

T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARS YÖRESİNDE ETNOBOTANİK OLARAK TÜKETİLEN BAZI
BİTKİLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tayfun BİLGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU

ŞUBAT - 2022

KARS



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**KARS YÖRESİNDE ETNOBOTANİK OLARAK TÜKETİLEN BAZI
BİTKİLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tayfun BİLGİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU

ŞUBAT - 2022

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğrencisi Tayfun BİLGİN'in Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU danışmanlığında Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “**Kars Yöresinde Etnobotanik Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

04/02/2022

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan : Doç Dr. Hacı Ahmet DEVECİ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU

Üye : Doç. Dr. Pinar AKSU KILIÇLE

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .. / .. / 20. . gün ve ...
... / sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fikret AKDENİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tayfun BİLGİN

04/ 02/ 2022

ÖZET

(Yüksek Lisans Tezi)

KARS YÖRESİNDE ETNOBOTANİK OLARAK TÜKETİLEN BAZI BİTKİLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tayfun BİLGİN

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU

Bu çalışmada 2019 yılında Kars'ın Arpaçay ilçesinden toplanarak satışa sunulan *Rumex patientia* L. (evelik), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (altın otu) ve *Achillea arabica* Kotschy (civan perçemi) bitkileri kullanıldı. Halk arasında yaygın olarak kullanılan ve çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için tüketilen bu bitkilerin antimikrobiyal etkinlikleri araştırıldı.

Çalışmada üç Gram-pozitif (*S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29219), sekiz Gram-negatif (*P.auriginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603, *E.coli* ATCC 35218, *E.coli* RSKK O23, *E.coli* RSKK O143, *E.coli* RSKK O164, *E.coli* RSKK O157:H7) bakteri kullanıldı. Bitkilerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek için metanol ekstraktları çıkartıldı ve Disk-difüzyon metodu tercih edildi. Metot uygulandıktan sonra zon çapları ölçüldü. Metanol ekstraktlarının test edildiği mikroorganizmalardan 11 tanesinden 10'unun en az bir bitkiye duyarlı olduğu görüldü. Duyarlı mikroorganizmalar tespit edildikten sonra minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, microplate okuyucu ile 600 nm'de tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre MİK değerleri 15,62 µg/ml ile 62,5 µg/ml arasında değişmektedir. *Rumex patientia* metanol ekstraktının *S.aureus* ATCC 25923 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Achillea arabica* metanol

ekstraktının *E.faecalis* ATCC 29219 üzerine en düşük dozda (31,25 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Helichrysum arenarium* metanol ekstraktının *E.coli* O23 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Achillea arabica* metanol ekstraktının *E.coli* O143 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, yine *Achillea arabica* metanol ekstraktının *E.coli* O164 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu belirlendi. *E.coli* O157:H7 üzerine etki eden tek bitkinin ise *Rumex patientia* olduğu görüldü. Diğer mikroorganizmalar üzerine etkileri karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Rumex patientia*, *Helichrysum arenarium*, *Achillea arabica*, antimikrobiyal, metanol ekstrakt

2022, 65 sayfa

ABSTRACT

(M. Sc. Thesis)

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SOME ETHNOBOTANICAL PLANTS IN THE KARS REGION

Tayfun BİLGİN

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Biology

Supervisor: Dr. Neslihan MUTLU

In this study, *Rumex patientia* L. (evelik), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench (altın otu) and *Achillea arabica* Kotschy (civan perçemi) plants collected from Arpaçay district of Kars in 2019 and offered for sale were used. The antimicrobial activities of these plants, which are widely used among the public and consumed for the treatment of various ailments, were investigated.

In the study, three Gram-positive (*S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29219), eight Gram-negative (*P.auriginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603, *E.coli* ATCC 35218, *E.coli* RSKK O23, *E.coli* RSKK O143, *E.coli* RSKK O164, *E.coli* RSKK O157:H7) bacteria were used. To determine the antimicrobial activities of the plants, metanol extracts were extracted and the disk-diffusion method was preferred. Zone diameters were measured after the method was applied. 11 of the microorganisms in which metanol extracts were tested, 10 were found to be susceptible to at least one plant. After detecting susceptible microorganisms, minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined at 600 nm by a microplate reader. According to the results obtained, MIC values vary between 15,62 µg/ml and 62,5 µg/ml. *Rumex patientia* metanol extract is the plant that acts on *S. aureus* ATCC 25923 at the lowest dose (15,62 µg/ml), while *Achillea arabica* metanol extract

has the lowest dose (31,25 µg/ml) on *E. faecalis* ATCC 29219. *Helichrysum arenarium* metanol extract is the plant that affects *E. coli* O23 at the lowest dose (15,62 µg/ml), while *Achillea arabica* metanol extract has the lowest dose (15,62 µg/ml) on *E.coli* O143. It was determined that *Achillea arabica* metanol extract was the plant that affected *E.coli* O164 at the lowest dose (15,62 µg/ml). *Rumex patientia* was the only plant that affected *E. coli* O157:H7. When the effects on other microorganisms were compared, it was seen that there was no significant difference.

Key Words: *Rumex patientia*, *Helichrysum arenarium*, *Achillea arabica*, antimicrobial, methanol extract

2022, 65 pages



ÖNSÖZ

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Neslihan MUTLU'ya, bitki ekstraktları konusunda tecrübesinden faydalandığımız Doç. Dr. Pınar Aksu KILIÇLE'ye ve bitki teşhisi ve kullanım alanlarıyla ilgili bilgilerini paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Gül Esmâ AKDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tayfun BİLGİN

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. İncelenen Bitkiler ve Medikal Özellikleri	3
1.2.1. <i>Rumex patientia</i> L.....	3
1.2.2. <i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench.....	5
1.2.3 <i>Achillea arabica</i> Kotschy	6
1.3. Kullanılan Bakteriler	8
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.3.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	9
1.3.3. <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.4. <i>Pseudomonas auriginosa</i>	10
1.3.5. <i>Klebsiella pneumonia</i>	10
1.4. Bitki Ekstraksiyon Yöntemleri.....	11

1.4.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri	11
1.4.2. Konvansiyonel Olmayan Ekstraksiyon Yöntemleri	13
1.5. Antimikrobiyal Özellik Çalışma Metotları.....	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. Materyal.....	21
2.1.1. Bitki Örnekleri	21
2.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar	21
2.2. Yöntem	22
2.2.1. Bitki Materyallerinin Hazırlanması	22
2.2.2. Antibiyogram Disklerinin Hazırlanması ve Disk Difüzyon Metodu.....	22
2.2.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	23
3. BULGULAR.....	26
3.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları	26
3.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Değerleri.....	27
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	29
5. KAYNAKLAR	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 1. <i>Rumex patientia</i> L.....	4
Resim 2. <i>H. arenarium</i> 'un Türkiye'deki Yayılışı	5
Resim 3. <i>Helichrysum arenarium</i>	6
Resim 4. <i>Achillea arabica</i> Kotschy	7
Resim 5. Bitki ekstraktları stokları	23
Resim 6. Hazırlanan mikroplateler	25
Resim 7. Oluşan bazı zon çapları	27



ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Farklı çözücüler kullanılarak bitkilerden elde edilen biyoaktif maddeler	13
Tablo 2. Disk difüzyonla oluşan zon çapları	27
Tablo 3. MİK değerleri.....	28



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C : Santigrad derece

µl : mikrolitre

ml : mililitre

mm : milimetre

DMSO : Dimetilsülfoksit

MİK : Minimal inhibitör konsantrasyonu

MBK : Minimal bakterisidal konsantrasyonu

NB : Nutrient Broth

MHA : Mueller Hinton Agar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Şifalı bitkiler hem geleneksel hem de modern tıbbın etkili bir kaynağını oluşturmaktadır. Bitki sekonder metabolitleri üzerine yapılan çalışmalar son 50 yılda artmıştır. Ayrıca, ilaç firmaları bu tür bitki bazlı formülasyonları dünya çapında çeşitli hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde kullanmaktadır (Inbaneson ve ark., 2012). Bitki materyallerinin faydalı tıbbi etkileri, tipik olarak bitkide bulunan sekonder metabolitlerin kombinasyonlarından kaynaklanır. Belirli bir bitkideki sekonder metabolitlerin kombinasyonları genellikle taksonomik olarak farklı olduğundan, bitkilerin tıbbi etkilerinin belirli bitki türlerine veya cinslerine özgü olması bu kavramla tutarlıdır (Wink, 1999). Bitki ikincil ürünleri tarihsel olarak bitki hücrelerinin inşası ve bakımı sürecinde hayati bir biyokimyasal rolü olmayan kimyasallar olarak tanımlanmış olsa da, son araştırmalar bu kimyasalların bitkilerin ekofizyolojisinde çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Buna göre, sekonder metabolitler hem patojen saldırısı ve bitkiler arası rekabete karşı koruyucu bir role hem de tozlayıcılar veya ortakyaşarlar gibi faydalı organizmalara karşı çekici bir role sahiptir (Kaufman ve ark, 1999; Wink ve Schimmer, 1999). İkincil ürünler bitkilerde çeşitli işlevlere sahip olabilese de, insanlar için potansiyel tıbbi etkileri de olabilir. Örneğin, mikrobiyal patojenlere karşı sitotoksosite yoluyla bitki savunmasında yer alan ikincil ürünler, çok toksik olmasalar da insanlarda antimikrobiyal ilaçlar olarak faydalı olabilir. Benzer şekilde, nörotoksin aktivitesi yoluyla otoburlara karşı savunmada yer alan ikincil ürünler, merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri aracılığıyla insanlarda faydalı etkilere sahip olabilir (antidepresanlar, yatıştırıcılar, kas gevşeticiler veya anestezipler olarak). Bu bağlamda, bazı bitkisel ikincil ürünler, etkilerini endojen metabolitlere, ligandlara, hormonlara, sinyal iletim moleküllerine veya nörotransmitterlere benzeterek gösterebilir ve bu nedenle potansiyel hedef bölgelerindeki (örneğin merkezi sinir sistemi, endokrin) benzerlikler nedeniyle insanlar üzerinde faydalı tıbbi etkilere sahiptir (Kaufman ve ark., 1999). Wink (1999) tarafından belirtildiği gibi, bu ürünler diğer organizmaların endojen yapılarıyla etkileşecek şekilde evrimleşmiştir ve bitki ikincil ürünleri ile diğer organizmaların endojen maddeleri arasındaki yapısal benzerliğin gelişimi “evrimsel moleküler modelleme” olarak adlandırılabilir.

Bitki türlerinin etnomedikal olarak insanlar tarafından değerlendirmelerinden sonra, farmakolojik olarak aktif bitki türevli bileşiklerin %70'inden fazlası keşfedilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteye sahip bitki kaynaklı bileşiklerde, büyük kimyasal çeşitlilik gözlemlenmektedir. Bu zengin çeşitlilik, geniş bir dizi mikroorganizmaya karşı gelişmiş savunma mekanizmaları için evrimsel seçim nedeniyle ortaya çıkmıştır (Simões ve ark., 2009). *Rumex* (Polygonaceae familyası) cinsine ait bitkiler geleneksel olarak mikrobiyal enfeksiyonlarla ilgili farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (dermatolojik problemler, dizanteri, enterit ve askariasis) (Camazine, 1986; Zhang ve ark., 2012; Vasas ve ark., 2015). Kars yöresinde de halkın sıklıkla kullandığı *Rumex patientia* L.'nin üst solunum yolu enfeksiyonlarına karşı tedavi edici olduğuna inanılmaktadır.

Helichrysum arenarium (L.) Moench, *Asteraceae* familyasına ait bir türdür. Başta Orta ve Doğu ülkeleri olmak üzere Avrupa kıtasında yaygın olarak geleneksel tıpta farklı patolojilerin tedavisinde kullanılmaktadır (Freire ve ark., 2015; Galbany-Casals ve ark., 2009). Farklı ülkelerde ortak kullanımları bildirilmiş bir türdür. Diüretik (Lourens ve ark., 2008), koloretik ve antiinflamatuvar özellikleri (Shikov ve ark., 2014) için kullanılmaktadır. Sarılık tedavisinde kullanımı da mevcuttur (Dragulescu, 2016). Yöre halkı tarafından böbrek rahatsızlıkları ve boğaz ağrıları için tüketilmektedir.

Achillea L. cinsi Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'ya özgü olsa da, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'da da bulunmaktadır (Rechinger, 1986). Türkiye'de 42 türü bulunan cinsin, 23 türü endemiktir (Duman, 2000). *Achillea* L. cinsine ait birçok tür tıbbi özelliklere sahiptir ve bazı ülkelerde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Bashi ve ark., 2012). Türkiye'de bazı *Achillea* türleri geleneksel olarak karın ağrısı (Honda ve ark., 1996), ishal (Yesilaada ve ark., 1993), yara iyileşmesi (Fujita ve ark., 1995) gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Besin olarak da tüketilen *Achillea* türleri, bu familyanın içerdiği flavonoidler ve terpenoidler sayesinde antimikrobiyal aktiviteye de sahiptirler (Panda, 2018). Yöre halkı tarafından diş ağrıları ve yara iyileşmesi için kullanılmaktadır.

Yapılan literatür taramalarında her üç bitkinin de antimikrobiyal özelliklerinin yeterince çalışılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada üç bitkinin de metanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği incelenmiştir.

1.2. İncelenen Bitkiler ve Medikal Özellikleri

1.2.1. *Rumex patientia* L.

Rumex, Polygonaceae familyasının en büyük ikinci cinsidir. Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika'da yayılış gösterse de esas yayılış bölgesi kuzey yarım küredir. Dünyanın bir çok yerinde *Rumex* cinsine ait bitkiler, yenilebilir oldukları için geleneksel tedavi amacıyla kullanılmıştır. (Vasas ve ark., 2015).

Medikal kullanımda daha çok kaynatma ve infüzyonlar kullanılmasına rağmen farklı kullanım şekilleri de mevcuttur. Örneğin *R. nepalensis*'in taze yaprakları, ısırğan otundan tahriş olan deriye sürülerek kullanılmaktadır (Gautam ve ark., 2010).

Avrupa'da özellikle, *R. acetosa*, *R. acetosella* (yaprak, hava parçaları, tohumlar), *R. alpinus* (kök), *R. confertus* (tohum), *R. crispus* (kökler, tohumlar) ve *R. obtusifolius* (hava parçaları) medical olarak çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Bu türler özellikle Macaristan ve Romanya'da kabızlık, ishal, böbrek rahatsızlıkları, şişlikler, döküntüler, yaralar ve saçkıran için ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır (Butura, 1979). Britanya ve İrlanda'da *R. acetosa* iskorbit, yaralar, siğiller, çürükler, sarılık tedavisi ve boğaz ağrısı için kullanılmaktadır. *R. hydrolapathum*, *R. conglomeratus* ve *R. palustris* de yine iskorbit için, kan temizleyici olarak, güneş yanıklarında ve kanser kürü olarak kullanılmaktadırlar. *R. obtusifolius* tohumları kaynatılarak, öksürük, soğuk algınlığı ve bronşite karşı kullanılmaktadır (Allen ve Hatfield, 2004). *Rumex alpinus* Bulgaristan ve Türkiye'de mide problemlerinde laksatif olarak kullanılmaktadır ve ishal, kabızlık ve egzamaya karşı da kullanılmaktadır (Štastná ve ark., 2010). Geleneksel Avusturya tıbbında da *Rumex alpinus* viral hastalıklar için kullanılmaktadır (Bogl ve ark., 2013). *R. nervosus* ise hipoglisemik, oftalmik antiseptik ve akne kürü olarak kullanılmaktadır. Yine, yaralar, kuduz, tifüs ve egzama için de kullanılmaktadır (Getie ve ark., 2003).

Türkiye'de *R. acetosella*'nin analjezik ve diüretik olarak, *R. scutatus*'un antipiretik olarak, *R. tuberosus* antihipertansif, idrar söktürücü ve kabızlık karşıtı ve yara iyileştirici olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (Cakılcıoğlu ve Türkoğlu, 2010). Yine ülkemizde *R. crispus* kabızlık için ve kan temizleyici olarak kullanılmaktadır (Başkan ve ark., 2007).

Aynı tür dünyanın başka bölgelerinde cilt hastalıkları, sarılık ve gastrointestinal rahatsızlıklar için de kullanılmaktadır (Shiwani ve ark., 2012).

Geleneksel Çin tıbbında da bazı *Rumex* türleri kullanılmaktadır. *R. dentatus* bir çok bakteriyel ve fungal enfeksiyona karşı kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2012). *R. hastatus* 'un öksürük, baş ağrısı ve ateşin tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009). *R. nepalensis*, *R. japonicus* ve *R. aquaticus* 'un da çeşitli geleneksel tadvilerde kullanıldığı bilinmektedir (Mei ve ark., 2009).

Rumex crispus Hindistan ve Pakistan da yara tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Pareek ve Kumar, 2014). Afrika'da *R. abyssinicus*, *R. usambarensis* ve *R. bequaertii* boğaz enfeksiyonların akarşı kullanılırken. *R. abyssinicus* su ekstraktı antidiyabetik, antihipertansif, diüretik ve analjezik olarak önerilmektedir (Mekonnen ve ark., 2010). *R. steudelii* Etiyopya'da antifertilite amaçlı kullanılmaktadır. Bitkinin kökleri diğer tıbbi bitkilerle birlikte hemoroid, yaralar, egzama vs. için kullanılmaktadır (Solomon ve ark., 2010).

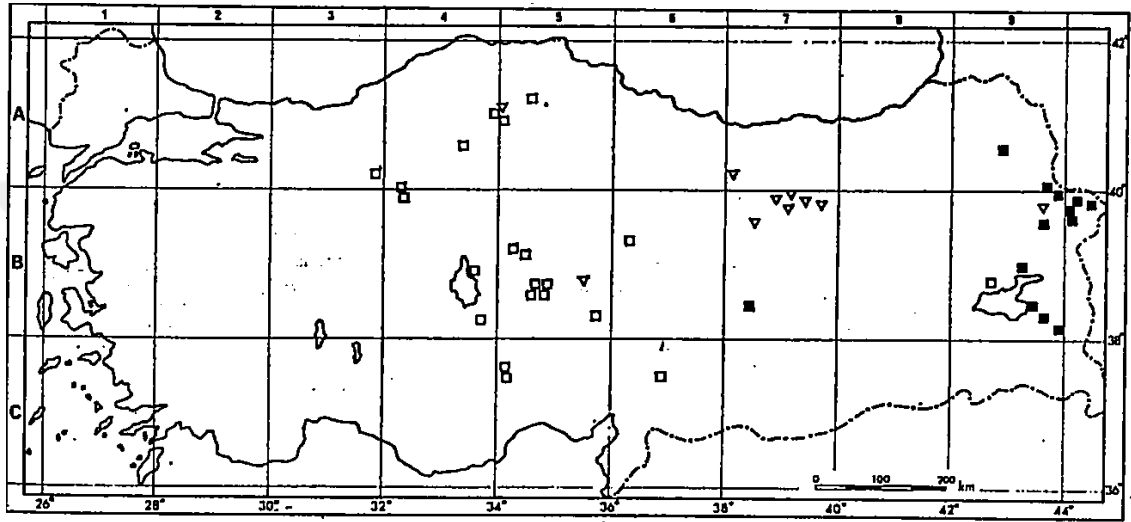
Polygonaceae familyasının bir üyesi olan *Rumex patientia* L., çok yıllık, boyu 2 metreye kadar uzayabilen ve Anadolu'da yaygın bir yayılış gösteren, 1050 m. yükseklikte yetişen çok yıllık bir bitkidir (Baytop, 1984). İçerdiği antrakinonlar ve tanenler nedeniyle tıbbi bir bitki olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Kuruüzüm, 1996). Flora of Turkey'de Anadolu'nun bir çok bölgesinin yanısıra Doğu Anadolu'da Kars-Susuz arasında 1080 m. yükseklikte yayılış gösterdiği belirtilen *Rumex patientia* L. (Davis, 1975), halk arasında "evelik" olarak bilinmektedir (Anonim). Kars ve çevresinde daha çok bulgur ya da pirinç ile hazırlanan çorbalara konularak tüketilmektedir. Halk arasında boğaz enfeksiyonlarına karşı koruyucu olduğuna inanılmaktadır (Anonim).



Resim 1. *Rumex patientia* L. (<https://kocaelibitkileri.com/rumex-patientia/#jp-carousel-23666>, 8 Ocak 2022)

1.2.2. *Helichrysum arenarium* (L.) Moench

Yunanca "Helios" (güneş) ve "chrysos" (altın) kelimelerinden türetilen *Helichrysum* kelimesi, bu cinsin göz alıcı sarı rengini ifade etmektedir (Maznev, 2004). *Helichrysum* cinsinin dünyada yaklaşık 600 kadar türü bulunmaktadır. Ülkemizde 20 türü bulunan cinsin, 14 türü ise endemiktir (Wichtl, 2004). Türkiye’de en çok bulunan türler ise *H. arenarium*, *H. armenium*, *H. graveolens* ve *H. plicatum*’dur (Tanker ve Sezik, 1978).



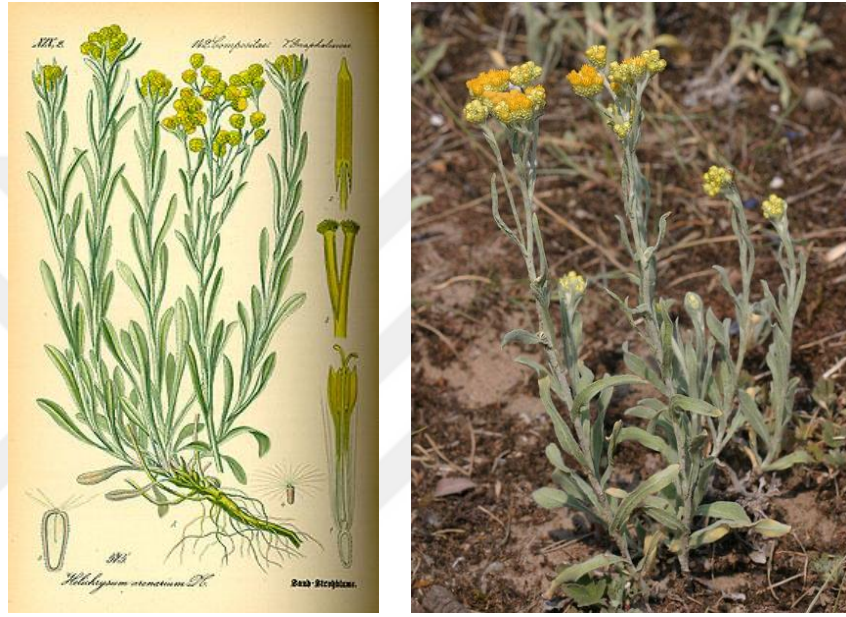
MAP 11 *Helichrysum arenarium* (15) □ subsp. *aucheri* ▽ subsp. *erzincanicum*
■ subsp. *rubicundum*.

Resim 2. *H. arenarium*'un Türkiye'deki Yayılışı (Davis, 1975)

Helichrysum cinsine ait bitkiler tüm dünyada yaklaşık iki bin yıldır tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu bitkiler geleneksel olarak süs bitkisi olarak, tıbbi ve gıda amaçlı kullanılmıştır (Antunes Viegas ve ar., 2014). Genel olarak infüzyon ve kaynatma yoluyla kullanılmaktadır. Örneğin; *H. stoechas* Moench infüzyonu geleneksel olarak çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Grip ve soğuk algınlığı, ateş, sinirlilik gibi rahatsızlıkların yanı sıra safra kesesi, idrar kesesi, sindirim ve pankreas sorunları için kullanılmaktadır (Benítez ve ark., 2010). *H. arenarium*'un infüzyon şeklinde hazırlanması ya da kaynatılarak sindirim problemleri (şişinlik, dolgunluk) için kullanılması Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır.

Günümüzde, Avrupa'da *Helichrysum arenarium* ve *Helichrysum italicum* çiçeklerinden hazırlanan infüzyonlar, safra düzenleyici ve idrar söktürücü etkileri nedeniyle

kullanılmaktadır (Litvinenko ve ark., 1992; Chinou ve ark., 1996). *H. arenarium*'un koleretik (safra üretimini arttıran ve hızlandıran), hepatoprotektif ve detoksifiye edici özellikleri Macaristan'da uzun süredir bilinmekte ve tıbbi amaçla uzun zamandır kullanılmaktadır. Altın otunun ilk terapötik kullanımları halk tıbbına dayanmaktaydı, fakat son zamanlarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da koleretik (Dombrowicz ve ark., 1994) ve hepatoprotektif (Skakun ve Stepanov, 1988) özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.



Resim 3. *Helichrysum arenarium* (<https://en.wikipedia.org/wiki/>)

1.2.3 *Achillea arabica* Kotschy

Achillea L. cinsi Asteraceae familyasına ait olup, 115 tür içermektedir. *Achillea* L. cinsi Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'ya özgü olsa da, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'da da bulunmaktadır (Rechinger, 1986). Türkiye'de 42 türü bulunan cinsin, 23 türü endemiktir (Duman, 2000). *Achillea* L. cinsine ait birçok tür tıbbi özelliklere sahiptir ve bazı ülkelerde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Bashi ve ark., 2012). Türkiye'de bazı *Achillea* türleri geleneksel olarak karın ağrısı (Honda ve ark., 1996), ishal (Yeşilada ve ark., 1993), yara iyileşmesi (Fujita ve ark., 1995) gibi farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Besin olarak da tüketilen *Achillea* türleri, bu familyanın içerdiği flavonoidler ve terpenoidler sayesinde antimikrobiyal aktiviteye de sahiptirler (Panda, 2018). Ayrıca bahçe ve peyzaj bitkileri olarak da kullanılmaktadırlar (Nikolic, 2015).

Achillea türlerinin antioksidan özelliği olduğu bilinmektedir. Antiproliferatif kapasite, antimikrobiyal ve antikanser aktivite ve terapötik amaçlar için kullanılmaktadır (Qader, 2018). Ayrıca birçok çalışma, *Achillea* türlerinin bitki içeriğinin coğrafi koşullara bağlı olarak değişebileceğini bildirmiştir. Rakım, iklim, gübreleme, toprak tipi ve toprağın mineral içeriği, çevresel faktörler veya çeşitli tarımsal uygulamalar ve kültür alanı gibi faktörler bu değişikliğe sebep olabilmektedir (Kaffash, 2020; Mottaghi, 2016). Bu durum bitkilerin biyolojik etkilerinin çeşitli koşullara bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir.

Ülkemizde geniş bir yayılımı olan hanzabel, civan perçemi ve eşek otu adlarıyla bilinen *Achillea arabica* Kars ve Susuz arasında da yayılım göstermektedir (<http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/>).



Resim 4. *Achillea arabica* Kotschy (<http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/>)

1.3. Kullanılan Bakteriler

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, kok şeklinde olan ve "üzüm benzeri" olarak tanımlanan kümeler halinde düzenlenme eğiliminde olan Gram pozitif bakterilerdir. Bu organizmalar %10'a kadar tuzda büyüyebilir ve koloniler genellikle altın sarısı renktedir (aureus altın veya sarı anlamına gelir). Bu organizmalar aerobik veya anaerobik olarak (fakültatif) ve 18 °C ile 40 °C arasındaki sıcaklıklarda büyüyebilir. Tipik biyokimyasal tanımlama testleri; katalaz pozitif (tüm patojenik *Staphylococcus* türleri), koagülaz pozitif (*Staphylococcus aureus*'u diğer *Staphylococcus* türlerinden ayırt etmek için), novobiyosine duyarlı (*Staphylococcus saprophyticus*'tan ayırt etmek için) ve mannitol fermentasyonu pozitif (*Staphylococcus epidermidis*'ten ayırt etmek için) tir (Rasigade ve Vandensch, 2014; Lowy, 1998).

Staphylococcus aureus, çok çeşitli klinik belirtilere neden olabilen önemli bir insan patojenidir. Enfeksiyonlar hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı olabilmektedir ve MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*) gibi çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle tedavi yönetimi çok zor olabilmektedir (CDC 2003; Boucher ve Corey, 2008). *S. aureus* çevrede bulunur ve çoğu sağlıklı bireyin derisinde ve mukozalarında (çoğunlukla burun bölgesinde) bulunan normal insan florasının da bir elemanıdır (Lowy, 1998) *S. aureus* normalde sağlıklı ciltte enfeksiyona neden olmaz; bununla birlikte, kan dolaşımına veya iç dokulara girmesine izin verilirse, bu bakteriler ciddi enfeksiyonlara neden olma potansiyeline sahiptirler (Lowy, 1998). Bulaşma tipik olarak doğrudan temasladır, ancak bazı enfeksiyonlar başka yollarla da bulaşabilmektedir (Rasigade ve Vandensch, 2014).

S. aureus enfeksiyonları insanlarda en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir ve bakteriyemi, enfektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (örneğin, impetigo, folikülit, fronküller, karbonküller, selülit, haşlanmış cilt sendromu ve diğerleri), osteomyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları, akciğer enfeksiyonları (örneğin, pnömoni ve ampiyem), gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Tong ve ark., 2015).

1.3.2. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar, Őu anda dŕnya çapında en yaygın çoklu ilaca dirençli hastane patojenleri arasında yer alan Gram pozitif, spor oluŐturmayan, fakŕltatif anaeroblardır (Gilmore ve ark., 2013). En sık izole edilen ũŕncŕ patojendir (Hidron ve ark., 2008) ve endokardit, sepsis, cerrahi yara enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilirler (Jett ve ark., 1994; Richards ve ark., 2000; Maki ve Agger, 1988). *Enterococcus* cinsi, 40 tŕrden oluŐur (Jett ve ark., 1994; Huycke ve ark., 1998), ancak enterokok enfeksiyonlarının yŕzde 90'ından fazlasına iki tŕr neden olur: *E. faecalis* ve *E. faecium* (Hidron ve ark., 2008; Maki ve Agger, 1988; Murray, 1990).

1.3.3. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesinin bir ũyesi olan *E. coli*, insan ve sıcak kanlı hayvanların gastrointestinal kanallarında bulunan en yaygın kommensal ve aynı zamanda en önemli patojenlerden biridir. Kommensal olarak, konakılarla karŐılıklı yarar sağlayan bir iliŐki içinde yaŐar ve nadiren hastalığa neden olur. Bununla birlikte, geniş bir hastalık yelpazesinden sorumlu olduğu için en yaygın insan ve hayvan patojenlerinden biridir. Patojenik suŐlarda spesifik virŕlans faktŕrlerinin tanımlanmasından önce, *E. coli* temel olarak O (lipopolisakkarit, LPS) ve H (flagellar) antijenlerinin serolojik tanımlanması temelinde sınıflandırıldırdırılmıŐtır. Mevcut virŕlans faktŕrünün tipine ve klinik semptomlara bağlı olarak, *E. coli* suşları patojenik tiplere ayrılır (patotipler, ortak bir hastalığa neden olan aynı tŕrden bir suŐ grubu olarak tanımlanır). Bağırsak patojenleri, kontamine yiyecek veya suyun yutulmasıyla, yani fekal-oral yolla bulaŐır. EPEC (enteropatojenik *E.coli*) suşları, hayvanlarda olduğu kadar, özellikle kŕtŕ hijyen koŐullarında özellikle çocuklarda ishale neden olur. Çalışmamızda kullanılan *E.coli* O23 suŐu bu gruba aittir. EHEC (enterohemorajik *E.coli*), hemorajik kolite veya HũS (hemolitik ũremik sendrom)'a neden olan tipik olarak gıda kaynaklı bir patojendir (Kaper ve ark., 2004) Tipik EHEC suşları, *Shigella dysenteriae* tarafından ũretilenlere benzer, Shiga benzeri toksinler (Shiga toksin ũreten *E. coli*, STEC olarak da adlandırılır) ũretir ve bu da onları bilinen en ldŕrŕcŕ ishale sebep olan suşlar yapar (Bilinski ve ark., 2012). Çalışmamızda kullanılan *E.coli* O157:H7 suŐu bu gruptadır.

EIEC (Enteroinvaziv *E.coli*), hem çocuklarda hem de yetişkinlerde sıklıkla sulu diyare ve bazen de dizanteri nedenidir (Kaper ve ark., 2004). Çalışmamızda kullanılan *E.coli* O143 ve *E.coli* O164 suşları ise bu gruptadır.

1.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa fırsatçı bir insan patojenidir ve nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili en yaygın gram negatif bakteridir. *P. aeruginosa*, hastane kaynaklı pnömoni vakalarının %16'sından, hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının %12'sinden, cerrahi yara enfeksiyonlarının %8'i ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının %10'undan sorumludur (Van Delden ve Iglewski, 1998). Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar arasında *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları, özellikle kritik hastalığı olan ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi bir sorundur (El Zowalaty ve ark., 2015) Antimikrobiyal direnç, ABD'de yılda toplam 51.000 hastane enfeksiyonuna neden olan kritik ve ölümcül bir sorun haline gelen *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavi seçeneklerini ciddi derecede kısıtlamaktadır (Fujii ve ark., 2015). Hemen hemen tüm klinik *P. aeruginosa* enfeksiyonu vakaları, konak savunmasının baskılandığı durumlarla ilişkilendirilebilir. Birçok *P. aeruginosa* enfeksiyonu vakası, AIDS hastalarında (Franzetti ve ark., 1992; Kielhofner ve ark., 1992) ve kemoterapi gören nötropenik hastalarda (Bendig, 1987) olduğu gibi immünosupresyon durumunda karşımıza çıkar. Böyle durumlarda *P. aeruginosa* enfeksiyonu hakkında bilgilendirici veriler elde etmek zordur. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu daha bilgilendirici insan hastalıklarından üçü şunlardır: 1) ciddi yanık durumlarında bakteriyemi; 2) kistik fibroz hastalarında kronik akciğer enfeksiyonu; ve 3) uzun süreli yumuşak kontakt lens kullanıcılarında akut ülseratif keratit (Jeffrey ve ark., 2000).

1.3.5. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae son zamanlarda ciddi enfeksiyonların sayısındaki artış ve etkili tedavilerin olmaması nedeniyle bulaşıcı bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Bu durum, ek genetik özellikler kazanmış ve hipervirülent (HV) veya antibiyotiğe dirençli *K. pneumoniae* suşlar nedeniyle ortaya çıkmıştır. *K. pneumoniae* ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında izole edilmiştir ve izole edildiğinde Friedlander bakterisi olarak bilinmekteydi (Friedlander, 1982; Merino ve ark., 1982). Toprak ve yüzey suları dahil olmak üzere

çevrede ve tıbbi cihazlarda yaşayan Gram negatif, kapsüllü, hareketsiz bir bakteridir (Bagley, 1985; Rock ve ark., 2014). *K. pneumoniae*, gastrointestinal (GI) yol ve orofarenks dahil olmak üzere insan mukozal yüzeylerini kolayca kolonize eder (Bagley, 1985; Dao ve ark., 2014). Bu bölgelerden *K. pneumoniae* suşları diğer dokulara girebilir ve insanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Tipik olarak, klasik *K. pneumoniae* suşları, diyabet veya kanser hastaları da dahil olmak üzere bağışıklığı baskılanmış bireyleri enfekte ederken, pnömoni, bakteriyemi veya menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olur (Tsay ve ark., 2002; Korvick ve ark., 1991).

1.4. Bitki Ekstraksiyon Yöntemleri

1.4.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitki materyallerinden biyoaktif bileşikler çeşitli klasik ekstraksiyon teknikleri ile ekstrakte edilebilir. Bu tekniklerin çoğu, kullanımda olan farklı solventlerin özütleme gücüne ve ısı ve/veya karıştırma uygulamasına dayanmaktadır. Bitkilerden biyoaktif bileşikler elde etmek için kullanılan mevcut klasik teknikler şunlardır:

1. Soxhlet ekstraksiyonu
2. Maserasyon
3. Hidrodistilasyon

Soxhlet ekstraktörü ilk olarak Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet (1879) tarafından tasarlandı. Esas olarak lipit ekstraksiyonu için tasarlanmıştır ama günümüzde sadece bununla sınırlı değildir. Soxhlet ekstraksiyonu çeşitli doğal örneklerden değerli biyoaktif bileşiklerin çıkarılması için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Genel olarak küçük bir miktarda kuru numune filtre kağıdından yapılmış bir yüksük içine konur. Yüksük özel çözücü içeren damıtma şişesine yerleştirilir. Çözücü ısıtılmaya başlanır. Bir taşma seviyesine ulaştıktan sonra, bir sifonla aspire edilir. Sifon çözücüyü damıtma şişesine geri gönderir. Bu solusyon çözünmüş maddeleri sıvı içine taşır. Çözünen maddeler distilasyon şişesinde kalır ve çözücü kuru bitki içeriğine geri döner. Süreç ekstraksiyon işlemi bitene kadar tekrar edilir (Azmir, 2013).

Maserasyon uzun yıllardır, evde tonik hazırlamak için kullanılan bir yöntemdir. Esansiyel yağlar ve biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi için popüler ve ucuz bir yöntemdir. Küçük ölçekli maserasyon ekstraksiyonunun bir kaç aşaması bulunmaktadır. Öncelikle, uygun çözücü ile yüzey temasını arttırmak için bitkiler küçük parçalara ayrılır. İkinci olarak, maserasyon için uygun olan çözücü bitki ile birlikte kapalı bir kaba konur. Üçüncü olarak sıvı süzülür fakat çözünmemiş katı içerik daha fazla solusyon kazanmak için preslenerek ezilir, süzülen içerikle karıştırılır ve tekrar filte edilerek süzülür. Maserasyonda ara sıra çalkalama yapmak işlem için iki yönden fayda sağlar; difüzyonu artırır, konsantre olmuş çözücünün daha iyi dağılmasını sağlar (Azmir, 2013).

Hidrodistilasyon, bitkilerden biyoaktif bileşikler ve uçucu yağ ekstraksiyonu için kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Organik çözücüler kullanılmaz ve bitki kurutulmadan yapılabilir. Üç tür hidrodistilasyon vardır; su damıtma, su ve buhar damıtma ve doğrudan buhar damıtma (Vankar, 2004). Hidrodistilasyonda öncelikle bitki materyali sabit olacak şekilde paketlenir. Yeterli miktarda su ilave edilir ve kaynamaya bırakılır. Alternatif olarak, bitki materyaline direkt olarak buhar da enjekte edilebilir. Bitki dokusunun biyoaktif bileşiklerini serbest bırakmak için sıcak su ve buhar ana görevi görülen faktörlerdir. Dolaylı su ile soğutma, suyun buhar karışımını ve yağı yoğunlaştırır. Yoğunlaştırılmış karışım, yoğunlaştırıcıdan bir ayırıcıya akar, burada yağ ve biyoaktif bileşikler sudan otomatik olarak ayrılır (Silva ve ark., 2005). Hidrodistilasyon üç ana fizikokimyasal süreç içerir; Hidrodifüzyon, hidroliz ve ısı ile ayrışma. Yüksek ekstraksiyon sıcaklığında bazı uçucu bileşenler kaybolabilir. Bu dezavantaj, hidrodistilasyonun termo kararsız bileşikler için kullanımını sınırlar. Herhangi bir geleneksel yöntemin ekstraksiyon verimliliği esas olarak çözücü seçimine bağlıdır (Cowan, 1999). Tablo 1’de kullanılan çözücüler ve elde edilen içeriklerin kısa bir özeti bulunmaktadır.

Tablo 1. Farklı çözücüler kullanılarak bitkilerden elde edilen biyoaktif maddeler (Cowan, 1999)

Su	Etanol	Metanol	Kloroform	Diklorometan	Eter	Aseton
Antosiyaninler	Taninler	Antosiyaninler	Terpenoidler	Terpenoidler	Alkoloidler	Flavonoidler
Taninler	Polifenoller	Terpenoidler	Flovonoidler		Terpenoidler	
Saponinler	Flavonoller	Saponinler				
Terpenoidler	Terpenoidler	Taninler				
	Alkoloidler	Flavonlar				
		Polifenoller				

1.4.2. Konvansiyonel Olmayan Ekstraksiyon Yöntemleri

Konvansiyonel ekstraksiyonun bazı zorlukları bulunmaktadır. Uzun ekstraksiyon süresi, maliyeti, yüksek saflıkta solvent gereksinimi, büyük miktarda çözücünün buharlaşması, düşük ekstraksiyon seçiciliği ve termo kararsız bileşikler için uygun olmamaları bunlar arasında sayılabilir (Luque de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998). Bu sınırlamaları aşmak için geleneksel ekstraksiyon yöntemleri dışında, yeni ve gelecek vaat eden ekstraksiyon teknikleri tanıtılmaktadır. Bu teknikler geleneksel olmayan teknikler olarak adlandırılır. En umut verici olanlardan bazıları; ultrason destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, darbeleri elektrik alan destekli ekstraksiyon, süper kritik sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı çıkarmadır. Bu tekniklerden bazıları belirlenen standartlara uygun oldukları için Çevre Koruma Ajansı, ABD tarafından, “yeşil teknikler” olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemler, daha az tehlikeli kimyasalların sentezlendiği, daha güvenli kimyasalların, güvenli solvent yardımcılarının kullanıldığı, enerji verimliliğinin sağlandığı, yenilenebilir hammadde kullanılabilen, bozunmayı önleyecek tasarımı olan ve kirliliğin önlendiği, kazaların minimuma

indirildiği yöntemler olarak kabul edilmektedir (http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html).

Ultrason destekli ekstraksiyonda (UAE), insanın duyma yeteneğinin ötesinde, ultrason adı verilen ses dalgaları kullanılmaktadır. Bu metotta 20 kHz ila 100 MHz ses dalgaları kullanılmaktadır. Diğer dalgalarda olduğu gibi, ortamdan geçerken sıkıştırma ve genişleme oluşturarak geçer. Bu fenomene kavitasyon adı verilir ve baloncukların üretildiği, büyüdüğü ve kollapse olduğu bir süreçtir. Suslick ve Doktycz (1990)'e göre hareketin kinetik enerjisinin, balonun içindekileri ısıtmaya dönüştürülmesinden büyük miktarda enerji üretilebilir. Sadece sıvı ve sıvı içeren katı maddeler kavitasyon etkisine sahiptir. UAE'nin ana faydası katı bitki örneğinde uygulanabilmesidir, çünkü ultrason enerjisi bitki matrisinden organik ve inorganik bileşiklerin sızmasını kolaylaştırır (Herrera ve Luque de Castro, 2005). Muhtemel mekanizma, kütle transferinin ultrasonla yoğunlaştırılması ve çözücünün bitki hücrelerine hızlandırılmış erişimidir. Ultrason ile ekstraksiyon mekanizması, (a) hücre duvarı boyunca difüzyon ve (b) duvarları kırdıktan sonra hücre içeriğinin durulanması olmak üzere iki ana fiziksel fenomen tipini içerir (Mason ve ark., 1996).

UAE'nin avantajları arasında ekstraksiyon süresinden, enerjiden ve solvent kullanımından tasarruf yer alır. Ekstraksiyon için ultrason enerjisi daha etkili karıştırma, daha hızlı enerji transferi, azaltılmış termal gradyanlar ve ekstraksiyon sıcaklığı, seçici ekstraksiyon, azaltılmış ekipman, ekstraksiyon kontrolüne daha hızlı yanıt, hızlı başlatma ve üretim artışı yer alır (Chemat ve ark., 2008).

Darbeleri elektrik alan ekstraksiyonunun (Pulse-electric field/PEF) çalışma ilkesi, ekstraksiyonu artırmak için hücre zarı yapısını yok etmektir. Canlı bir hücrenin elektrik alanında asılı kalması sırasında, o hücrenin zarından bir elektrik potansiyeli geçer. Membran moleküllerinin doğasına bağlı olarak, elektrik potansiyeli molekülleri yüklerine göre ayırır. Yaklaşık 1 V'luk bir transmembran potansiyeli kritik değeri aşıldıktan sonra, zarın zayıf bölgelerinde gözenekler oluşturan yüklü moleküller arasında itme meydana gelir ve bu da geçirgenlikte ciddi bir artışa neden olur (Bryant ve Wolfe, 1987).

Genellikle, bitki materyallerinin PEF işlemi için üstel bozunma darbelerine sahip basit bir devre kullanılır. Bu devre bitki materyallerinin yerleştirildiği iki elektrottan oluşan bir

arıtma odasına sahiptir. Arıtma odasının tasarımına bağılı olarak PEF süreci, sürekli veya kesikli modda çalışabilir (Puértolas ve ark., 2010). PEF işleminin etkinliği, alan gücü, enerji girişı, darbe sayısı, işlem sıcaklığı ve işlenecek malzemelerin özellikleri dahil olmak üzere çeşitli parametrelere bağılıdır (Heinz ve ark., 2003).

PEF, ekstraksiyonu arttırmak ve ekstraksiyon süresini azaltmak için bitki materyallerinin membran yapısını tahrip ederek ekstraksiyon sırasında kütle transferini artırır. Hücre zarı geçirgenliğini arttırarak bitki dokusundan hücre içi bileşiklerin salınması için uygulanmıştır (Toepfl ve ark., 2006). İlimlı bir elektrik alanında (500 ve 1000 V/cm) muamelenin, bitki hücre zarına küçük bir sıcaklık artışı ile zarar verdiği bulunmuştur (Fincan ve Dejmek, 2002; Lebovka ve ark., 2002). Bu nedenle PEF, ısıya duyarlı bileşiklerin bozunmasını en aza indirebilir (Ade-Omowaye ve ark., 2001). PEF, geleneksel ekstraksiyondan önce bir ön arıtma prosesi olarak da bitki materyallerine uygulanabilir (López ve ark., 2009).

Bitki matrislerindeki bazı fitokimyasallar hücre sitoplazmasında dağılır ve bazı bileşikler, rutin bir ekstraksiyon işleminde bir çözücü ile erişilemeyen hidrojen veya hidrofobik bağı ile polisakkarit-lignin ağında tutulur. Enzim destekli ekstraksiyon (EAE), bağılı bileşikleri serbest bırakmanın ve toplam verimi arttırmanın yeni ve etkili bir yolu olarak kabul edilmiştir (Rosenthal ve ark., 1996). Ekstraksiyon sırasında selüloz, a-amilaz ve pektinaz gibi spesifik enzimlerin eklenmesi, hücre duvarını kırarak ve yapısal polisakkaritleri ve lipid gövdelerini hidrolize ederek geri kazanımı arttırır (Singh, 1999).

Enzim destekli ekstraksiyon için iki yaklaşım vardır: enzim destekli sulu ekstraksiyon (EAAE) ve enzim destekli soğuk presleme (EACP) (Latif ve Anwar, 2009). Genellikle, EAAE yöntemleri temel olarak çeşitli tohumlardan yağların ekstraksiyonu için geliştirilmiştir (Hanmoungjai ve ark., 2001; Rosenthal ve ark., 1996.; Sharma ve ark., 2002). EACP tekniğinde, tohum hücre duvarını hidrolize etmek için enzimler kullanılır (Concha ve ark., 2004). Enzim bileşimi ve konsantrasyonu, bitki materyallerinin partikül boyutu, katı/su oranı ve hidroliz süresi gibi çeşitli faktörler ekstraksiyon için anahtar faktörler olarak kabul edilmektedir (Niranjan ve Hanmoungjai, 2004). Dominguez ve arkadaşları (1995), bitki materyallerinin nem içeriğinin de enzimatik hidroliz için önemli bir faktör olduğunu bildirmiştir. Bhattacharjee ve arkadaşları (2006), toksik olmayan ve yanıcı olmayan özelliklerinden dolayı EACP'yi yağlı tohumlardan biyoaktif bileşenleri

çıkarmak için ideal bir alternatif olarak tanımlamıştır. Enzim destekli yöntemlerle ekstrakte edilen yağın, hekzan ile ekstrakte edilmiş yağa göre daha yüksek miktarda serbest yağ asidi ve fosfor içerdiği bulunmuştur (Dominguez ve ark., 1995). EAE, organik kimyasallar yerine çözücü olarak su kullandığından, biyoaktif bileşiklerin ve yağın ekstraksiyonu için çevre dostu bir teknoloji olarak kabul edilmektedir (Puri ve ark., 2012).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), mikrodalga enerjisi kullanılarak çok çeşitli materyallerden ürünlerin ekstraksiyonu için yeni bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Paré ve ark., 1994). Mikrodalgalar, 300 MHz ila 300 GHz frekans aralığındaki elektromanyetik alanlardır. Elektrik alan ve manyetik alan gibi birbirine dik iki salınım alanından oluşurlar. Mikrodalgaların ısıtma prensibi, polar malzemeler üzerindeki doğrudan etkilerine dayanmaktadır (Letellier ve Budzinski, 1999). Elektromanyetik enerji, iyonik iletim ve dipol döndürme mekanizmalarını takiben ısıya dönüştürülür (Jain, 2009). İyonik iletim mekanizması sırasında, ortamın iyon akışına karşı direnci nedeniyle ısı üretilir. Öte yandan iyonlar yönlerini sık sık değişen alan işaretleri boyunca tutarlar. Bu sık yön değişikliği, moleküller arasında çarpışmaya neden olur ve sonuç olarak ısı üretilir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyonun ekstraksiyon mekanizmasının Alupului (2012) tarafından açıklanan üç ardışık adımı içerdiği varsayılmaktadır; birincisi, artan sıcaklık ve basınç altında numune matrisinin aktif bölgelerinden çözünenlerin ayrılması, ikincisi, çözücünün numune matrisi boyunca difüzyonu, üçüncüsü, numune matrisinden çözücüye çözünenlerin salınması. MAE'nin çeşitli avantajları Cravotto ve arkadaşları (2008) tarafından, bitki materyallerinden biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için daha hızlı ısıtma, azaltılmış termal gradyanlar, azaltılmış ekipman ve artan ekstrakt verimi olarak sıralanmıştır. MAE, biyoaktif bileşikleri daha hızlı özütleyebilir ve geleneksel özütleme işlemlerinden daha iyi bir geri kazanım mümkündür. Daha sağlam olan organik ve organometalik bileşikleri çıkarmak için seçici bir tekniktir. MAE, organik çözücü kullanımını azalttığı için yeşil teknoloji olarak da bilinmektedir (Alupului, 2012).

Basıncılı sıvı ekstraksiyonunu (PLE), ilk olarak 1996'da Richter ve arkadaşları tanımlamıştır (Richter, 1996). Bu yöntem, basıncılı akışkan ekstraksiyonu (PFE), hızlandırılmış sıvı ekstraksiyonu (ASE), geliştirilmiş solvent ekstraksiyonu (ESE) ve yüksek basıncılı solvent ekstraksiyonu (HSPE) gibi isimlerle de bilinmektedir (Nieto ve

diğerleri, 2010). PLE, solvent sıvısının normal kaynama noktalarının ötesinde kalması için yüksek basınç uygulanan bir yöntemdir. Yüksek basınç, ekstraksiyon işlemini kolaylaştırır. Otomasyon teknikleri, kısa ekstraksiyon süresi ve az çözücü gereksinimi PLE'nin avantajlarındandır. PLE tekniği, daha hızlı ekstraksiyon sağlayan yüksek basınç ve sıcaklık kombinasyonu nedeniyle az miktarda çözücü gerektirir. Daha yüksek ekstraksiyon sıcaklığı, hem çözünürlüğü hem de kütle transfer oranını artırarak daha yüksek analit çözünürlüğünü destekleyebilir ve ayrıca solventlerin viskozitesini ve yüzey gerilimini azaltarak ekstraksiyon hızını iyileştirebilir (Ibañez ve ark., 2012).

Geleneksel soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, PLE'nin zaman tüketimini ve solvent kullanımını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Richter ve ark., 1996). Ek olarak, az miktarda organik çözücü kullanımı nedeniyle PLE, yeşil teknolojiler arasında yer almaktadır (Ibañez ve ark., 2012).

Süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE) Hannay ve Hogarth (1879) tarafından keşfedilmiştir, ancak Zosel, SFE kullanılarak kahvenin kafeinsizleştirilmesi için bir patent almıştır (Zosel, 1964). Bu tarihten günümüze kadar süper kritik akışkan tekniği büyük bir ilgi görmüş ve çevresel, farmasötik ve polimer uygulamalarında ve gıda analizlerinde başarıyla kullanılmıştır (Zougagh ve ark., 2004). Birkaç endüstri, özellikle kafeinsiz kahve hazırlama endüstrileri bu tekniği uzun yıllardır kullanmaktadır (Ndiomu ve Simpson, 1988). Her maddenin katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç temel hali vardır. Süperkritik durum ayırt edici bir durumdur ve bir madde kritik noktasının ötesinde sıcaklık ve basınca maruz kaldığında elde edilebilir. Kritik nokta, üzerinde belirgin gaz ve sıvı fazların bulunmadığı karakteristik sıcaklık (T_c) ve basınç (P_c) olarak tanımlanır (Incedy ve ark., 1998). Süper kritik durumda, gaz ve/veya sıvının belirli özellikleri kaybolur, bu da süper kritik akışkanın sıcaklık ve basınç değiştirilerek sıvılaştırılamayacağı anlamına gelir. Süper kritik akışkan, gaz benzeri difüzyon, viskozite ve yüzey gerilimi özelliklerine ve sıvı benzeri yoğunluk ve çözme gücüne sahiptir. Bu özellikler, bileşikler kısa sürede daha yüksek verimlerle ekstrakte etmeye uygun hale getirir (Sihvonen ve ark., 1999).

1.5. Antimikrobiyal Özellik Çalışma Metotları

Patojen bakterilerin ya da diğer mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklardan kurtulabilmek için bu mikroorganizmaların canlıdan uzaklaştırılması ya da öldürülmesi gerekmektedir. Bu sebeple bakterilere karşı antibiyotikler kullanılır. Antibiyotiklerin yapısı, etki ettikleri grup, ajanların bu maddeye duyarlılığı ya da direnci gibi etmenler antimikrobiyal çalışmaların önemli unsurudur. Antimikrobiyal ilaçların hastalık etkenine karşı statik ya da sidal veya her iki etkinin nasıl olduğu çok iyi anlaşılmalıdır. Hastalık ajanlarının da sürekli olarak antimikrobiyal ilaçlara karşı kazandıkları dirençten kaynaklı olarak yeni antimikrobiyal madde çalışmaları yapılmaktadır (<http://www.mikrobiyoloji.org/>; Yıldırım, 2010). Antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmalar üzerinde duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan yöntemlerden biri sıvı dilüsyon yöntemidir. Sıvı dilüsyon yönteminde amaç kullanılan antimikrobiyal maddenin dilüsyonlarının mikroorganizmalara olan etkisini belirlemektir. Kullanılan antimikrobiyal maddenin bakteriler üzerinde etkili olduğu konsantrasyonları ile MİK (Minimal inhibitör konsantrasyon) ve MBK (Minimal Bakterisidal konsantrasyon) değerleri belirlenir (Turhan, 2014; <http://www.tmc.dergisi.org/>). MİK, 24 saat inkübasyondan sonra bir mikroorganizmanın gözlenebilir büyümesi üzerinde tam bir inhibisyon sağlayacak olan antibakteriyel bir maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. MİK değeri organizmaların antibakteriyel maddelere karşı duyarlılığını tespit etmek için “altın standart” olarak düşünülmektedir. Bu nedenle, diğer tüm duyarlılık test yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmek için kullanılır. MBK, bakteriyel inokülumların %99,9’ unu öldüren antibakteriyel maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. MİK, antibakteriyel maddenin bakteri üremesi üzerindeki inhibisyon etkisi olduğu için, antibakteriyel madde çıkarıldığı takdirde bakterilerin tekrar büyümeye başlaması mümkündür. Antibakteriyel maddenin bakterileri öldürme yeteneğini bulmak için bir büyüme testi yapılabilir ve bu test MBK olarak adlandırılır (Kaya, 2011). Sıvı dilüsyon yöntemi makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olmak üzere iki şekilde yapılır. Makrodilüsyonda 13×100 mm tüpler kullanılırken mikrodilüsyonda steril ve plastik olan mikrodilüsyon plakları kullanılır (<http://www.tmc.dergisi.org/>). Makrodilüsyon testi için inokülüm hazırlanırken doğrudan koloni süspansiyonu ya da buyyon kültürü yöntemleri kullanılır. Doğrudan koloni süspansiyonunda 18-24 saatlik agar plağından koloniler alınır, süspansiyonun bulanıklığı

0.5 McFarland bulanıklığa eşdeğer olacak şekilde ayarlanır. Bu ayarlama fotometrik cihaz ya da gözle yeteri kadar ışığın olduğu ortamda 0.5 McFarland tüpü ile karşılaştırılarak yapılabilir. Buyyon kültürü yönteminde ise kolonilerin direk olarak süspansiyon edilemediği ya da 24 saatlik kolonilerin olmadığı durumlarda ikinci bir seçenek olarak kullanılabilir. Alınan bakteriler “triptik soy buyyon” gibi bir besiyerine aktarılır ve 0.5 McFarland standardına gelinceye kadar inkübe edilir. Bu standart ölçümü yine fotometrik bir cihaz ile ya da gözle 0.5 McFarland tüpü ile karşılaştırılarak yapılır. Sıvı dilüsyon yönteminde Mueller-Hinton Sıvı besiyeri kullanılır. Hazırlanan inokülumlara antimikrobiyal madde dilüsyonları eklenir ve inkübasyona bırakılır. Kontrol amaçlı hazırlanan inokülumlardan agara ekim yapılarak eş zamanlı inkübasyona bırakılmalıdır. Mikrodilüsyonda ise inokülüm makrodilüsyondaki gibi hazırlanır ve mikrodilüsyon plaklarına uygun oranlarda besiyeri ile inokülüm dağıtıcı bir alet ya da pipet yardımı ile dağıtılır. Mikrodilüsyon plakları kurumayı önlemek için plastik bir kapak ya da torba ile kapatılır. Hazırlanan plaklar 35°C’de 16-20 saat inkübasyona bırakılır. Sonuçlar değerlendirilirken makrodilüsyon ve mikrodilüsyonda üremenin olmadığı MİK değeri belirlenir (<http://www.tmc.dergisi.org/>). MİK değer sıvı dilüsyonda belirlendiği gibi agar dilüsyon yöntemi ile de belirlenebilir. İkisinin de prensibi aynıdır. Fark olarak agar dilüsyon yönteminde belirlenen antimikrobiyal madde belirli konsantrasyonlarda agarın içine agar henüz donmamış iken karıştırılır. Agar dilüsyon yönteminde Mueller-Hinton Agar kullanılır. Agar donmaya başlamadan, içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde ve 3-4 mm derinliğinde olacak şekilde petri kaplarına dökülür. Kontrol için antimikrobiyal madde içermeyen bir plak hazırlanır. İnokülüm yine 0.5 McFarland olacak şekilde hazırlanır. İnokülümden agara transfer edilecek bakteri yoğunluğu 10⁴ CFU/ml olacak şekilde sıvı besiyeri ile sulandırılır. İnokülümün agara ekiminden sonra 35±2 °C sıcaklıkta 16-20 saat inkübe edilir. İnkübandan sonra MİK değerinin belirlenmesi için koyu renkli ve ışığı yansıtmayan bir yüzey üzerinde plaklar incelenir. Üremenin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olan konsantrasyon olarak belirlenir. MİK konsantrasyonunda kontrol grubuna göre %80 oranında üremede azalma gözlenmesi gerekmektedir (Turhan, 2015; <http://www.klimik.org.tr/>; Sümerkan ve Gökahmetoğlu, 1998). Aleksander Flemming’in 1928 yılında antibiyotiği keşfi tıp tarihinde bir dönüm noktası olmuştur. Antimikrobiyal bileşiklerin keşfinden sonra infeksiyöz hastalıkların bu bileşiklerle elimine edilebileceği düşünülmüştür (Jongersen ve Turnidge, 2007). Ne yazık

ki bu antimikroyal maddelere direnç gelişimi bu iyimserliği azaltmıştır ve çeşitli antibiyotiklere dirençli ve duyarlı bakterileri belirlemek için, günümüzde hala altın standart kabul edilen yöntemlerden broth dilüsyon yöntemi zaman alıcı olduğu için daha kısa sürede sonuç alınabilen disk difüzyon yöntemi geliştirilmiştir (Kirby ve ark, 1957). 1956'da, W. M. M. Kirby ve meslektaşları Washington Üniversitesi Tıp Fakültesi, King County Hastanesinde, antimikrobiyal duyarlılık için tek bir disk yöntemi belirlendi (Winn ve ark., 2006). Bu yöntemdeki standardizasyon problemleri 1960'ların başına kadar devam etmişti. Kirby ve meslektaşı A. W. Bauer disk difüzyon yöntemiyle ilgili daha önceki tüm bilgileri güncelleyerek yayımladılar (Bauer ve ark., 1966). Bu yöntem günümüzde Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemde antimikrobiyal etkinliği belirlenecek olan maddelerin seri dilüsyonları hazırlanır. Aktifleştirilerek bir gece inkübe edilen bakteri inokülümleri 0.5 McFarlanda göre standardize edilir ve Muller Hinton Agar üzerine yayma ekimleri yapılır. Ekimden sonra plakların oda ısısında kurumamasından sonra, antimikrobiyal maddelerin farklı dilüsyonlarından steril disklere 10 ml emdirilerek kültür üzerine yerleştirilir. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra oluşan zon çapları ölçülerek bakterilerin maddelere duyarlı ya da dirençli olup olmadığı tespit edilir (Demirbağ ve Demir, 2007). Disk difüzyon yöntemi ile çok benzer olan agar kuyucuk difüzyon Yöntemi de antimikrobiyal maddenin bakteriler üzerindeki etkilerini zon çapı belirleyerek ölçer. Agar kuyucuk difüzyon yönteminde de diğer yöntemlerde olduğu gibi Mueller-Hinton agar kullanılır. İnokülüm 0.5 McFarlanda göre hazırlanır. Besiyerinde belirli bir çapta kuyucuklar açılır. Bu kuyucukların içine test edilecek antimikrobiyal madde doldurulur. Bundan sonra plaklar inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülür. Agar kuyucuk yönteminde agarın geçirgenliği ve kullanılan maddenin difüzyon hızı yapılan çalışmayı etkileyebilecek etmenlerdir (Turhan, 2015)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Örnekleri

Tez çalışmasında kullanılan *Rumex patientia* L., Kars'ın Arpaçay ilçesinden toplanarak satışa sunulan yerel aktardan temin edilmiştir. *Rumex patientia* L. Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda teşhis edilmiştir. Çalışmada bitki yaprakları kullanılmıştır. Yöre halkı tarafından evelik olarak adlandırılan bitki, çorba ve yemeklere katılarak tüketilmektedir.

Helichrysum arenarium Moench, Kars'ın Arpaçay ilçesinden toplanarak satışa sunulan yerel aktardan temin edilmiştir. Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda teşhis edilmiştir. Çalışmada bitki çiçekleri kullanılmıştır. Altın otu ve ölmez çiçek olarak da adlandırılan bitki, sıcak su ile demlenerek tüketilmektedir. Yöre halkı tarafından böbrek rahatsızlıkları ve boğaz ağrıları için tüketilmektedir.

Achillea arabica Kotschy de Kars'ın Arpaçay ilçesinden toplanarak satışa sunulan yerel aktardan temin edilmiştir. Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nda teşhis edilmiştir. Çalışmada bitki çiçekleri kullanılmıştır. Kars'ta civan perçemi adıyla bilinen bitki de demlenerek tüketilmektedir. Diş ağrıları ve yara iyileşmesi için kullanılmaktadır.

2.1.2. Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada üç Gram-pozitif (*S.aureus* ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29219), sekiz Gram-negatif (*P.auriginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603, *E.coli* ATCC 35218, *E.coli* RSKK O23, *E.coli* RSKK O143, *E.coli* RSKK O164, *E.coli* RSKK O157:H7) bakteri kullanılmıştır.

S.aureus ATCC 29213, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29219, *P.auriginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603 ve *E.coli* ATCC 35218 suşları Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından, *E.coli* RSKK O143, *E.coli* RSKK O164, *E.coli* RSKK O157:H7

suşları ise Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitki Materyallerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Rumex patientia* (evelik), *Helichrysum arenarium* (altın otu) ve *Achillea arabica* (civan perçemi) aktardan alınarak laboratuvara getirildi. *Rumex patientia*'nın yaprakları, *Helichrysum arenarium* ve *Achillea arabica*'nın çiçekleri öğütücüde öğütüldü. Öğütülen bitki örneklerinden 50 gr alınarak ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanan soxhlet cihazı kartuşuna alındı. Kartuş 500 ml'lik soxhlet ekstraktörü içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon çözücüsü olarak metanol kullanıldı. Kaynama balonuna 650 ml metanol çözücüsü konuldu. Kartuştan geçen çözücü berrak bir hal alıncaya kadar yaklaşık olarak 10 saat süre ile ekstrakte (10-15 sifon) edildi. 10. saat sonunda elde edilen sıvı ekstraktlar mavi band süzgeç kağıdından süzülerek partüküller uzaklaştırıldı. Süzülen ekstrakt örneği rotary evaporatör ile 35-45 °C'de çözücüsü uçuruldu. Balon içerisinde kalan bitki ekstraktı 12 saat süre ile desikatörde bekletildi. Çözücüsünden tamamen uzaklaştırılan ekstrakt, 0,1 mg hassasiyetle tartılıp ekstrakt kutusuna konularak +4 °C'de yapılacak olan çalışma için muhafaza edildi (Wang ve ark., 2006; Uluman ve Aksu Kılıçle, 2020).

2.2.2. Antibiyogram Disklerinin Hazırlanması ve Disk Difüzyon Metodu

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi disk difüzyon metodu ile belirlendi (Murray ve ark.1995). Bitki ekstraktları final konsantrasyonu 30 mg/ml olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü.



Resim 5. Bitki ekstraktları stokları

Ekstraktlar 0.45 miliporluk filtreden süzüldü. Müller Hinton Agar besiyeri üzerine McFarland standardı ile 10^8 CFU/ml'ye ayarlanmış olan bir gecelik taze kültürden 100µl yayma ekim tekniği ile ekildi. Besiyeri üzerine alınan steril boş antibiyogram disklerine (6mm çapında) 10'ar µl ekstraktlardan emdirildi. Böylece her diske 300 µg/disk etken madde emdirilmiş oldu.

Pozitif kontrol için ampisilin/sulbactam (SAM; 20 µg/disk), tigesiklin (TGC; 15 µg/disk), meropenem (MEM; 10 µg/disk) antibiyotikleri, negatif kontrol için DMSO kullanıldı.

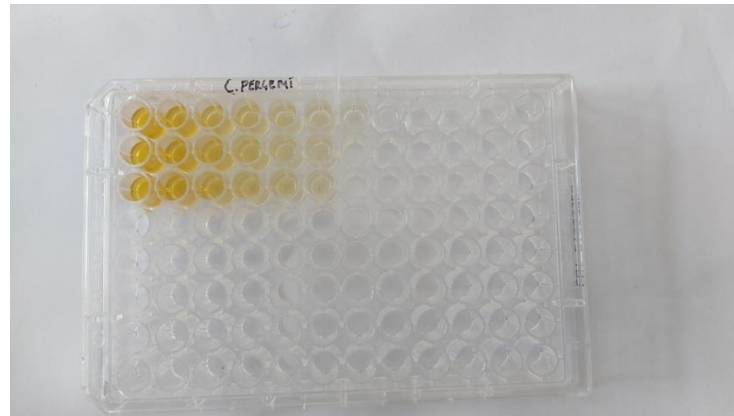
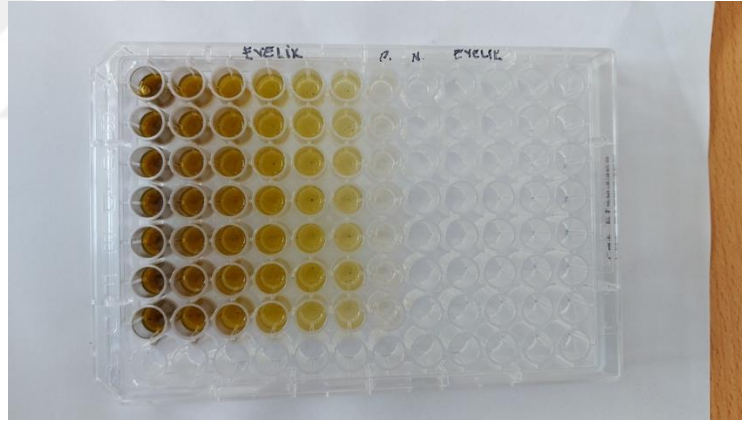
Ekim yapıldı, disk yerleştirilen petri kapları 37 °C' de 24 saat inkübasyonda kalmıştır. Inkübasyon sonunda oluşan zon çapları kumpas ile ölçülerek kaydedilmiştir. Disk difüzyon metodu üç paralel çalışma ile tekrar edilmiştir.

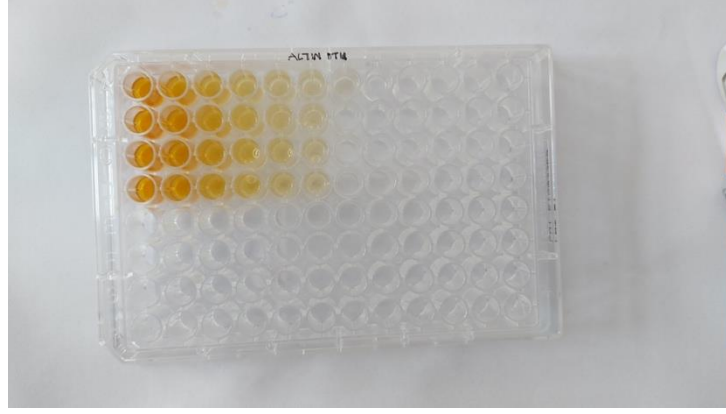
2.2.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) Değerlerinin Belirlenmesi

Minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) testi, tanımlanmış laboratuvar koşulları altında, ilgili bakterinin büyümesini engelleyen bir antimikrobiyal maddenin en düşük etkili konsantrasyonunu ölçmek için agar veya broth seyreltme yöntemlerini kullanır. Bu test, yeni antimikrobiyal ilaçların duyarlılıklarını test etmek için kullanılır ve *in vitro* ortamda yapılır (Belanger ve Hancock, 2021).

MIK değerlerini belirlemek için mikro dilüsyon yöntemi kullanıldı. Her bir bakterinin 12 saatlik taze kültürü McFarland 0.5 standardıyla 10^8 CFU/ml'ye ayarlandı ve 200 kat dilüe edilerek 5×10^5 CFU/ml'ye ayarlandı. Bitki ekstraktlarından 500 µg/ml stok hazırlamak

için DMSO'da çözüldü. Her bir bitki ekstraktı için bir microplate hazırlandı. Disk difüzyon testinde tespit edilen duyarlı bakteri sayısı kadar kuyucuğa A satırından başlanarak aşağıya doğru ve 1.sütundan 7. sütuna kadar 150 µl Müller Hinton broth ilave edildi. Hazırlanan ekstrakt stoklarından ilk satıra 150 µl ilave edildi ve pipetleme yapılarak her satırdan 150 µl alınıp bir sonraki satıra eklenerek seri dilüsyonlar hazırlandı. Son çekilen 150 µl'lik kısım dışarı atıldı. Böylece 1. satırdan 7. satıra kadar bitki ekstraktlarının 500 µg/ml-7.8 µg/ml arasındaki dozları ayarlandı. Son olarak her kuyucuğa 5µl test bakterileri ilave edildi. Negatif control için DMSO ve besiyeri, pozitif kontroller için besiyeri+inoculum bulunan kuyucuklar da hazırlandı. Tüm plateler hazırlandıktan sonra plate çalkalayıcıda 300 rpm'de 20 saniye çalkalandı (Güllüce ve ark.2004). Mikroplatelerin 600nm de plate okuyucuda bulanıklıkları değerlendirildi ve sonra 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tekrar microplate okuyucuda son bulanıklık durumları kontrol edildi. Bulanıklığın aynı kaldığı kuyucuktaki doz miktarı MİK değeri kabul edildi.





Resim 6. Hazırlanan mikroplateler



3. BULGULAR

3.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

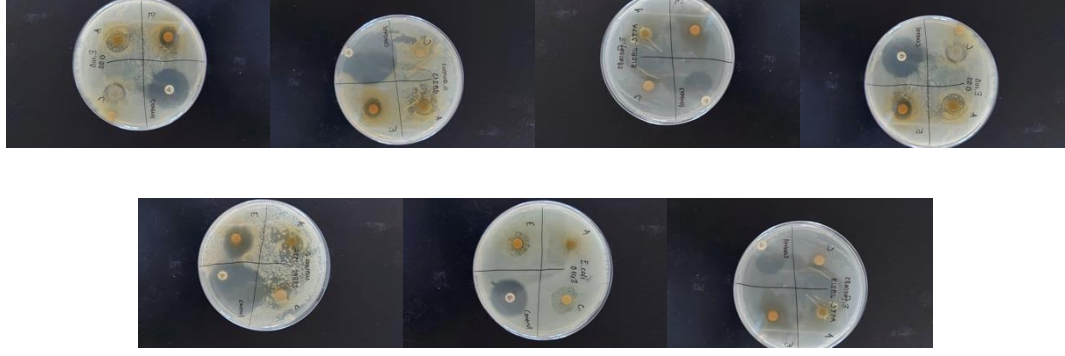
Rumex patientia L., *Helichrysum arenarium* Moench ve *Achillea arabica* Kotschy' nin metanol ekstraktlarının test edildiği mikroorganizmalardan 11 tanesinden 10'unun en az bir bitkiye duyarlı olduğu görülmüştür.

Rumex patientia L.'nin *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29219, *S.aureus* ATCC 29213, *P.auriginosa* ATCC27853, *E.coli* O143, *E.coli* O164 ve *E.coli* O157:H7 suşları üzerine antibakteriyal etki ettiği görülmüştür. Zon çapı ölçüm sonuçlarına göre en çok *S.aureus* ATCC 25923 üzerine, en az ise *E.coli* O157:H7 suşları üzerine etkili bulunmuştur.

Helichrysum arenarium Moench'in *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* O28, *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603, ve *E.coli* O164 suşları üzerine etkisi tespit edilmiştir. Zon çapı ölçümlerine göre en çok *E.coli* O28 üzerine etkili olurken, en az *E.coli* ATCC 25922 üzerine etkili olmuştur.

Achillea arabica Kotschy' nin metanol ekstraktı ise *E.faecalis* ATCC 29219, *E.coli* O23, *P.auriginosa* ATCC27853, *E.coli* O143, *E.coli* O164 üzerine etkili bulunmuştur. En büyük zon çapı *E.coli* O143 için ölçülürken, en küçük zon çapı *E.coli* O28 için ölçülmüştür.

Zon çaplarına göre *S.aureus* ATCC 25923 üzerine en etkili bitki ekstraktının *Rumex patientia* L., *E.faecalis* ATCC 29219 üzerine en etkili bitki ekstraktının *Achillea arabica* Kotschy, *E.coli* O23 üzerine en etkili bitki ekstraktının *Helichrysum arenarium* Moench, *S.aureus* ATCC 29213 üzerine en etkili bitki ekstraktının yine *Helichrysum arenarium* Moench, *P.auriginosa* ATCC 27853 üzerine en etkili ekstraktın *Achillea arabica* Kotschy, *E.coli* ATCC 25922 üzerine tek etkili ekstraktın *Helichrysum arenarium* Moench, *E.coli* O143 üzerine en etkili ekstraktın *Achillea arabica* Kotschy, *K.pneumonia* ATCC 700603 üzerine tek etkili ekstraktın *Helichrysum arenarium* Moench, *E.coli* O164 üzerine en etkili bitki ekstraktının *Achillea arabica* Kotschy, *E.coli* O157:H7 üzerine tek etkili bitki ekstraktının ise *Rumex patientia* L. 'ya ait ekstraktlar olduğu belirlenmiştir. Ekstraktlardan hiçbiri *E.coli* ATCC 35218 üzerine etki göstermemiştir.



Resim 7. Oluşan bazı zon çapları

Tablo 2. Disk difüzyonla oluşan zon çapları (Ortalama ± Standart Hata)

	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.faecalis</i> ATCC 29219	<i>E.coli</i> O23	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	<i>P.auriginosa</i> ATCC 27853	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> O143	<i>K.pneumonia</i> ATCC 700603	<i>E.coli</i> O164	<i>E.coli</i> O157:H7
<i>Rumex patientia</i>	26±03	8±05	-	14±01	12±03	-	14±01	-	12±03	10±02
<i>Helichrysum arenarium</i>	12±01	-	18±06	14±01	-	10±06	-	14±02	14±04	-
<i>Achillea arabica</i>	-	14±06	14±01	-	16±01	-	20±01	-	16±01	-
Kontrol	26±1	15±07	30	40±01	18±01	24±05	22±02	22±02	30±01	50±03

3.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri

Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkisi görülen üç bitki ekstraktının 500 µg/ml-7.8 µg/ml arasındaki dozlarından hangisinin MİK değeri olduğu mikroplate okuyucu ile tespit edildi. Alınan sonuçlara göre MİK değerleri 15,62 µg/ml ile 62,5 µg/ml arasında değişmektedir. *Rumex patientia* metanol ekstraktının *S.aureus* ATCC 25923 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Achillea arabica* metanol ekstraktının *E.faecalis* ATCC 29219 üzerine en düşük dozda (31,25 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Helichrysum arenarium* metanol ekstraktının *E.coli* O23 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, *Achillea arabica* metanol ekstraktının *E.coli* O143 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu, yine *Achillea arabica* metanol ekstraktının *E.coli* O164 üzerine en düşük dozda (15,62 µg/ml) etki eden bitki olduğu

belirlenmiştir . *E.coli* O157:H7 üzerine etki eden tek bitkinin ise *Rumex patientia* olduğu görülmüştür.(Tablo 3).

Tablo 3. MİK değerleri (µg/ml)

	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.faecalis</i> ATCC 29219	<i>E.coli</i> O28	<i>S.aureus</i> ACTC 29213	<i>P.auriginosa</i> ATCC 27853	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> O143	<i>K.pneumonia</i> ATCC 700603	<i>E.coli</i> O164	<i>E.coli</i> O157:H7
<i>Rumex patientia</i>	15,62	62,5	-	31,25	31,25	-	31,25	-	31,25	31,25
<i>Helichrysum arenarium</i>	31,25	-	15,62	31,25	-	62,5	-	31,25	31,25	-
<i>Achillea arabica</i>	-	31,25	31,25	-	31,25	-	15,62	-	15,62	-
Control (Ampicillin)	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Rumex'in bir çok türü (örn. *R. acetosa*, *R. acetosella*, *R. crispus*, *R. patientia* ve *R. pseudonatronatus*) çoğunlukla ilkbaharda toplanır ve sebze olarak kullanılır (Pardo-de Santayana ve ark., 2007; Dénes ark., 2013; Nedelcheva, 2013). Çoğu durumda, kökler tıropatik olarak kullanılır, ancak yapraklar ve meyveler veya tohumlar gibi diğer bitki kısımları da kullanılmaktadır. Bazen yapraklar soslar ve çorbalar için kullanılır veya zeytinyağı ile karıştırılır, bazen de asitliklerini azaltmak için haşlanmış patateslerle karıştırılır (Łuczaj ve Szymański, 2007; Guerra ve ark., 2008; Łuczaj, 2010; Łuczaj ve ark., 2013, Dénes ve ark., 2013).

Rumex patientia'nın antrakinon, tanen, naftalin ve naftokinon türevleri içerdiği bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Sharma ve ark., 1977; Demirezer ve Kuruüzüm, 1997; Suri ve ark., 1978). Demirezer ve arkadaşları (Demirezer ve ark., 2001) yaptıkları çalışmada, bilinen yedi fenolik bileşikle birlikte yeni bir antrakinon glikozit olan emodin-6-O-β-d-glukopiranozit ve yeni bir basit halojenli bir bileşik olan flavan-3-ol, 6-klorokateşini, *Rumex Patientia L.*'nin köklerinden izole etmişlerdir. Bileşenlerin yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiş, izole edilen bileşiklerin sitotoksik etkileri ve radikal süpürücü özellikleri gösterilmiştir. Kateşin ve klorokateşinin antioksidan özellik gösterdiğini, bitki içeriğindeki toplam 9 bileşiğin sitotoksik etkisi olmadığını göstermişlerdir. Daha önce *R. patientia*'nın köklerinin sulu ekstraktının yüksek derecede antiinflamatuvar aktivite gösterdiğini de bildirilmiştir (Süleyman ve ark., 1999).

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, *Rumex* türlerinden izole edilen bileşiklerin, *in vitro* ve *in vivo* olarak anti-inflamatuvar, antioksidan, antitümör, antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. *Mycobacterium* ve mantarlar üzerine etkinliği ve antiviral etkinliği olduğu görülmüştür. (Taylor ve ark., 1996; Demirezer ve ark., 2001; Lee ve ark., 2005; Rivero-Cruz ve ark., 2005; Kerem ve ark., 2006; Kisangau ve ark., 2009; Gautam ve ark., 2010; Liang ve ark., 2010; Yan ark., 2011).

Literatür taramasında, *Rumex patientia*'nın antibakteriyel etkinliği ile ilgili az sayıda çalışma ile karşılaşmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, *Rumex patientia L.*'nin *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29219, *S. aureus* ATCC 29213, *P.*

auriginosa ATCC27853, *E. coli* O143, *E. coli* O164 ve *E. coli* O157:H7 suşları üzerine antibakteriyal etki ettiği görülmüştür. Zon çapı ölçüm sonuçlarına göre en çok *S. aureus* ATCC 25923 üzerine, en az ise *E. coli* O157:H7 suşları üzerine etkili bulunmuştur. Özellikle antibiyotik direncinin ciddi bir sorun haline geldiği günümüzde, sonucun dikkat çekici olduğu düşünülmektedir. Pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, özellikle *S. aureus* ATCC 25923 üzerine etkisinin antibiyotik ile oldukça yakın olduğu görülmektedir.

Helichrysum ekstraktının toplam fenolik profili HPLC-DAD-ESI-MS ile araştırılmış, klorojenik ve kafeik asitler, apigenin-7-O-glukozit, naringenin, apigenin, kaempferol, kinik ve dikaffeoilkinik asitler içerdiği bildirilmiştir (Kammerer ve ark., 2005; Gouveia ve Castilho 2010). Kinik ve dikaffeoilkinik asitler dışında, diğer tüm bileşikler, *H. arenarium* çiçeklerinde daha önce rapor edilmiştir. (*H. arenarium* (L.) Moench subsp. *aucheri*, subsp. *erzincanicum* ve subsp. *rubikundum*). Her üç alttür de Türkiye florasına aittir. Bu alttürlerle ait ekstraktlarda çeşitli fenolik asitler (klorojenik, kafeik ve p-kumarik asitler), flavonoidler (apigenin, apigenin-7-glukozit, luteolin ve naringenin) ve resveratrol tanımlanmıştır (Albayrak ve ark., 2010a; Albayrak ve ark., 2010b). *H. arenarium* (L.) Moench çiçek salkımının metanol ekstraktlarında çok sayıda başka polifenol (kaempferol, kersetin ve türevleri, naringenin glukozitleri, izosalipurposid, ferulik, p-hidroksibenzoik ve protokateşik asitler) bildirilmiştir. (Sroka ve ark., 2004; Bryksa-Godzisz ve ark., 2006).

Çalışmamızda metanol ekstraktını çıkardığımız *H. arenarium* L. çiçeklerinin antimikrobiyal etkinliğine baktığımızda, daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Gradinaru ve ark., 2014). Gradinaru ve arkadaşlarının, alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan standart suşlar ve izolatlar üzerine yaptığı bu çalışmada çalışmada *H. arenarium* metanol ekstraktının *S.aureus* ATCC 25923 ve metisilin dirençli *S.aureus* izolatlarına ve diğer suşlara karşı etkinliğinin olduğu gösterilmiştir. *H. aureonitens*'in metanolik ekstraktının *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi Meyer ve Afolayan (1995) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca Cushine ve Lamb (2005) *H. aureonitens*'in *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. *H. dasyanthum*, *H. felinum*, *H. excisum* ve *H. petiolare*'nin metanolik ekstraktlarının *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı etkin olduğu belirlenmiştir

(Lourens ve ark., 2004). Steenkamp ve arkadaşları (2004) *H. foetidum*'un metanol ekstraktının *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın büyümesini engellediğini bildirmiştir. Van Vuuren ve arkadaşları (2006), *H. cymosum*'un aseton ekstraktının *Enterococcus faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. Aeruginosa*, *E coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*, *Cryptococcus neoformans* ve *C. albicans* karşı antimikrobiyal aktiviteleri olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre *Helichrysum arenarium* Moench'in *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* O23, *S.aureus* ATCC 29213, *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumonia* ATCC 700603, ve *E.coli* O164 suşları üzerine etkisi olduğu tespit edilmiştir. Zon çapı ölçümlerine göre en çok *E.coli* O23 üzerine etkili olduğu görülmüştür.

Ülkemizde hanzabel ve civanperçemi olarak da bilinen *Achillea. arabica* karın ağrısı tedavisinde (Jaffal ve Abbas, 2019), gastrointestinal bozukluklar, kardiyovasküler rahatsızlıklar (Akkol ve ark., 2011) için kullanılmaktadır. Antikarsinojenik (Varasteh-Kojourian ve ark., 2017), antiülser ve hipoglisemik (Abd-Alla ve ark., 2016) olarak da kullanılmaktadır. *A. arabica* çiçekleri sabinen, p-simen, α -terpenin, 1.8-sineol, linalool trans-sabinen, terpinen-4-ol, nerol, ascaridole, cis-piperiton epoksit, trans-piperiton epoksit, transsesquisabinene hidrat, timol, karvakrol, izo-askaridol, öjenol, lavandulil-2-metilbütanoat, heksadesen, γ -eudesmol, oktadesen, heksadekenoik asit metil ester, heksadekenoik asit, trikosane (N-) ve pentakozan (N-) gibi çeşitli kimyasal bileşenler içerir (Jaffal ve Abbas, 2019). Ek olarak, *A. arabica*'nın etanolik ekstraktlarının flavonoidler, kuersetin, rutin ve mirisetin içerdiği bildirilmiştir (Hammad ve ark.,2013).

Farklı *Achillea* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Bezic ve arkadaşları (2003), *Achillea clavennae*'nin uçucu bileşenlerini ve antimikrobiyal potansiyellerini araştırmış ve *Escherichia coli* ve *Proteus mirabilis*'e karşı bakteri üremesinde önemli bir düşüş bulmuşlardır. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus faecalis* ise 4 mm ile 6.5 mm arasında inhibisyon zonları ile uçucu yağa dirençli olduklarını göstermişlerdir. Candan ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir çalışmada *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* ve *Candida krusei*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Başer ve arkadaşları (2002), *Achillea multifida*'nın uçucu yağının bileşimini ve

antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. *Achillea millefolium*'un bitki patojeni bakteri inhibisyon potansiyeli Vasinauskiene ve arkadaşları (2006) tarafından araştırılmıştır. Antimikrobiyal özelliğin gücünün kullanılan ekstrakt tipine, farklı yerlerden bitki materyallerinin toplanmasına, kullanılan ekstrakt konsantrasyonuna ve denenen mikroorganizmalara göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Srivastava ve ark., 2013). Literatür taramasında *Achillea arabica*'nin metanol ekstraktının antimikrobiyal özelliği ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer *Achillea* türleri ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi, çalışmamızda antimikrobiyal etkinlik tespit edilmiştir. *Achillea arabica* Kotschy'nin metanol ekstraktı *E. faecalis* ATCC 29219, *E. coli* O23, *P. auriginosa* ATCC27853, *E. coli* O143, *E. coli* O164 üzerine etkili bulunmuştur. En büyük zon çapı *E. coli* O143 için ölçülmüştür.

Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde, test edilen bitkilerin antimikrobiyal özelliklerinin dikkat çekici olduğu söylenebilir. Özellikle yeni antimikrobiyal ajanların öneminin arttığı günümüzde, sonuçlar daha da anlamlı hale gelmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda antibiyotik dirençli suşlar üzerine de etki ettiği tespit edilen bu bitkilerin, farmasötik ve tıbbi çalışmalar için değerli bir kaynak olabileceği düşünölmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Abd-Alla, H.I., Shalaby, N.M., Hamed, M.A., El-Rigal, N.S., Al-Ghamdi, S.N., Bouajila, J. (2016). Phytochemical composition, protective and therapeutic effect on gastric ulcer and α -amylase inhibitory activity of *Achillea biebersteinii* Afan. Archives of Pharmacal Research, 39 (1), 10-20
- Ade-Omowaye, B.I.O., Angersbach, A., Taiwo, K.A., Knorr, D. (2001). Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. Trends in Food Science and Technology, 12 (8), 285–295
- Akkol, E.K., Koca, U., Pesin, I., Yilmazer, D. (2011). Evaluation of the wound healing potential of *Achillea biebersteinii* Afan.(Asteraceae) by in vivo excision and incision models. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 1-7
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sağdıç, O., Budak, Ü. (2010). Phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from Eastern Anatolia, Turkey. Turkish Journal of Biology, 34, 463–473
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sağdıç, O., Hamzaoğlu, E. (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. Food Chemistry, 119, 114–122
- Allen, D.E., Hatfield, G. (2004). Medicinal Plants in Folk Tradition – An Ethnobotany of Britain and Ireland. TimberPress, Portland, Cambridge.
- Alupului, A. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. U.P.B. Science Bulletin, Series B, 74(2)
- Antunes Viegas, D., Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J., Palmeira-de-Oliveira, R. (2014). *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. Journal of Ethnopharmacology, 151, 54–65
- Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini V., Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction

- of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117, 426–436
- Bagley, S.T., (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control*, 6, 52–58
- Bashi, D.S., Fazly Bazzaz, B.S., Sahebkar, A., Karimkhani, M.M., Ahmadi, A. (2012). Investigation of optimal extraction, antioxidant, and antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* and *A. wilhelmsii*. *Pharmaceutical Biology*, 50(9), 1168–1176
- Başkan, S., Davut Özdemir, A., Günaydin K., Erim, F.B. (2007). Analysis of anthraquinonesin *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. *Talanta*, 71, 747–750
- Başer, K. H. C., Demirci, B., Demirci, F., Güleryüz, G. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta Medica*, 68, 941-943
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C, Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 36:493-496
- Baytop, T. (1984). Türkiye’de bitkiler ile tedavi (geçmiste ve bugün). *Istanbul Üniversitesi Yayinlari No: 3255, Eczacilik Fak. Yayin No: 40, Sanal Matbaacilik, Istanbul*, 314–315
- Belanger, C.R., Hancock, R.E.W. (2021). Testing physiologically relevant conditions in minimal inhibitory concentration assays. *Nature Protocols*, 16, 3761–3774
- Bendig, J.W., Kyle, P.W., Giangrande, P.L., Samson, D.M., Azadian, B.S. (1987). Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia treated with ciprofloxacin. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 80, 316-317
- Benítez, G., González-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 87–105

- Bezić, N., Skocibucic, M., Dunkic, V., Radonic, A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 17, 1037-1040
- Bhattacharjee, P., Singhal, R.S., Tiwari, S.R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of cottonseed oil. *Journal of Food Engineering*, 79 (3), 892–989
- Bilinski, P., Kapka-Skrzypczak, L., Posobkiewicz, M., Bondaryk, M., Holownia, P., Wojtyła, A. (2012). Public health hazards in Poland posed by foodstuffs contaminated with *E. coli* O104:H4 bacterium from the recent European outbreak. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19, 3–10
- Bogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B. (2013). Ethnopharmacological in vitro studies on Austrian's folkmedicine -an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 149,750–771
- Boucher, H.W., Corey, G.R. (2008). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, Suppl_5, S, 344-9
- Bryant, G., Wolfe, J. (1987). Electromechanical stress produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electrical fields. *Journal of Membrane Biology*, 96 (2), 129–139
- Bryksa-Godzisz, M., Węglarz, Z., Przybył, J. (2006). Phenolic compounds in yellow everlasting (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) growing wild in the middle part of the Bug river valley. *Herba Polonica*, 52, 26–31
- Butura, V. (1979). Romanian ethnobotany encyclopedia [inRomanian]. TheScientific and Encyclopedic Publishing, Bucharest, Romania.
- Çakılcıoğlu, U., Türkoğlu, I. (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*,132, 165–175

- Camazine, S. (1986). Zuni Indian Medicine: folklore or pharmacology, science or sorcery? R.P. Steiner (Ed.), *Folk Medicine: The Art and the Science*, American Chemical Society, Washington DC, USA. pp. 23-41
- Candan, F., Ünlü, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and metanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2003 Feb) Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. Los Angeles County, California, 2002-2003. *The Morbidity and Mortality Weekly Report*, 07; 52(5), 88
- Chemat, F., Tomao, V., & Viot, M. (2008). In: Otles, S. (Ed.), *Handbook of Food Analysis Instruments, Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis*, CRC Press, pp. 85–94
- Chinou, I.B., Roussis, V., Perdetzoglou, D., Loukis, A. (1996). Chemical and biological studies on two *Helichrysum* species of greek origin. *Planta Medica*, 62, 377–379.
- Concha, J., Soto, C., Chamy, R., Zuniga, M.E. (2004). Enzymatic pretreatment on Rose-Hip oil extraction: hydrolysis and pressing conditions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 81 (6), 549–552.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564–582.
- Cravottoa, G., Boffaa, L., Mantegnaa, S., Peregob, P., Avogadroa, M., Cintasc, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (5), 898–902.
- Cushine, T.P.T., Lamb, E.J. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 243-248

- Dao, T.T., Liebenthal, D., Tran, T.K., Ngoc Thi Vu, B., Ngoc Thi Nguyen, D., Thi Tran, H.K., Thi Nguyen, C.K., Thi Vu, H.L., Fox, A., Horby, P., Van Nguyen, K., Wertheim, H.F.L. (2014). *Klebsiella pneumoniae* oropharyngeal carriage in rural and urban Vietnam and the effect of alcohol consumption. PLoS One, 9, e91999
- Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey, Vol 2, Edinburgh University Press, United Kingdom. pp.287
- Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey, Vol 5, Edinburgh University Press, United Kingdom. pp.91
- Demirbağ, Z., Demir İ. (2007). Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Esen Ofset Matbaacılık Trabzon, TÜRKİYE, 34-41
- Demirezer, L.Ö., Kuruüzüm, A. (1997). Rapid and simple biological activity screening of some *Rumex* species; evaluation of bioguided fractions of *R. scutatus* and pure compounds. Zeitschrift für Naturforschung, 52c, 665-669
- Dénes, A., Papp, N., Babai, D., Czúcz, B., Molnár Z. (2013). Edible wild plants and their use based on ethnographic and ethnobotanical researches among Hungarian in the Carpathian Basin. Dunántúli Dolgozatok (A) Természettudományi Sorozat, 13, 35-76
- Drăgulescu, R. (2016). Representations of the fire in Romanian phytonymy. In Multicultural Representations. Literature and Discourse as Forms of Dialogue; Iulian, B., Cornel, S., Eds.; Arhipelag XXI Press: Tîrgu Mureş, Romania, pp. 16–17.
- Dombrowicz, E., Swiatek, L., Kopycki, W. (1994). Phenolic acids in *Inflorescentia Helichrysi* and *Herba Hieracii pilosellae*. Pharmazie, 47, 469–470
- Dominguez, H., Ntiiez, M.J., Lema, J.M. (1995). Enzyme-assisted hexane extraction of soybean oil. Food Chemistry, 54 (2), 223–231

- Duman, H. (2000). *Achillea L.*, in: Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC, editors. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, Edinburgh. 11, pp 158–159.
- El Zowalaty, M.E., Al Thani, A.A., Webster, T.J., El Zowalaty, A.E., Schweizer, H.P., Nasrallah, G.K., Marei, H.E., Ashour, H.M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology.*, 10(10), 1683–706
- Fincan, M., Dejmek, P. (2002). In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering*, 55 (3), 223–230.
- Franzetti, F., Cernuschi, M., Esposito, R., Moroni, M. (1992). *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Journal of Internal Medicine*, 231, 437-443
- Freire, S.E., Chemisquy, M.A., Anderberg, A.A., Beck, S.G., Meneses, R.I., Loeuille, B., Urtubey, E. (2015). The *Lucilia* group (Asteraceae, Gnaphalieae): Phylogenetic and taxonomic considerations based on molecular and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1227–1248
- Friedlander, C. (1882). *Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie*. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*, 87, 319–324
- Fujii, A., Seki, M., Higashiguchi, M., Tachibana, I., Kumanogoh, A., Tomono, K. (2014). Community-acquired, hospital-acquired, and healthcare-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory Medicine Case Reports*, 12, 30–33
- Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. *Economic Botany.*, 49(4), 406-422.
- Galbany-Casals, M., Garcia-Jacas, N., Sáez, L., Benedí, C., and Susanna, A. (2009). Phylogeny, biogeography, and character evolution in Mediterranean, Asiatic, and

- Macaronesian *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae) inferred from nuclear phylogenetic analyses. *International Journal of Plant Sciences*, 170, 365–380
- Gautam, R., Karkhile, K.V., Bhutani, K.K., Jachak, S.M. (2010). Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1inhibitory and free radical scavenging effects of *Rumex nepalensis*. *Planta Medica*, 76, 1564–1569
- Getie, M., Gebre-Mariam, T., Rietz, R., Höhne, C., Huschka, C., Schmidtke, M., Abate, A., Neubert, R.H.H. (2003). Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia*, 74, 139–143
- Gilmore, M.S., Lebreton, F., Van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 10–16
- Gouveia, S., Castilho, P. C. (2010). Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 1851–1868
- Gradinaru, A. C., Sillion, M., Trifan, A., Miron A., Aprotosoiaie, A. C. (2014). *Helichrysum arenarium* subsp. *arenarium*: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens. *Natural Product Research*, 28 (22), 2076-2080
- Guerra, L., Pereira, C., Andrade, P.B., Rodrigues, M.A., Ferreres, F., De Pinho, P.G., Seabra, R.M., Valentao, P. (2008). Targeted metabolite analysis and antioxidant potential of *Rumex induratus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8184-8194
- Güllüce, M., Sokmen, M., Sahin, F., Sokmen, A., Adiguzel, A., Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oil and metanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) *Druce ssp. serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern

Anatolia region of Turkey. Journal of The Science of Food and Agriculture, 84, 735–741

Hammad, H.M., Albu, C., Matar, S.A., Litescu, S.C., Al Jaber, H.I., Abualraghib, A.S., Afifi, F.U. (2013). Biological activities of the hydro-alcoholic and aqueous extracts of *Achillea biebersteinii* Afan.(Asteraceae) grown in Jordan. African Journal of. Pharmacy and Pharmacology, 7 (25), 1686-1694

Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., Niranjana, K. (2001). Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. Journal of the American Oil Chemists Society, 78 (8), 817–821

Hannay, J.B., Hogarth, J. (1879). On the solubility of solid in gases. Proceeding of the Royal Society of London, 29, 324–326

Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 4 (2), 167–175

Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. Journal of Chromatography, 1100 (1), 1–7

Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K. (2008). Nhsn annual update: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006–2007. Infection Control & Hospital Epidemiology, 29, 996–1011

Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T. (1996). Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in west Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. Journal of Ethnopharmacology, 53, 75–87

http://tmc.dergisi.org/pdf/tmc_supplement_2016.pdf (20.05.2019).

<http://vanherbaryum.yyu.edu.tr/> (8 Ocak 2022)

<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF10CC3F7A155F5A36> (20.04.2019).

https://en.wikipedia.org/wiki/Helichrysum_arenarium (8 Ocak 2022)

<https://kocaelibitkileri.com/rumex-patientia/#jp-carousel-23666> (8 Ocak 2022)

<https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>
(15.05.2019).

Huycke, M.M., Sahm, D.F., Gilmore, M.S. (1998). Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 239–249

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A., Castro-Puyana, M. (2012). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer, pp. 55–98.

Inbaneson, S.J., Sundaram, R., Suganthi, P. (2012). In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pac. Journal of Tropical Medicine*, 5(2), 103-106

Inczedy, J., Lengyel, T., Ure, A.M. (1998). Supercritical fluid chromatography and extraction. *Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997)*, third ed. Blackwell Science.

Jaffal, S.M., Abbas, M.A. (2019). Antinociceptive action of *Achillea biebersteinii* metanolic flower extract is mediated by interaction with cholinergic receptor in mouse pain models. *Inflammopharmacology* 27 (5), 961-968

Jain, T. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents – an overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2 (1), 19–25

- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 462–478
- Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. (2007). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), ASM Press, Washington, D.C., 1152–1172
- Kaffash, S., Sefidkon, F., Mafakheri, S. (2020). Comparing essential oil composition of cultivated and wild samples of *Achillea biebersteinii* afan. in Kurdistan province. *Journal of Medicinal plants and By-product*, 9 (2), 149-158
- Kammerer, B., Kahlich, R., Biegert, C., Gleiter, C. H., Heide, L. (2005). HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochemical Analysis*, 16, 470–478
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140.
- Kaufman, P.B., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A., Briemann, H.L. (1999). *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Kaya, Ö. (2011). Investigation of Antioxidant And Antimicrobial Effects of Plantago Major Leaves. Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya ABD, Middle East Technical University, Ankara.
- Kerem, Z., Bilkis, I., Flaishman, M.A., Sivan, L. (2006). Antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase by trans-resveratrol, piceid and a novel trans-stilbene from the roots of Israeli *Rumex bucephalophorus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1243-1247
- Kielhofner, M., Atmar, R.L., Hamill, R.J., Musher, D.M. (1992). Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 403-411

- Kirby, W. M. M., Yoshihara, G. M., Sundsted, K. S., Warren, J. H. (1957). Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annual, 1956-1957*, 892
- Kisangau, D.P., Hosea, K.M., Lyaruu, H.V., Joseph, C.C., Mbwambo, Z.H., Masimba, P.J., Gwandu, C.B., Bruno, L.N., Devkota, K.P., Sewald, N. (2009). Screening of traditionally used Tanzanian medicinal plants for antifungal activity. *Pharmaceutical Biology*, 47, 708-716
- Korvick, J.A., Hackett, A.K., Yu, V.L., Muder, R.R. (1991). *Klebsiella pneumonia* in the modern era: clinicoradiographic correlations. *Southern Medical Journal*, 84, 200–204
- Kuruüzüm, A. (1996). The Comparison of some rumex species in the aspect of chemotaxonomy and determination of their cytotoxicity. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- Latif, S., Anwar, F. (2009). Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (10), 1042–1048
- Lebovka, N.I., Bazhal, M.I., Vorobiev, E. (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54 (4), 337–346
- Lee, N.J., Choi, J.H., Koo, B.S., Ryu, S.Y., Han, Y.H., Lee, S.I., Lee, D.U. (2005). Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2158-2161
- Letellier, M., Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27 (3), 259–270
- Liang, H.X., Dai, H.Q., Fu, H.A., Dong, X.P., Adebayo, A.H., Zhang, L.X .. Cheng, Y.X. (2010). Bioactive compounds from Rumex plants. *Phytochemistry Letters*, 3, 181-184

- Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Popova, N.V., Bubenchikova, V.N. (1992). Medicinal plants and preparations derived from them. *Farmaseotychnyi Zhurnal*, 3, 83–84
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90 (1), 60–66
- Lourens, A.C.U., Reddy, D., Baser, K.H.C., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F. (2004). In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 253-258
- Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532
- Łuczaj, L. (2010). Changes in the utilization of wild green vegetables in Poland since the 19th century: a comparison of four ethnobotanical surveys. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 395-404
- Łuczaj, L., Köhler, P., Piroznikow, E., Graniszewska, M., Pieroni, A., Gervasi, T. (2013). Wild edible plants of Belarus: from Rostafinski's questionnaire of 1883 to the present. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 9, 1-17
- Łuczaj, L., Szymański, W.M. (2007). Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 1-22
- Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1–2), 1–10
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9), 1051-1060
- Maki, D.G., Agger, W.A. (1988). Enterococcal bacteremia: Clinical features, the risk of endocarditis, and management. *Medicine*, 67, 248–269

- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M. (2010). Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (7), 752–764
- Nikolić, M., Stevović S. (2015). Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry and Urban Greening*, 14 (4), 782-789
- Niranjan, K., Hanmoungjai, P. (2004). Enzyme-aided aqueous extraction. In: Dunford, N.T., Dunford, H.B. (Eds.), *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*. AOCS Publishing, New York, USA.
- Ömür Demirezer, L., Kuruüzüm-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H.-J., Zeeck, A. (2001). The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, 58 (8), 2001, 1213-1217
- Panda, S.K., Luyten, W. (2018). Antiparasitic activity in Asteraceae with special attention to ethnobotanical use by the tribes of Odisha, India. *Parasite*, 25, 10
- Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E., Morales, R. (2007). Tradition knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3 (27), 1-11
- Paré, J.J.R., Bélanger, J.M.R., Stafford, S.S. (1994). Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13 (4), 176–184
- Pareek, A., Kumar, A. (2014). *Rumex crispus* L. – a plant of traditional value. *Drug Discovery*, 9, 20–23
- Puértolas, E., López, N., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J. (2010). Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale. *Journal of Food Engineering*, 119 (3), 1063–1070

- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30 (1), 37–44
- Qader, K.O., Al-Saadi, S.A., Faraj, I.M. (2018). Phytochemical constituents of leaves essential oils of *Achillea fragrantissima* (Asteraceae) from Iraq. *Aro-the Scientific Journal of Koya University*, 6 (2), 56-62
- Rasigade, J.P., Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: a pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 510-514
- Rechinger, K. H. (1986). *Flora Iranica*, Akademische Druck- U.Vernagsanstalt, Graz–Austria. pp.158.
- Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the united states. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 21, 510–515
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: a technology for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68 (6), 1033–1039
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Gurerrero, J.A., Martinez, S., Bye, R., Pereda-Miranda, R., Franzblau, S., Timmermann, B.N., Mata, R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 1117-1126
- Rock, C., Thom, K.A., Masnick, M., Johnson, J.K., Harris, A.D., Morgan, D.J. (2014). Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35, 426–429
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microbial Technology*, 19 (6), 402–420

- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., Gilmour, S., Trinca, L. (2001). Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (6), 499–509
- Sharma, A., Khare, S.K., Gupta, M.N. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 79 (3), 215–218
- Sharma, M., Sharma, P., Rangaswami, S. (1977). Orientalone, a new 1,4-naphthoquinone from *Rumex orientalis* *Indian Journal of Chemistry*, 15B, 544-545
- Shiwani, S., Singh, N. K., Wang, M. H. (2012). Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutrition Research and Practice*, 6, 389–395
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R. (1999). Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (6–7), 217–222
- Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufossé, L., Glória, M.B.A. (2005). Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, 38 (8–9), 1087–1096
- Simões, M., Bennett, R.N., Rosa, E.A.S. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Report*, 26, 746-757
- Singh, R.K., Sarker, B.C., Kumbhar, B.K., Agrawal, Y.C., Kulshreshtha, M.K. (1999). Response surface analysis of enzyme-assisted oil extraction factors for sesame, groundnut, and sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 36 (6), 511–514
- Shikov, A.N., Pozharitskaya, O. N. Makarov, V. G. Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M. (2014). Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications, *Journal of Ethnopharmacology*, 154 (3), 481-536

- Skakun, N.P., Stepanov, N. Yu. (1988). Comparative evaluation of the hepatoprotective, antioxidant and choleric activity of flavonoid drugs. *Vrabcnoe Delo*, 12, 52–54
- Solomon, T., Largesse, Z., Mekbeb, A., Eyasu, M., Asfaw, D. (2010). Effect of *Rumex steudelii* metanolic root extract on ovarian folliculogenesis and uterine histology in female albino rats. *African Health Sciences*, 10, 353–361
- Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, 232, 461–465
- Srivastava, P., Logesh, A.R., Upreti, D.K., Dhole, T.N., Srivastava, A. (2013). In vitro evaluation of some Indian lichens against human pathogenic bacteria. *Mycosphere*, 4(4), 734-743
- Sroka, Z., Kuta, I., Cisowski, W., Dryś, A. (2004). Antiradical activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts from *Helichrysi inflorescentia* and its phenolic contents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59, 363–367
- Šťastná, P., Klimeš, L., Klimešová, J. (2010). Biological flora of Central Europe: *Rumex alpinus* L. perspectives in plant ecology. *Evolution System*, 12, 67–79
- Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M.C., Van Rensburg, C.E.J. (2004). Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 353-357
- Suri, J.L., Dhar, K.L., Atal, C.K. (1978). Chemical constituents of *Rumex orientalis*. *Bernh Journal of Indian Chemical Society*, 55, 292-293
- Suslick, K.S., Doktycz, S.J. (1990). The effects of ultrasound on solids. In: Mason, T.J. (Ed.), *Advances in Sonochemistry*, vol. 1. JAI Press, New York, USA. pp. 197–230
- Süleyman, H., Demirezer, L.Ö., Kuruüzüm, A., Banoğlu, Z.N., Göçer, F., Özbakir, G., Gepdiremen, A. (1999). Antiinflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 141-148

- Sümerkan, B., Gökahmetoğlu, S. (1998). MIC, MBC Testleri, Rutindeki Önemi ve Uygulamaları. *Flora*, 3(2), 91-95
- Tanker, N., Sezik, G. (1978). Türkiye’de yetişen *Helichrysum* türleri üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar. *Ankara Üniversitesi Journal of Faculty of Pharmacy*, 9,18.
- Taylor, R.S.L., Hudson, J.B., Manadhar, N.P., Towers, G.H.N. (1996). Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 97-104
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D. (2006). Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficiency and environmentally friendly food processing. *Food Review International*, 22 (4), 405–423
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-61
- Tsay, R.W., Siu, L.K., Fung, C.P., Chang, F.Y. (2002). Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Archives of Pharmacal Research*, 162, 1021–1027
- Turhan, D. (2015). Bazı Esansiyel Yağların *Staphylococcus aureus* Ve *Escherichia coli* Üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Uluman, E., Aksu Kılıçle, P. (2020). The investigation of the possible antigenotoxic in vivo effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract on mitomycin-C genotoxicity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44 (2), 382-390
- Van Delden, C., Iglewski, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 551–560
- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Van Zyl, R.L., Van Heerden, F.R., Baser, K.H.C. (2006). The antimicrobial, antimalarial and toxicity profiles of helihumulone, leaf

- essential oil and extracts of *Helichrysum cymosum* (L.) D. Don subsp. *cymosum* L. South African Journal of Botany, 72, 287-290
- Vankar, P.S. (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. Resonance 9 (4), 30–41
- Varasteh-Kojourian, M., Abrishamchi, P., Matin, M.M., Asili, J., Ejtehadi, H., Khosravitar, F. (2017). Antioxidant, cytotoxic and DNA protective properties of *Achillea eriophora* DC. and *Achillea biebersteinii* Afan. extracts: A comparative study. Avicenna Journal of Phytomedicine, 7 (2), 157-168
- Vasas, A., Orbán-Gyapai, O., Hohmann, J. (2015). The Genus Rumex: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 175, 198–228
- Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I., Surviliene, E. (2006). Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. Agronomy Research, 4, 437-440
- Wang, L., Curtis, L. and Weller, S. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17(6), 300-312
- Wichtl, M. (2004). Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis. Medpharm GmbH Scientific Publishers: Stuttgart, Almanyia.
- Wink, M. (1999). Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary products. Biochemistry of Secondary Product Metabolism. Wink M, 1, 16, CRC Press , Boca Raton, FL, USA.
- Wink, M., Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology. Wink M , 17, 112, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Winn, Jr. W. (2006). Konemann’s color atlas and diagnostic text of microbiology, Lippencott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA. USA. 945–1021

- Yan, X.M., Joo, M.J., Lim, J.C., Whang, W.K., Sim, S.S., Im, C., Kim, H.R., Lee, S.Y., Kim, I.K., Sohn, U.D. (2011). The effect of quercetin-3-O- β -d-glucuronopyranoside on indomethacin-induced gastric damage in rats via induction of mucus secretion and down-regulation of ICAM-1 expression. *Archives of Pharmacal Research*, 34, 1527-1534
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K, Ikeshiro, Y. (1993). Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 31–38
- Yıldırım, Y. (2010). Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7(2), 117-129
- Zhang, H., Guo, Z., Wu, N., Xu, W., Han, L., Li, N., Han, Y. (2012). Two novel naphthalene glucosides and an anthraquinone isolated from *Rumex dentatus* and their antiproliferation activities in four cell lines. *Molecules*, 17, 843–850
- Zhang, L.S., Li, Z., Mei, R. Q., Liu, G. M., Long, C. L., Wang, Y. H., Cheng, Y. X. (2009). Hastatusides A and B: two new phenolic glucosides from *Rumex hastatus*. *Helvetica Chimica Acta*, 92, 774–778
- Zosel, K. (1964). German Patent: 1493,190.
- Zougagh, M., Valcárcel, M., Ríos, A. (2004). Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (5), 399–405