformans* Strains, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, **18**, 143.

Scossa F., Benina M., Alseekh S., Zhang Y., Fernie A. R., The Integration of Metabolomics and Next-Generation Sequencing Data to Elucidate the Pathways of Natural Product Metabolism in Medicinal Plants, *Planta Med.*, 2018, **84**, 855-873.

Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M., Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152-178.

Socaciu C., From Phytochemistry to Metabolomics: Eight Decades of Research in Plant and Food Science, *Studia U.B.B. Chemia*, 2019, LXIV(4), 205-224.

Sofy A. R., Hmed A. A., Sharaf A. M. A., El-DougDoug K. A., Preventative and Curative Effect of Moringa oleifera Aqueous Extract to Ensure Safe Natural Antimicrobials Targeting Foodborne Pathogens, *Arch. Clin. Microbiol.*, 2017, **8**(4), 51.

Sokovic M., Glamoclija J., Ciric A., Kataranovski D., Marin P. D., Vukojevic J., Brkic D., Antifungal Activity of the Essential oil of Thymus vulgaris L. and Thymol on Experimentally Induced Dermatomycoses, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2008, **34**(12), 1388-1393.

Stevanato R., Tedesco R., New Antibacterial Acrylic Fiber, *Chem. Fib. Int.*, 1998, **48**, 480.

Strack D., Phenolic metabolism, in: P.M. Dey, J.B. Harborne (Eds.), *Plant Biochemistry*, Academic, London, 1997.

Suleimana M. M., McGaw L. J., Naidoo V., Eloff N. J., Detection of Antimicrobial Compounds by Bioautography of Different Extracts of Leaves of Selected South African Tree Species, *Afr. J. Trad. Cam*, 2010, **7**(1), 64 – 78.

Szeremeta D., Knas M., Długosz E., Krzykała K., Mrozek-Wilczkiewicz A., Musioł R., Kowalska T., Ott P. G., Sajewicz M., Móricz A. M., Investigation of Antibacterial and Cytotoxic Potential of Phenolics Derived from Cistus incanus L. by Means of Thin-layer Chromatography-direct Bioautography and Cytotoxicity Assay, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2018, **41**(6), 349-357.

Tong S. Y., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G., Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, **28**(3), 603-661.

Vernin G., Poite J. C., GC/MS Analysis of Volatile Components of Everlasting (Helichrysum stoechas L.) Essential Oil, *J. Essent. Oil Res.*, 1998, **10**, 553-557.

Viju S., Thilagavathi G., Effect of Chitosan Coating on the Characteristics of Silk-braided Sutures, *Journal of Industrial Textiles*, 2011, **42**(3), 256-268.

Vinciguerra V., Rojas F., Tedesco V., Giusiano G., Angiolella L., Chemical Characterization and Antifungal Activity of Origanum vulgare, Thymus vulgaris Essential Oils and Carvacrol Against Malassezia Furfur, *Natural Product Research*, 2019, **33**(22), 3273-3277.

Wahle K. W., Brown I., Rotondo D., Heys S. D., Plant Phenolics in the Prevention and Treatment of Cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, **698**, 36–51.

Wolfender J. L., Rodriguez S., Hostettmann K., Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Screening of Plant Constituents, *J. of Chrom. A*, 1998, **794**, 299.

Wurtzel E. T., Kutchan T. M., Plant Metabolism, the Diverse Chemistry Set of the Future, *Science*, 2016, **353**, 1232-1236.

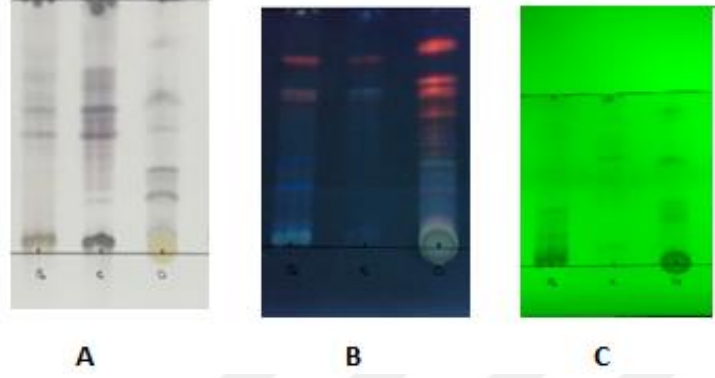
Zaidan M. R. S., Noor Rain A., Badrul A. R., Adlin A., Norazah A., Zakiah I., In vitro Screening of Five Local Medicinal Plants for Antibacterial Activity Using Disc Diffusion Method, *Tropical Biomedicine*, 2005, **22**(2), 165–170.

Zhiani R., Dolatabadi S., Imani H., Moradi M., Emrani S., A Comparison of the Chemical Composition of Flowering Shoot *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* by using GC-Mass and Antimicrobial Effects of the Bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2016, **19**(7), 1639-1647.

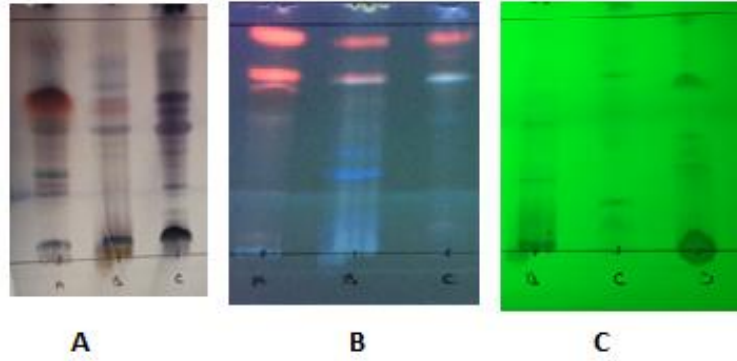


EK-A.

TLC Kromatogramları



Şekil A.1. Bitki ekstratlarının Klorobenzen: Amonyum hidroksit (%26) (90:10 v/v) mobil fazı ile türevlendirmesi. A; Anizaldehit ajanı, B; UV366 nm lamba altında, C; UV266 lamba altında.



Şekil A.2. Bitki ekstratlarının Etilasetat: hekzan (50:50 v/v) mobil fazı ile türevlendirmesi. A; Anizaldehit ajanı, B; UV366 nm lamba altında, C; UV266 lamba altında.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Saglam O., **Akin M.**, Karaoglu H. P., Saki N., Kocak M. B., Investigation of Time-Kill Evaluation and Antioxidant Activities of New Tetra-Substituted Metallophthalocyanines Bearing 4-(Trifluoromethoxy)thiophenyl Groups, *ChemistrySelect*, 2020, **5**, 2522 –2527.

Farajzadeh N., Karaoglu H. P., **Akin M.**, Saki N., Kocak M. B., Synthesis, Photophysical and Biological Properties of New Phthalocyanines Bearing Peripherally 4-(Trifluoromethoxy) phenoxy Groups, *ChemistrySelect*, 2019, **4**, 8998 –9005.

Akin M., Saki N., Antimicrobial, DPPH Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Activities of Thymus vulgaris, Helichrysum arenarium and Rosa damascena mill. Ethanol Extracts by Using TLC Bioautography and Chemical Screening Methods, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2019, **42**(7-8), 204-216.

Farajzadeh N., Karaoglu H. P., **Akin M.**, Saki N., Kocak M. B., Antimicrobial and Antioxidant Properties of Novel Octasubstituted Phthalocyanines Bearing (trifluoromethoxy) Phenoxy Groups on Peripheral Positions, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2019, **23**, 91–102.

Saki N., **Akin M.**, Alici E. H., Arabaci G., Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Wild Edible Mushroom Lepiota Procera Using Three-Phase Partitioning, *International Journal of Food Engineering*, 2018, **14**(9-10), 20170208.

Saki N., **Akin M.**, Glikoz Yağ Asidi Esterlerinin Bitkisel Bazlı Yenilebilir Yağların Termal Bozunmasına Etkisi, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2018, **8**(4), 171-179.

Guzel E., Saki N., **Akin M.**, Nebioglu M., Sisman I., Erdogmus A., Kocak M. B., Zinc and chloroindium complexes of furan-2-ylmethoxy substituted phthalocyanines: Preparation and investigation of aggregation, singlet oxygen generation, antioxidant and antimicrobial properties, *Synthetic Metals*, 2018, **245**, 127–134.

Alici E. H., Gunsel A., **Akin M.**, Bilgicli A. T., Arabaci G., Yarasir M. N., Synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial properties of non-peripherally and peripherally tetra-substituted phthalocyanines, *Journal of Coordination Chemistry*, 2018, **71**(19).

Saki N., **Akin M.**, Atsay A., Karaoglu H. P., Kocak M. B., Synthesis and characterization of novel quaternized 2, 3-(diethylmethylamino)phenoxy tetrasubstituted Indium and Gallium phthalocyanines and comparison of their antimicrobial and antioxidant properties with different phthalocyanines, *Inorganic Chemistry Communications*, 2018, **95**, 122–129.

Akin M., Saki N., Monopropylene glycol based heat transfer fluid: effects of green and synthetic corrosion inhibitors on copper and aluminum with ageing tests, *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 2018, **65**(1), 11-18.

Akin M., Tekin N., Preparation of Additive Package for Gear Lubricants and Determination of Tribological Properties, *Petroleum Chemistry*, 2016, **56**(2), 175–180.

Akin M., Nalbantoglu S., Cuhadar O., Uzun D., Saki N., Juglans regia L. extract as green inhibitor for stainless steel and aluminium in acidic media, *Res. Chem. Intermed.*, 2015, **41**, 899–912.

Akin M., Nalbantoglu S., Arabaci G., Saki N., Investigation of inhibitory effects of triazole derivatives on the protease enzymes, *Res. J. Biotech*, 2014, **9**(3), 19-23.

Akin M., Arabaci G., Saki N., Total Phenols, Antioxidant Potential and Tyrosinase Inhibitory Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Leaf, Husk and Seed, *Asian Journal of Chemistry*, 2013, **25**(16), 9337-9340.

Akin M., Nalbantoglu S., Saki N., Total phenols, antioxidant potential and tyrosinase inhibitory activity of honeybee collected pollen from Turkey, *Res. J. Biotech*, 2013, **8**(10), 15-18.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa AKIN İlk ve orta öğrenimini Bursa’da tamamladı. 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi Kimya bölümünden mezun oldu ve aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında TARIMSAN TARIM SAN. Ve TİC. A.Ş’de Kimyager olarak işe başladı. 2012 yılında Doç. Dr. Neslihan ŞAKİ danışmanlığında yüksek lisans eğitimini tamamladı ve yine aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Kimya Anabilimdalında Doktora eğitimine Doç. Dr. Neslihan ŞAKİ danışmanlığında başladı. 2016 yılında PETROYAĞ ve KİMYASALLAR SAN. Ve TİC. A.Ş’de AR-GE uzmanı olarak çalışmaya başladı. 2019 yılından beri aynı firmada AR-GE merkezi müdürü olarak çalışmaktadır. Evli ve bir kız çocuğu babasıdır.