



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

**AKÇAKESME (*Phillyrea latifolia*) BİTKİSİNİN SIVI AZOT ve
SOLVENTLER TEKNİĞİ KULLANARAK BİYOLOJİK
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Neslihan COŞKUN

Danışman: Prof. Dr. İsa KARAMAN

TOKAT - 2023

ETİK ÖZLEŐME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. İsa KARAMAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Akçakesme (*Phillyrea Latifolia*) Bitkisinin Sıvı Azot ve Solventler Tekniği Kullanarak Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

... / ... / 2023

Neslihan COŞKUN

JÜRİ KABUL VE ONAY

Neslihan COŞKUN tarafından hazırlanan “Akçakesme (*Phillyrea Latifolia*) Bitkisinin Sıvı Azot Ve Solventler Tekniği Kullanarak Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı’ nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) :

Üye :

Üye :

Üye :

.....

Üye :

.....

ONAY

...../...../.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın belirlenmesinden başlayarak tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca ilgi ve alakasını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile her daim yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. İsa KARAMAN'a; laboratuvar çalışmalarında her türlü yardımı sağlayan arkadaşlarım Esra KİŞİOĞLU'na ve Nisanur BARUTCU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde her daim desteklerini yanımda hissettiğim annem Kadriye COŞKUN'a ve babam Hulki COŞKUN'a; varlığı ile bana her zaman güç veren değerli oğlum Karan'a teşekkürü bir borç bilirim.

.../.../2023

Neslihan COŞKUN

ÖZET

AKÇAKESME (*Phillyrea latifolia*) BİTKİSİNİN SIVI AZOT ve SOLVENTLER TEKNİĞİ KULLANARAK BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Coşkun, Neslihan

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Isa Karaman

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

Ağustos 2023, xiii + 54 sayfa

Yüzyıldır pek çok sayıda bitki ve ekstraktları hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerin hastalıkları iyileştirme gücü ve bununla ilgili bilgiler, kültürler arasında günümüze kadar aktarılmıştır. Bitkiler ve ekstraktları, bitkinin türüne, konsantrasyonuna ve bileşenlerine bağlı olarak bakterilerde antimikrobiyal etkilere sahiptirler. Bitki kaynaklı ilaçlar mikroorganizma kökenli hastalıkların tedavisinde büyük umut kaynağı olmuştur. Araştırmacılar, bitkilerin kimyasal bileşimlerini ortaya çıkarıp antimikrobiyal mekanizmasını çözmeye çalışmaktadırlar. Tıbbi bitkilerin bazı bileşenlerinin antimikrobiyal özellikleri ve canlı hücrelerdeki mekanizması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Phillyrea latifolia türünün yetiştiği bölgelerde hayvancılık yapan insanların arazideki hayvanları bakteriyel kökenli hastalıklara yakalandıkları bilinmektedir. Özellikle küçükbaş ve büyükbaş hayvanların gözlerinde farklı nedenlerden dolayı göz yüzeyinde duman şeklinde bir problemin olduğu gözlenmiştir. Yetiştiriciler bu problemin üstesinden; bu bitkinin yaprak özütünü hayvanın gözüne püskürterek hayvanın bu problemin üstesinden 24-48 saat gibi bir zaman diliminde geldiklerini ifade etmektedirler. Bu durum bize bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yol gösterici oldu.

Çalışmanın amacı, Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) bitkisinin, sıvı azot ve solventler tekniği kullanılarak, bitkinin yapraklarındaki etken maddenin biyolojik aktivitesinin ve antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesidir. Bunun için çalışmamızda, agar dilüsyon, aquaz ekstraktı, disk difüzyon teknikleri ve bitki yapraklarını sıvı azot yöntemiyle öğütme tekniği kullanılmıştır. Bitki yapraklarını sıvı azot yöntemiyle

öğütme tekniğinde ki amaç; öğütülen bitki yaprağının fizyolojik ve morfolojik değişikliğe uğramadan bu yöntemle saklanmasıdır. Su, kloroform, metanol, etanol ve aseton çözücüler kullanılarak ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için 10 bakteri (*Bacillus cereus* ATCC: - , *Listeria monocytogenes* ATCC:51774, *Staphylococcus aureus* ATCC:6538, *Streptococcus mutans* ATCC:35668, *Clostridium perfringens* ATCC: -, *Klebsiella aerogenes* ATCC:13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:15442, *Escherichia coli* ATCC:35218, *Salmonella enteritidis* ATCC: -) türü kullanıldı. Mikroorganizmalar, Prof. Dr. İsa KARAMAN tarafından Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde oluşturulan kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

Disk difüzyon antibiyotik duyarlılık testi için Erytromycin, Gentomicin, Streptomycin, Tetracycline, Sulbactam / Cefoperazone, Imipenem, Tetracycline (4) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda bu bitkinin yaprak ekstresinden antibakteriyel bir ekstrenin elde edilebileceği ve bu alandaki çalışmalara bir katma değer sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu örnekle Akçakesme bitkisinin antibakteriyel etkisi tespit edilip elde edilen ekstraktın buna benzer hastalıklarda tedavi için kullanılması hedeflenmektedir. Bu sayede bitkinin, antibakteriyel çalışmalarda ilaç olarak kullanılması ve muhtemel doğal kaynaklar olacağı düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda Akçakesme bitkisinden solventlerle elde ettiğimiz etken maddenin pozitif kontrollerle yapılan denemelerinde *Salmonella enteritidis* ATCC: - bakterisinin disk difüzyonu sonucunda oluşan zon çapının Tetracycline antibiyotiği ile eşdeğer (11 mm) zon çapına sahip olduğu ve yine aynı şekilde *Streptococcus mutans* ATCC:35668 bakterisinin disk difüzyonu sonucunda oluşan zon çapının Tetracycline (4) antibiyotiği ile eşdeğer zon çapı (14 mm) verdiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızın sonucuna göre elde edilen verilerin, literatüre katkı sağlamasıyla yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülse de Deneyde bitkinin etken maddesinin 10 bakterinin 8'in de antibakteriyel etkiye rastlanmadı, diğer 2 bakteride oldukça az etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akçakesme, Ekstraksiyon, Antibakteriyel Aktivite, Disk Difüzyon

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT BLACK MAPLE (*Phillyrea latifolia*) USING LIQUID NITROGEN AND SOLVENTS TECHNIQUE

Coşkun, Neslihan

TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY GRADUATE EDUCATION
INSTITUTE

Master of Science, Department of Bioengineering

Thesis Advisor: PROF. Dr. Isa Karaman

BIOENGINEERING DEPARTMENT

August 2023, xiii + 54 pages

Many plants and their extracts have been used in the treatment of diseases for centuries. The power of plants to heal diseases and information about it have been transferred between different cultures before today. Plants and their extracts have antimicrobial effects on bacteria, depending on the type, concentration and components of the plant. Plant-derived drugs have always been a great source of hope in the treatment of diseases of microorganism origin. Researchers have also been trying to unravel the chemical composition of plants and unravel their antimicrobial mechanism. Studies have been conducted on the antimicrobial properties of some components of medicinal plants and their mechanisms in living cells.

It is known that people who engage in animal husbandry in areas where *Phillyrea latifolia* grow are known to catch diseases of bacterial origin. It has been observed that there is a problem in the form of smoke on the eye surface due to different reasons, especially in the eyes of ovine and bovine animals. Breeders overcome this problem; They state that by spraying the leaf extract of this plant into the eyes of the animal, they overcome this problem in a period of 24-48 hours. This situation guided us in the design of this study.

The aim of the study is to examine the biological activity and antimicrobial activity of the active substance in the leaves of the maple plant (*Phillyrea latifolia*) using liquid nitrogen and solvents technique. For this purpose, agar dilution, aqueous extract,

disc diffusion techniques and grinding of plant leaves with liquid nitrogen method were used in our study. The purpose of the grinding technique of plant leaves with liquid nitrogen method; It is the storage of the ground plant leaf with this method without undergoing physiological and morphological changes. Extractions were made using water, chloroform, methanol, ethanol and acetone solvents. The antimicrobial activities of the extracts were determined using the disk diffusion method.

10 bacteria for the determination of antimicrobial activity of plant extracts (*Bacillus cereus* ATCC: - , *Listeria monocytogenes* ATCC:51774, *Staphylococcus aureus* ATCC:6538, *Streptococcus mutans* ATCC:35668, *Clostridium perfringens* ATCC: -, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:130e, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:130e, *Klebsiella pneumoniae* ATCC: Kleb700sie, ATCC:130, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:15442, *Escherichia coli* ATCC:35218, *Salmonella enteritidis* ATCC: -) were used. Microorganisms, Prof. Dr. Provided by İsa KARAMAN from the culture collection created at the Bioengineering Department of Tokat Gaziosmanpaşa University.

Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Tetracycline, Sulbactam / Cefoperazone, Imipenem, Tetracycline (4) antibiotic discs were used for the disc diffusion antibiotic susceptibility test.

In our study, it is thought that an antibacterial extract can be obtained from the leaf extract of this plant and it can provide an added value to the studies in this field. With this example, it is aimed to determine the antibacterial effect of the Akçakesme plant and to use the extract obtained for the treatment of similar diseases. In this way, it is thought that the plant will be used as a medicine in antibacterial studies and will be possible natural sources.

As a result of the study, in the trials with positive controls of the active substance we obtained from the Akçakesme plant with solvents, it was observed that the zone diameter formed as a result of disk diffusion of *Salmonella enteritidis* ATCC: - bacterium had a zone diameter equivalent to Tetracycline antibiotic (11 mm), and in the same way, it was observed that the diameter of the zone formed by the disk diffusion of *Streptococcus mutans* ATCC: 35668 ATCC: 35668 ATCC: 35668 bacterium (14 mm) was equivalent to Tetracycline (4).

Although it is thought that the data obtained according to the results of our study will shed light on new studies to be made by contributing to the literature, no antibacterial

effect was found in 8 of the 10 bacteria of the plant's active substance in the experiment, and it was determined that it was very less effective in the other 2 bacteria.

Keywords: Akçakesme, Extraction, Antibacterial Activity, Disc Diffusion



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. BAKTERİLER	4
2.1.1. Gram Pozitif Bakteriler	4
2.1.1.1. <i>Bacillus cereus</i> (ATCC: -)	4
2.1.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC:51774).....	4
2.1.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC:6538).....	5
2.1.1.4. <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC:356689).....	5
2.1.1.5. <i>Clostridium perfringens</i> (ATCC: -).....	6
2.1.2. Gram Negatifler Bakteriler	6
2.1.2.1. <i>Klebsiella aerogenes</i> (ATCC:13048).....	6
2.1.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC:700603)	6
2.1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC:15442)	7
2.1.2.4. <i>Escherichia coli</i> (ATCC:35218)	7
2.1.2.5. <i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC: -)	7
2.2. EKSTRAKSİYONDA KULLANILAN SOLVENTLER	8
2.2.1. Etanol.....	8
2.2.2. Metanol.....	8
2.2.3. Kloroform	8
2.2.4. Aseton.....	8
2.3. BESİYERLERİ.....	9
2.3.1. Nutrient Agar (NA)	9
2.3.2. Mueller Hinton Agar (Oxoid CM337)	9
2.3.3. Mueller Hinton Broth (Oxoid CM405)	9
2.4. AKÇAKESME BİTKİSİ (<i>Phillyrea latifolia</i>).....	9
3. MATERYAL VE METOD	11
3.1. Kullanılan Malzemeler:	11
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları.....	11
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	12
3.1.3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri	12
3.2. Metod	13

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanması:	13
3.2.1.1. Aquaz Ekstraktı.....	13
3.2.1.2. Akçakesme (<i>Phillyrea latifolia</i>) Bitki Yapraklarının Sıvı Azot Yöntemiyle Öğütülmesi.....	14
3.2.1.3. Solventlerle Ekstrakt Hazırlama.....	19
AKÇAKESME (<i>Phillyrea latifolia</i>) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİNDE AGAR DİLÜSYON VE DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ..	24
4.1. Agar Dilüsyon Yöntemi (18+2 Kuralı)	24
4.2. Disk Difüzyon Yöntemi	35
4.2.1. Agar Difüzyon Yöntemi	35
4.2.2. Kâğıt Disk Agar Difüzyon Yöntemi.....	35
4.2.2.1. Antibiyotik Duyarlılık Testi Yaparken Kullanılacak Besiyeri	37
4.2.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Yaparken Kullanılacak Antimikrobiyal Diskler	37
4.2.2.3. Koloni Seçimi.....	38
4.2.2.4. Antimikrobiyal Disklerin Yerleştirilmesi.....	38
4.2.2.5. İnhibisyon Zonlarının Değerlendirilmesi	39
4.2.2.6. Testin Sonuçlarının Denetlenmesi.....	39
4.2.2.7. Zon Çapının Tanımlanması	39
DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	39
4.3.1. Disk Difüzyonda Etken Madde (E.M.).....	40
4.3.2. Disk Difüzyonda Çözücü Saf Madde - Negatif Kontrol (N.K.).....	40
4.3.3. Disk Difüzyonda Pozitif Kontrol (P.K.).....	40
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ	49
KAYNAKÇA.....	51
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2.1. Akçakesme (<i>Phillyrea latifolia</i>) bitkisinin yaş yaprak kısmı	10
Şekil 3.1. Aguaz ekstrakt yöntemi uygulanmış numune örneği (Beher içinde, *45,50 g blenderda çekilmiş yaş yaprak ve *450 ml distile su bulunmaktadır)	14
Şekil 3.2. Sıvı azot kullanarak Akçakesme (<i>Phillyrea latifolia</i>) bitkisinin yapraklarının parçalanması işlemi.....	15
Şekil 3.3. Sıvı azot kullanarak Akçakesme (<i>Phillyrea latifolia</i>) bitkisinin yapraklarının parçalanıp porselen havanda öğütülmesi işlemi	16
Şekil 3.4. Sıvı azot yöntemiyle parçalanmış numune.....	17
Şekil 3.5. Sıvı azot yöntemiyle parçalanmış ve öğütülmüş numunenin elekten geçirilmesi.....	18
Şekil 3.6. Bitki yaprağının aseton ve metanol solventi ile Muamele edilmesi (Her petri içerisine sıvı azotla öğütülmüş 20 gr' lık bitki yaprağı konulmuştur)	19
Şekil 3.7. Bitki yaprağının aseton ve metanol solventi ile Muamele edilmesi (Her petri içerisine sıvı azotla öğütülmüş 20 gr' lık bitki yaprağı konulmuştur)	20
Şekil 3.8. Whatman No. 1 filtre kağıdından süzdürülmesi işlemi	21
Şekil 3.9. Whatman No. 1 filtre kağıdından tamamen süzdürülmesi ile elde edilen ekstraktlar.....	21
Şekil 3.10. Elde edilen ekstraktların behere aktarılması	22
Şekil 3.11. Elde edilen ekstraktların muamele edildiği solventlerin adlarının yazılı olduğu ilgili beherlere aktarılması	22
Şekil 3.12. Ekstraktların, solventler uçana kadar bekletilmesi.....	23
Şekil 3.13. Solventler uçana kadar ekstraktların bekletilmesi	23
Şekil 3.14. Solventlerin tamamen uçmasıyla geriye kalan kuru ve toz halde ki bitki ekstresi	23
Şekil 4.1. Çalışmada kullandığımız bakterilerin ekildiği, etken maddeyle hazırlanmış besiyerleri.....	26
Şekil 4.2. <i>S. aureus</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi	27
Şekil 4.3. <i>S. enteritidis</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi ..	27

Şekil 4.4. <i>K. pneumoniae</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi	27
Şekil 4.5. <i>K. aerogenes</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi .	28
Şekil 4.6. <i>B. cereus</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi.....	28
Şekil 4.7. <i>S. mutans</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi.....	28
Şekil 4.8. <i>C. perfringens</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi	29
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi.....	29
Şekil 4.10. <i>L. monocytogenes</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi.....	29
Şekil 4.11. <i>P. aeruginosa</i> bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi	30
Şekil 4.12. <i>S. aureus</i> bakteri üremesi	30
Şekil 4.13. <i>E. coli</i> bakteri üremesi.....	31
Şekil 4.14. <i>S. mutans</i> bakteri üremesi.....	31
Şekil 4.15. <i>S. enteritidis</i> bakteri üremesi	32
Şekil 4.16. <i>B. cereus</i> bakteri üremesi	32
Şekil 4.17. <i>C. perfringens</i> bakteri üremesi	33
Şekil 4.18. <i>P. aeruginosa</i> bakteri üremesi.....	33
Şekil 4.19. <i>K. pneumoniae</i> bakteri üremesi	34
Şekil 4.20. Disklerin yerleştirilmesi için petri kaplarının 5 bölmeye ayrılması	41
Şekil 4.21. Bakteri ekilmiş petri kaplarının 5 bölmeye ayrılması	42
Şekil 4.22. 1. tüpte etanol: 200 mg/ml, 2. tüpte metanol: 200 mg/ml, 3. tüpte aseton: 200 mg/ml, 4. tüpte kloroform: 200 mg/ml	43
Şekil 4.23. Bitki ekstresi hangi solventle elde edildiyse o solventin saf haliyle karışımının bulunduğu tüpler.....	43
Şekil 4.24. OXOID Blank (boş) disklerin ve antibiyotik disklerin bölümlere yerleştirilmesi.....	45
Şekil 4.25. Bakteri ekilmiş petrilere ki boş disklerle bitki ekstresinin emdirilmesi	45
Şekil 4.26. Bakteri ekilmiş petrilere yerleştirilen disklerle etken maddelerin emdirilmesi	46
Şekil 4.27. Bakteri ekilmiş petri kaplarında ki disklerde zon oluşumu	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 4.1. Aquaz ekstraktı ile elde edilen örnekten agar dilüsyon tekniği uygulama tablosu.....	25
Tablo 4.2. Agar dilüsyon tekniği sonuç tablosu.....	34
Tablo 4.3. Etken Maddenin Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerinde oluşturduğu zon çapları.....	47
Tablo 4.4. Çalışmada kullanılan ekstraksiyon çözeltilerin (negatif kontrollerin) inhibisyon çapları.....	47
Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan pozitif kontrollerin inhibisyon çapları	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler/Kısaltmalar

°C

%

Mm

µL

ml

L

µm

g

mg/mL

dk

pH

CES

CN

E

Gram (-)

Gram (+)

IPM

LPS

MBC

MHA

MHB

MIC

NA

NB

NE

NK

OXOID

Açıklama

Santigrat Derece

Yüzde

Milimetre

Mikrolitre

Mililitre

Litre

Mikrometre

Gram

Miligram/Mililitre

Dakika

Asitlik derecesi

Sulbactam / cefoperazone

Gentamycin

Erythromycin

Gram Negatif Bakteriler

Gram Pozitif Bakteriler

İmipenem

Lipopolisakkarit

Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

Mueller Hinton Agar

Mueller Hinton Broth

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

Nutrient Agar

Nutrient Broth

No Effect- Etki Yok

Negatif Kontrol

Blank Boş Disk

Simgeler/Kisaltmalar

PDA

S

TE

TE(4)

WHO

Açıklama

Potato Dextrose Agar Besiyeri

Streptomisin

Tetracycline

Tetracycline

Dünya

Sağlık

Teşkilatı



1.GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı çok eski dönemlere kadar uzanır. Ülkemiz de dahil olmak üzere tüm dünya ülkelerinde, halk arasında yüzyıllardır tıbbi açıdan önemli kabul edilen bitkiler kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO), 91 ülkenin farmakope kitapları ve tıbbi bitkiler üzerine yapılan bazı yayınlara dayanarak gerçekleştirdiği bir araştırmada, tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının yaklaşık 20.000 olduğunu belirtmektedir. Ancak, bu bitkilerin sadece 500'ünün tarımsal üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca, farklı amaçlarla kullanılan bitkilerin büyük bir kısmı farmakope kitaplarında yer almamaktadır. Örneğin, Türk farmakopesinde kayıtlı bitki sayısı yaklaşık 140'tır. Oysa Türkiye'de tıbbi amaçlarla tüketilen bitki sayısı oldukça fazladır ve bazı yayınlarda bu sayının en az 500 civarında olduğu belirtilmektedir. (Baytop, 1984; Kırbağ ve Zengin, 2006).

Günümüzde tüketiciler gıda, sağlık, beslenme ve hijyen hakkında daha çok bilgi sahibi oldukça geleneksel tıp ve antibakteriyel ürünlere olan ilgileri artmıştır. Dolayısıyla gelecek yıllarda standartlara uygun antibakteriyel ürün elde etmek için tıbbi bitki üretiminin ve bunlardan elde edilen bitki ekstraktlarının ve bu ürünleri işleyen sanayi kollarının büyümesi ve artması beklenmelidir.

Tıbbi bitkiler hastalıkları önlemek, sağlığı sürdürmek veya hastalıkları iyileştirmek için ilaç olarak kullanılan bitkilerdir. Bu amaçla tıbbi bitkilerden ve bitki ekstresinden elde edilen antibakteriyel aktiviteleri, çeşitli yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır.

Literatürde, çeşitli solventler ile elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivitelerinin olduğu ve bunların direk veya mikrokapsüllenenerek istenen yüzeye uygulandığı görülmektedir.

Antibakteriyel aktivitede mikroorganizma, mikro boyutlu canlılar için kullanılan genel tanımdır. Mikroorganizmalar zararlı olarak bilinse de büyük bir çoğunluğunun sağlık açısından zarar yoktur. Çevreye de faydası bulunan canlılardır. Yalnızca %1'lik kısmı patojenik ve hastalık yapıcı özelliğe sahiptir. Hastalık yapıcı mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerinin olumsuz etkilenmesine antimikrobiyal aktivite denilmektedir.

Maddelerin antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek amacıyla antiviral, antifungal ve antibakteriyel aktivite araştırmaları gerçekleştirilmektedir. Bu araştırmaların hedefi, maddenin antimikrobiyal etkinliğini tespit etmek için çeşitli in vitro yöntemler kullanmaktır. Bu yöntemler, maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemenin yanı sıra, varsa Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumunu belirlemektedir. Antimikrobiyal aktivite testleri içinde, amaçlara en uygun olan yöntemin seçilmesi önemlidir. Bu seçimde, maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü ile birlikte kullanılacak mikroorganizmaların türü, özellikleri ve yoğunluğu etkili olmaktadır. Seçilen yöntem, sonuçların güvenilir, tekrarlanabilir ve en az çaba, en kısa sürede ve ekonomik olarak elde edilmesini sağlamalıdır.

Antimikrobiyal özelliklere sahip bitki bileşenlerinin mikroorganizmalarla etkileşimi birçok araştırmanın konusu olmuştur. Araştırmacılar, doğal bileşiklerin hücrelerde doğrudan veya dolaylı olarak biyokimyasal süreçleri etkileyerek fizikokimyasal bütünlüğü bozduğunu belirtmektedir. Özellikle hidrofobik yapıya sahip olan terpenler, hücre duvarı ile etkileşime girerek hücre duvarının bütünlüğünü bozmaktadır. Terpenlerin hidrofobik özellikleri, hücre duvarındaki lipidlerle etkileşime geçerek lipidlerin bir araya toplanmasına ve zarın geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır. Bu doğal olarak fizikokimyasal yapının bozulmasına, proton hareketi, elektron akışı ve taşımının aksaklıklarına, hücre içeriğinin koagülasyonuna neden olmaktadır. Bir doğal bileşenin hedef bölgeyi etkilemesi zincirleme reaksiyonlara yol açabilir ve benzer hücre hasarına başka bir bölgede de neden olabilir. Ayrıca, antimikrobiyal bileşenlerin hücre duvarındaki proteinleri etkilediği bilinmektedir. (Erdoğan, Everest 2013).

Peki, bu durum Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde nasıl olmaktadır? Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler arasındaki hücre duvarı yapısındaki farklılıklar önemli bir konudur. Gram negatif bakteriler, dış membranlarıyla hidrofobik bileşiklere karşı koruyucu bir bariyer geliştirdiği tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerde ise sitoplazmik membran ve peptidoglikan tabaka art arda bulunur. Geniş bir alana yayılan teikoik asit içeren peptidoglikan yapı, Gram (+) bakteri hücre duvarının önemli bir bileşenidir. Bu bileşen sahip hücre duvarı bulunan bakteriler ozmotik lizise ve mekanik etkilere karşı dirençlidir. Gram negatif bakteriler de Gram pozitiflerden farklı olarak ikincil bir dış membran bulunur. Gram negatif bakterilerde sitoplazmik membran, ince

bir peptidoglikan tabaka ve ardından bir dış membran bulunur. Peptidoglikan tabakası Gram negatif bakterilerde çok ince bir tabakadır, ancak asıl farklılık en dış membran olan lipopolisakkarit (LPS) tabakasında ortaya çıkar. LPS tabakası, bakterinin hidrofobisitesini artırır, ozmotik basınca karşı dayanıklılığını sağlar ve bakterinin patojenik etkisine katkıda bulunur. LPS, porin kanal proteinlerdeki değişiklikler, hidrofilik moleküllerin girişini engellerken, aşırı hidrofobik moleküllerin hücreye girişini yavaşlatır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, doğal direncin sitoplazmik membranda bulunan aktif pompa proteinleri tarafından sağlandığını ortaya koymuştur. Bu mekanizma Gram negatif bakterilerde yaygın olarak görülürken, Gram pozitifler de saptanmıştır (Erdoğan, Everest 2013).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. BAKTERİLER

2.1.1. Gram Pozitif Bakteriler

2.1.1.1. *Bacillus cereus* (ATCC: -)

Gram pozitif, aerob veya fakültatif anaerob bir mikroorganizmadır. Çomak şeklinde olup 3-5 µm uzunluğunda ve 1.0-1.2 µm genişliğindedir. Ayrıca spor oluşturma yeteneğine sahiptir. *B. cereus* endosporları, bakterinin olumsuz koşullara karşı daha dayanıklı olmasını sağlar ve sentral veya subterminal olarak yerleşmiştir. *B. cereus* geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilir, ancak optimum üreme sıcaklığı 30 °C'dir. Sporların optimum sıcaklıkta çimlenmesi için gereken sıcaklık 30 °C, minimum sıcaklık -1 °C ve maksimum sıcaklık 59 °C' dir. Genel olarak %7.5 tuz içeren ortamlarda üreyebilir, ancak bazı suşları %10 tuz içeren ortamlarda bile üremeyi sürdürebilir. *B. cereus*, minimum su aktivitesi (aw) değeri 0.91-0.93 olan ortamlarda gelişebilir ve pH aralığı 4.9-9.3' te büyüyebilir. Hücre dışı olarak enzim ve toksin sentezleme yeteneğine sahiptir. Lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz, fosfolipaz gibi aktivitelere sahiptir ve nitratı indirgeyebilir. Polimiksin ve ampisiline dirençlidir. *B. cereus* sporları, metabolik aktivite göstermeden yıllarca canlılıklarını sürdürebilir. Spor oluşum süresi yaklaşık 6 saat sürer ve sporlar ısıya, kurumaya, toksik kimyasallara, UV ve gama ışınlarına ve diğer çevresel koşullara karşı oldukça dirençlidir (Yurdakul, Keyvan, Kahraman, Şen, Bayraktaroğlu, 2018).

2.1.1.2. *Listeria monocytogenes* (ATCC:51774)

Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, kapsülsüz ve sporsuz bir bakteridir. Hücreler kısa, yuvarlak uçlu çubuk veya kokobasil şeklindedir. 0.5-2.0 µm uzunluğunda olup 0.4-0.5 µm enindedir. Genellikle optimum büyüme sıcaklığı 35-37 °C olmakla birlikte, suşlar 1-45 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da gelişebilirler (Juntilla ve ark.,1988; Norrung, B., 2000). Peritrik flagellalarıyla 20-25 °C' de 24 saatlik kültürlerde aktif olarak hareket

eder. 37 °C' de hareketleri yavaştır. Halotolerant olarak kabul edilirler ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında (%10-12) bile çoğalabilirler. Minimum su aktivitesi (A_w) 0.92 olarak belirlenmiştir (Farber, 1991; Norrung, 2000). *L. monocytogenes* pH 4.1-9.6 aralığında çoğalabilir, ancak optimum pH değerleri 6.0-8.0 arasındadır. Metil Red, Voges-Proskauer ve katalaz reaksiyonları pozitif, indol, oksidaz ve üre reaksiyonları ise negatiftir. Karbonhidratlardan asit oluştururlar, ancak gaz üretmezler (Müller, 1988). Ayrıca, hemolitikler ve kanlı agarda β -hemoliz oluştururlar (Lee ve ark., 2007).

2.1.1.3. *Staphylococcus aureus* (ATCC:6538)

Yuvarlak şekilde olan ve Gram pozitif olan bu bakteriler hareketsizdir. Spor oluşturma yetenekleri yoktur. Yaklaşık 1 μ m çapa sahip fakültatif anaerobik bakterilerdir, ancak aerobik koşullarda daha hızlı gelişirler. *S. aureus* için optimum üreme sıcaklığı 30-37 °C' dir ve optimal pH değeri 7-7.5' tir. Bazı suşları kapsül oluşturabilir. Katı besiyerinde ürettiklerinde, üzüm salkımına benzer kümeler oluşturan dik iki yüzeyde bölünmeler gerçekleşir. Sıvı besiyerinde ürettiklerinde ise kısa zincirler ve diplokoklar oluştururlar. Birçok bakteri 60 °C' de 30 dakikada inaktif olurken, *S. aureus* bakterileri ısıya dirençli nükleazlar ürettikleri için daha dayanıklıdır. Kültürleri 4 °C' de ve oda sıcaklığında aylarca canlılıklarını koruyabilirler. Bu nedenle toprakta, tozda, eşyalarda ve insan ile hayvanların ağız, deri ve nazofarinks florasında çokça bulunurlar. *Staphylococcus*'lardan kaynaklı deri enfeksiyonları, insanlarda en sık karşılaşılan *Staphylococcus* hastalıklarıdır (Ereçevit, 2007).

2.1.1.4. *Streptococcus mutans* (ATCC:356689)

1924 yılında İngiltere'de doktor J.K Clark tarafından bir çocuk dişindeki çürük lezyonundan *Streptococcus* izole edilmiş ve gram boyamada daha oval gözüken bu streptokoklara mutant anlamında *S. mutans* demiştir. Kapsamlı taksonomik çalışmalar bu organizmaların, hareketsiz, kapsülsüz, katalaz ve oksidaz yanıtları negatif, gram pozitif, 0.5-0.75 μ m çapınlı kısa ve orta zincirler halinde bulunan, kok şeklinde bakteriler olduğunu göstermiştir (Salmanlı, 2020).

2.1.1.5. *Clostridium perfringens* (ATCC: -)

Gram pozitif, spor oluşturan, anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. *C. Perfringens* şu anda bilinen en hızlı büyüyen organizmalardan birini temsil eder ve en uygun ortamda 43 °C' de ve 37 °C' de 12–17 dakika kültürlendiğinde çok kısa bir 8–12 dakikalık üretim süresine sahip olduğu bildirilir. *C. perfringens* genellikle katı bir anaerob olarak bilinir; bununla birlikte, bu bakteri oksijen varlığında ve/veya düşük konsantrasyonlarda süperoksit veya hidroksil radikali oluşturan bileşiklerin varlığında da hayatta kalabilir. *C. perfringens* suşlarının, genellikle toksinler ve antimikrobiyaller dahil olmak üzere virülansla ilişkili proteinleri kodlayan plazmitleri taşıdığı bilinmektedir (Kiu ve Hall, 2018).

2.1.2. Gram Negatifler Bakteriler

2.1.2.1. *Klebsiella aerogenes* (ATCC:13048)

Gram-negatif ve rod şeklinde olan *K. aerogenes*, suda, havada ve toprakta yaygın olarak bulunan bir türdür. Aynı zamanda, insan ve hayvanların gastrointestinal kanalında da normal mikrobiyotanın bir elemanı olarak yer almaktadır (Küçükyıldırım, 2020).

2.1.2.2. *Klebsiella pneumoniae* (ATCC:700603)

Bu bakteriler, sporsuz, kısa ve yuvarlak uçlu basiller olup hareketsizdirler. Boyutları yaklaşık 1,2 µm uzunluğunda ve 0.5-0.8 µm genişliğindedir. Gram negatif, kapsüllü (polisakkarit yapısında) ve aerobik veya fakültatif anaerobik özelliklere sahiplerdir. 37 °C' de ve pH 7' de iyi bir şekilde ürerler. Doğada çok miktarda bulunurlar, kuru ortama dayanıklıdır ancak sıcaklığa karşı hassastırlar. *K. pneumoniae* bakterileri oda ısısında haftalar boyu ve 4 °C' de aylar boyu canlılıklarını sürdürebilirler (Şen, 2011).

2.1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:15442)

Bu bakteriler, 0,6–2 µm boyunda olan Gram (-) basillerdir. Hareket yetenekleri polar konumlu flagellarlarıyla sağlanır. Tek tek halde, çift ve kısa zincirler şeklinde bulunabilirler. Bakterinin etrafında ekstrasellüler polisakkarit yapısında bir tabaka bulunur. Fermantasyon yapamazlar, ancak glukozu okside edebilirler. Azami oranda besin bulunan nemli ortamlarda aerobik olarak üreyebilirler. Optimum üreme sıcaklığı 37 °C' dir. Doğada oldukça yaygındırlar ve insan ve hayvan bağırsaklarında bulunurlar. Bu mikroorganizma, çokça kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir. Bu direnç, bakteri hücrelerinde bulunan R plazmitlerindeki genler tarafından sağlanmaktadır (Hacıoğlu, 2005; Şen 2011).

2.1.2.4. *Escherichia coli* (ATCC:35218)

E. coli, 2-6 µm uzunluğunda ve 1-1.5 µm genişliğinde düz basil şeklindeki bakteriler olup Gram negatif özellik gösterirler. Bazen hareketli olabilirler. S tipi koloniler oluştururlar, çapları 1-2 mm arasındadır. Spor oluşturma yetenekleri yoktur. Fakültatif anaerobiktirler ve optimal üreme sıcaklığı 37 °C, optimal pH ise 7-7.2' dir. Isıya karşı fazla dirençli değildirler. 55 °C' de 1 saat, 60 °C' de 20 dakika kadar dayanabilirler (Ereçevit, 2007). Bazı boyar maddelere (Malaşit yeşili, Füksin vb.), dezenfektanlara, safra ve safra tuzlarına, %7 NaCl' e karşı duyarlıdırlar, ancak ısıya ve soğuğa karşı dirençlidirler.

2.1.2.5. *Salmonella enteritidis* (ATCC: -)

Salmonella türleri, Gram negatif bakteriler olup çomak şeklindedirler. Aerob (oksijenli) veya fakültatif anaerobik ortamlarda gelişebilme yeteneklerine sahiptirler. Boyutları 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm arasında değişir. Türlerinin birçoğu fiziksel etkilere dayanıklılık gösterir. Ancak 54,4 °C' de 1 saat veya 60 °C' de 15 dakika ısıtıldıklarında dayanıklılıklarını yitirirler. *Salmonella* türleri kapsülsüz ve sporsuzdurlar. *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* türleri hareketsizken, diğer *Salmonella* türleri hareketlidir (Temiz ve Vazgeçer 2005, Ellermeier ve Slauch 2006).

2.2. EKSTRAKSİYONDA KULLANILAN SOLVENTLER

2.2.1. Etanol

Etil alkol (etanol), ekstraksiyonda kullanılan bir çözücünün polarite indeksi 5.2 olarak belirlenmiştir. Molekülün karbonhidrojen ve karbon-karbon bağları apolar özellik gösterirken, oksijen-hidrojen ve karbon-oksijen bağları polar özelliktedir. Bu nedenle etil alkolün bir ucu polar, diğer ucu ise apolar özellik taşır. Bu özelliği sayesinde etil alkol, hem polar hem de apolar maddeler için iyi bir çözücüdür. Kimyasal formülü C_2H_6O veya $EtOH$ (C_2H_5OH) olarak ifade edilir. Etanolün kaynama noktası ise $78.4\text{ }^{\circ}C$ ' dir (Arslan, 2007).

2.2.2. Metanol

Metanol (metil alkol veya karbinol olarak da bilinir), polar çözücü olup belirlenen polarite indeksi 6.6' tır. CH_3OH formülüne sahip olan metanol, en basit yapıya sahip alkol olup saf metanol, 1 atm'de $64.6\text{ }^{\circ}C$ ' de kaynar ve parıltısız mavimsi bir alevle yanar. Metanol, organik çözücülerin herhangi birinde her oranda çözünme özelliğine sahiptir. Metanolün çok azı bile canlı organizmalar için zehirli bir yapıya sahiptir. (Anonim, 2012).

2.2.3. Kloroform

Kloroform (triklormetan olarak da bilinir), apolar bir çözücüdür ve polarite indeksi 4.4 olarak belirlenmiştir. $CHCl_3$ kimyasal formülüne sahip olan kloroform, anestezik (uyuşturucu) etkiye sahip bir maddedir. Ağır, renksiz bir sıvı olup $61\text{ }^{\circ}C$ ' de kaynar. Özellikle yağları çok iyi çözme yeteneği, kloroformun karakteristik özelliğidir (Anonim, 2012).

2.2.4. Aseton

Aseton ($CH_3-CO-CH_3$),Organik polar bir solvent olan aseton selülozu bir türevine çevirmeden çözeabilen, toksisite ve diğer kimyasal riskleri düşük çözücüler olan iyonik sıvıdır. Aseton çok düşük polariteye sahiptir. Ekstraksiyon için kritik sıcaklığı $235,1\text{ }^{\circ}C$ ' dir (Gündoğdu,2007).

2.3. BESİYERLERİ

2.3.1. Nutrient Agar (NA)

Bakterilerin uygun koşullarda çoğalması ve üremesi için, 1 litre destile suda 20 gr Nutrient Agar (NA) besiyeri ilave edilip hazırlanmıştır. Daha sonra da manyetik karıştırıcıda ısıtılarak tümüyle eriyip bitene dek, 121 °C ısı da 15 dakika otoklava konularak sterilize edilmiştir.

2.3.2. Mueller Hinton Agar (Oxoid CM337)

Müeller Hinton Agar, bakteri suşlarının çoğaltılması, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) belirlenmesi için kullanılan bir besiyeridir. Müeller Hinton Agar'ın hazırlanması için 1 litre distile suya 38 gram eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonra bu karışım 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Ardından 50 °C' ye kadar soğutulup steril petri kaplarına 4 mm kalınlığında yayılmıştır.

2.3.3. Mueller Hinton Broth (Oxoid CM405)

Mueller Hinton Broth, bakteri süspansiyonlarının ayarlanması ve MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) belirlenmesi için kullanılan bir besiyeridir. Hazırlanması için 21 gram Mueller Hinton Broth tozu tartılır ve üzerine 1000 ml distile su eklenir. Elde edilen karışım 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilir.

2.4. AKÇAKESME BİTKİSİ (*Phillyrea latifolia*)

Akçakesme (*Phillyrea latifolia*), Oleaceae familyasının *Phillyrea L.* cinsine ait bir bitki türüdür. Türkiye'de Akçakesme olarak bilinir (Kaya ve Aladağ, 2009). Bu bitki genellikle çalı formunda olup, bazen 9 metreye kadar büyüeyebilen küçük ağaçlardır. Tomurcuklar ve genç sürgünler tüylü bir yapıya sahiptir. Yaprakları koyu yeşil renkte olup, yumurtamsı ve cilalı bir görünüme sahiptir. Boyutları 1-4 cm uzunluğunda ve 0.5-2.5 cm genişliğindedir. Kenarları dişli veya testere dişli olabilir ve nadiren tamdır. Çiçekler sarımtırak renkte olup, taç lobları üçgenimsi ve lob kenarları silli bir yapıya sahiptir. Taçların uzunluğu genellikle 2-2.5 mm' dir. Akçakesme (*Phillyrea latifolia*)

genellikle kuraklığa dayanıklı olduğu morfolojik ve ekofizyolojik özellikleri nedeniyle bilinir (Oppenheimer, 1953; Pignatti, 1982; Gellini vd., 1983; Barka, 2019). Çoğunlukla makilik bölgelerde, kurak alanlarda, yaprak döken *Quercus* ormanlarında veya *Pinus brutia* yaygın olarak bulunur. Deniz seviyesinden 10-1350 m yüksekliklerde bulunabilir. Bitki, ülkemizde Tokat, Aydın, Trabzon, Balıkesir, Muğla, Çanakkale, Isparta, Zonguldak, İstanbul, Sakarya, İçel, Sinop ve Tekirdağ illerinde bulunur. Akçakesme, çok yıllık ve herdem yeşil bir bitkidir. (Anonim, 2012 b; Akbağ, 2013).



Şekil 2.1. Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) bitkisinin yaş yaprak kısmı

Akdeniz bölgesinin tıbbi tarihinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Pieroni ve Pachaly, 2000; Barka 2019). Akçakesmenin yapraklarından ve meyvelerinden hazırlanan infüzyonlar kanamayı durdurucu, idrar söktürücü, ağız ülseri ve iltihaplanmasında tedavi edici olarak kullanılır (Diaz vd., 2000, 2001; Barka 2019).

Ürdün’de akçakesme sarılık hastalığının tedavisinde kullanılan en etkili tıbbi bitkidir (Janakat ve Al-Merie, 2002; Barka, 2019).

Yapılan çalışmalara bakıldığında akçakesme bitkisinin yapısında flavonoid glikozitlerini lignan ve fenilpropanoidinlerin varlığı ortaya çıkmıştır. Bitkinin ekstraktları incelendiğinde quercetin, luteolin, tyrosol, cyanidin ve apigenin içerdiği de çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre akçakesme bitkisi yaprak ve meyvelerinin antibakteriyel özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. *P.latifolia* (akçakesme) bitki yaprakları ile ilgili önceki veriler triterpenoid bileşiklerin, flavonoid glikozitlerin, lignan ve fenilpropanoidin varlığını ortaya çıkarmıştır (Agati, Galardi, Gravano, Romani ve Tattini, 2002; Uysal, 2020; Akçalı, Tunçkol, Buharalı, 2022). Çalışmalarda bitki ekstraktlarından izole edilen bileşiklerin antibakteriyel özelliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek için disk difüzyon yöntemi ile ön tarama çalışması yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Malzemeler:

Bu araştırmada kullanılan Akçakesme bitkisi, Balıkesir yöresinden bitkinin taze yaprak kısmı toplanarak temin edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Antibakteriyel çalışılmalarda kullanılan bakteri suşları Tokat Gaziosmanpaşa üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik bölümünde Prof. Dr. İsa KARAMAN stok kültüründen temin edilmiştir.

Çalışma esnasında kullanılmakta olan bakteri türleri ise;

- *Bacillus cereus* (ATCC: -)
- *Listeria monocytogenes* (ATCC:51774)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC:6538)
- *Streptococcus mutans* (ATCC:35668)
- *Clostridium perfringens* (ATCC: -)

- *Klebsiella aerogenes* (ATCC:13048)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC:700603)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:15442)
- *Escherichia coli* (ATCC:35218)
- *Salmonella enteritidis* (ATCC: -)

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

- Nutrient Agar Besiyeri (NA)
- Nutrient Broth Besiyeri (NB) (Prof. Dr. İsa KARAMAN tarafından temin edilmiştir)
- Sıvı Azot
- Etanol
- Metanol
- Kloroform
- Aseton
- OXOID (Blank boş disk)
- Erythromycin
- Gentamicin
- Streptomycin
- Tetracycline(4)
- Sulbactam / cefoperazone
- Imipenem
- Tetracycline

3.1.3 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

- Hassas terazi
- İnkübatör
- Vorteks
- +4 °C Buzdolabı
- Steril kabin
- Distile su

- Pens
- Falcon tüpleri
- Class 2 Steril kabin
- Steril boş antibiyotik diskleri (OXOID)
- Cam, plastik petri kapları
- Manyetik karıştırıcı
- Cam beher
- Otoklav cihazı
- Etüv
- Otomatik pipetler (100-1000 ul, 10-100 ul)
- Pipet uçları
- Bek alevi
- Metal öze
- Porselen ve metal havan
- Manyetik karıştırıcı
- Erlenmayer
- Santrifüj

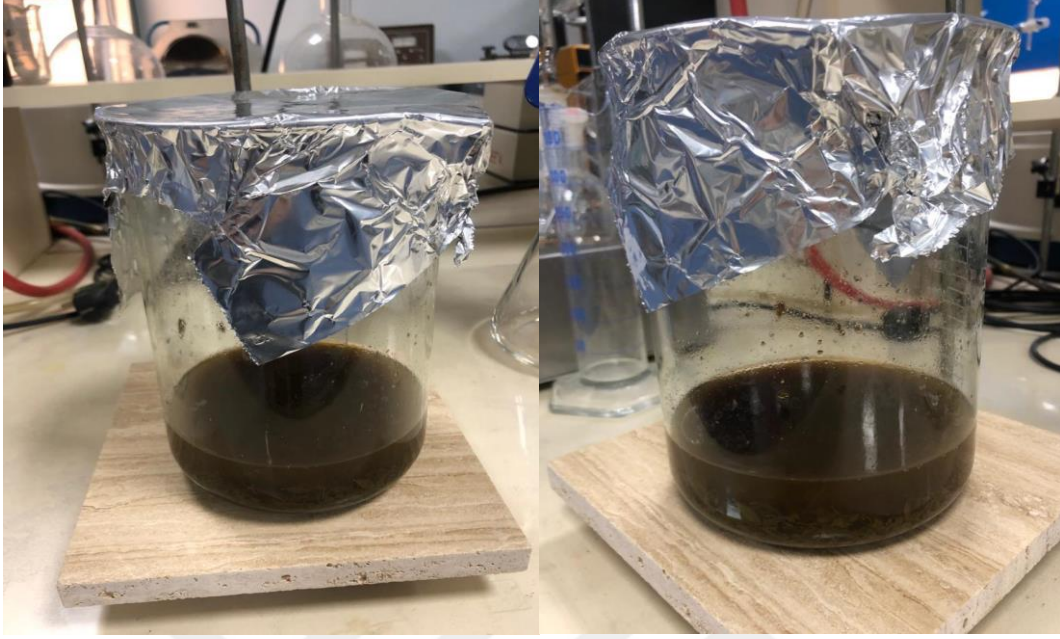
3.2. Metod

3.2.1. Ekstraktların Hazırlanması:

Akçakesme bitkisinin antibakteriyel özelliklerini belirlemek amacıyla Balıkesir yöresinden 1,5-2 kg miktarında bitkinin yaprak kısmı taze olarak toplanmıştır. Ekstraktlar bu yapraklarla hazırlanmıştır.

3.2.1.1. Aquaz Ekstraktı

Toplanan Akçakesme bitki örneklerinin yapraklarının 45,50 g' lık yaş örneği aquaz ekstrakt işlemi uygulanmıştır. 45,50 g' lık yaş yapraklar blenderda çekilmiştir. Çekilip öğütülmüş olan yaş yapraklar behere konulup üzerine 450 ml distile su eklenmiştir. Bu karışım manyetik karıştırıcıda içine balık atılarak 100 °C' de 304 rpm' de 28 saat çalkalanmıştır.



Şekil 3.1. Aquaz ekstrakt yöntemi uygulanmış numune örneği (Beher içinde, *45,50 g blenderda çekilmiş yaş yaprak ve *450 ml distile su bulunmaktadır)

3.2.1.2. Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) Bitki Yapraklarının Sıvı Azot Yöntemiyle Öğütülmesi

Topladığımız yaş bitki yapraklarından geriye kalanların tümü porselen havana konulmuştur. Aynı havan içine -196°C ' de ki sıvı azot yavaş yavaş dökülürken bir taraftan da örnekler sıvı azot varlığında iyice dövülmüştür. Sıvı azotla parçalanıp dövülmüş örnek blendera konulup çekilip homojen toz bir yapı haline getirilmiştir. İyice öğütülmüş olmasına dikkat edilmiştir.

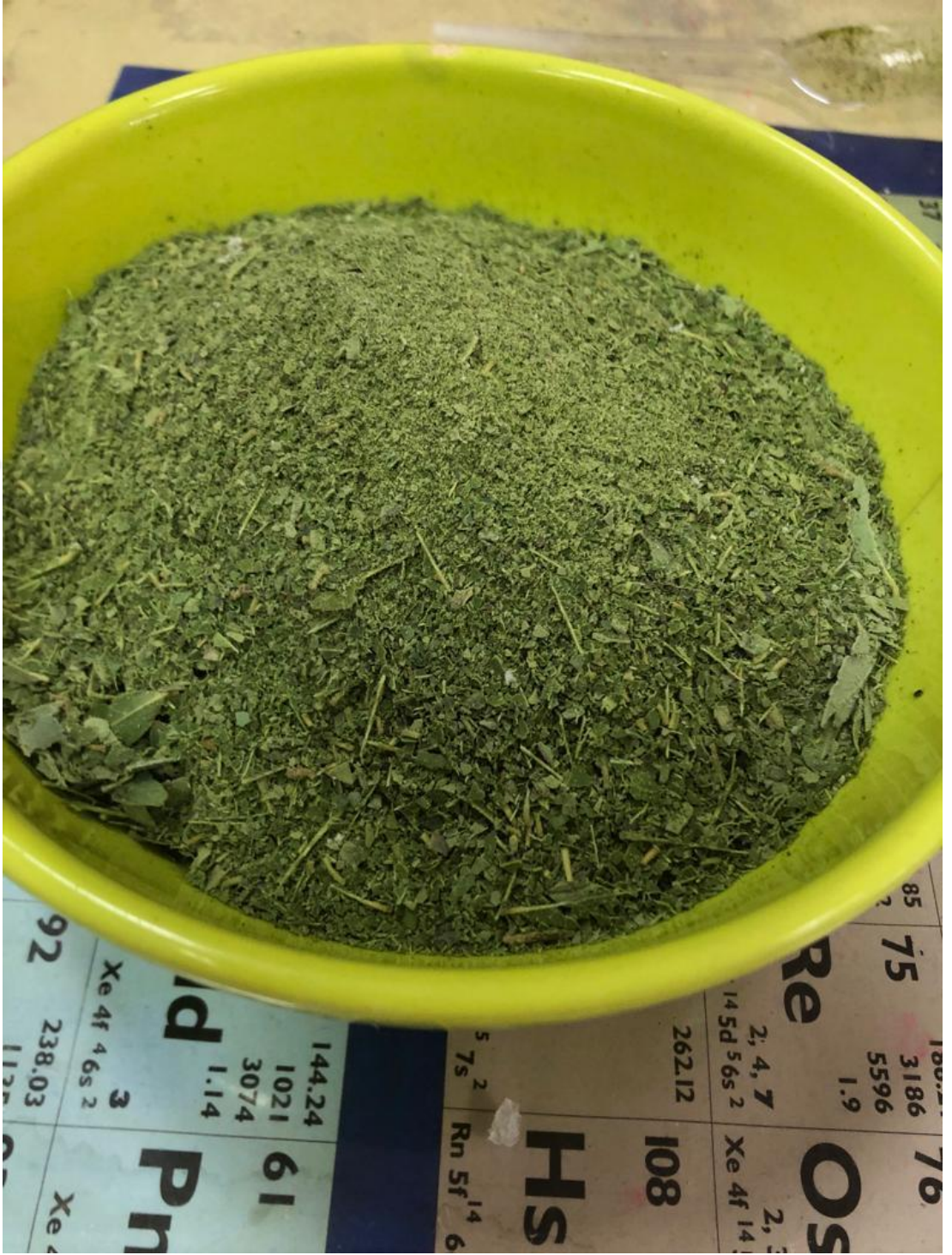
Sıvı azotla öğütme yöntemini seçmemizde ki amaç ise biyolojik materyalin canlı olarak dondurulup ultra düşük ısılarda (-196°C 'de sıvı azot içerisinde) uzun süre muhafaza edilebilmesidir. Teorik olarak bu düşük sıcaklıklarda bütün metabolik faaliyetleri minimuma indirip ve genetik yönden bir değişiklik meydana gelmemesi amaçlanmıştır. Bu yöntemin amacı; bitki yaprağının hemen hemen tüm metabolik faaliyetlerinin yavaşlaması ve kontaminasyondan materyalin korunabilmesi temeline dayanmaktadır.



Şekil 3.2. Sıvı azot kullanarak Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) bitkisinin yapraklarının parçalanması işlemi



Şekil 3.3. Sıvı azot kullanarak Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) bitkisinin yapraklarının parçalanıp porselen havanda öğütülmesi işlemi



Şekil 3.4. Sıvı azot yöntemiyle parçalanmış numune



Şekil 3.5. Sıvı azot yöntemiyle parçalanmış ve öğütülmüş numunenin elekten geçirilmesi

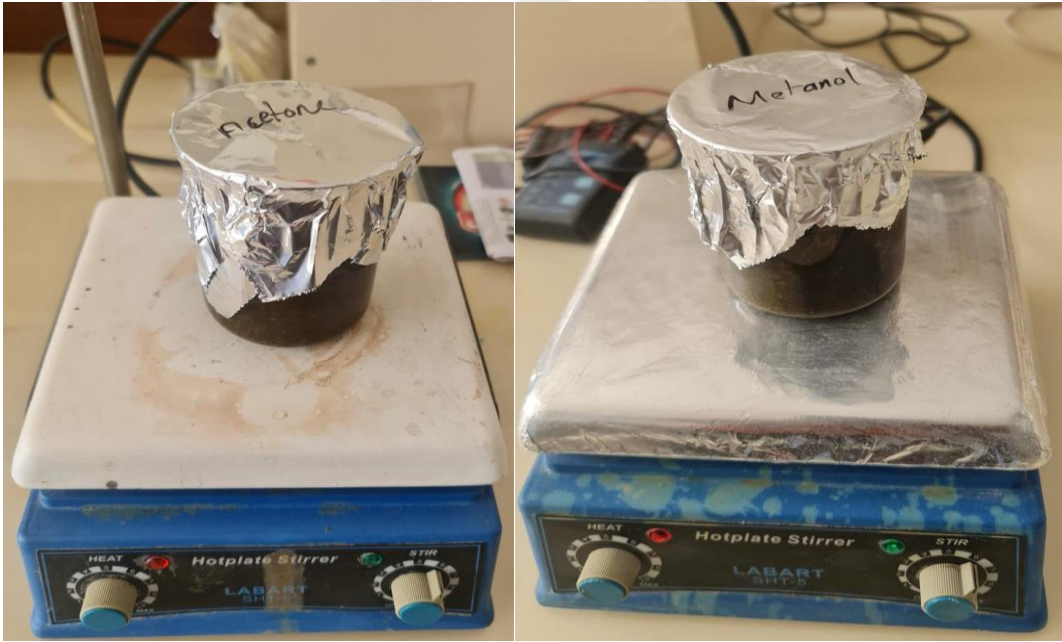
3.2.1.3. Solventlerle Ekstrakt Hazırlama

Toz haline getirilmiş bitkilerin sulu kloroform,aseton ,metanol ve etanolik özütlerrinin çıkarılması işleminde (Bilen, vd., 22 2016);

200 ml'lik 4 ayrı beher kabının herbirine, sıvı azotla öğütölmüş örneklerden 20 gr. konulmuştur.

1. Beher içerrisine 150 ml aseton,
2. Beher içerrisine 150 ml metanol,
3. Beher içerrisine 150 ml etanol,
4. Beher içerrisine 150 ml kloroform konulmuştur ve ağızları sıkıca kapatılmıştır.

Her biri aynı anda manyetik karıştırıcıda içlerine balık atılarak 100 °C' de 304 rpm' de 28 saat çalkalanmıştır.



1.150 ml Aseton

2.150 ml Metanol

Şekil 3.6. Bitki yaprağının aseton ve metanol solventi ile Muamele edilmesi (Her bir beher içerrisine sıvı azotla öğütölmüş 20 gr' lık bitki yaprağı konulmuştur)

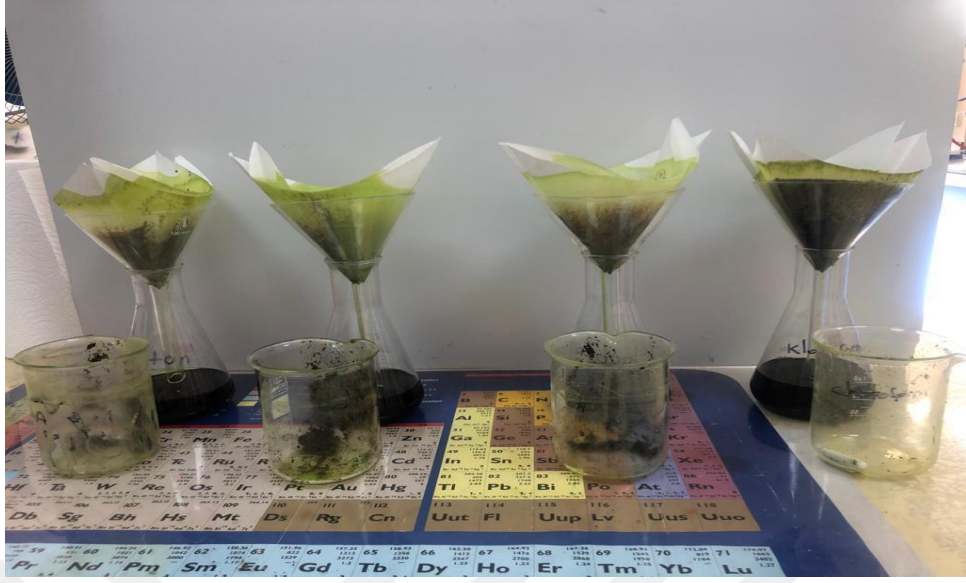


3.150 ml Etanol

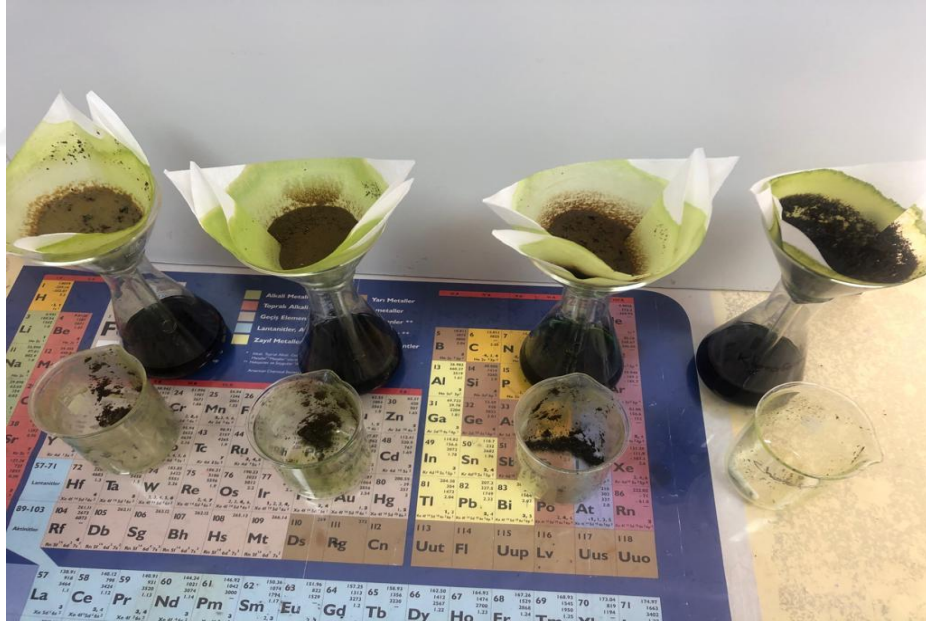
4.150 ml Kloroform

Şekil 3.7. Bitki yaprağının aseton ve metanol solventi ile Muamele edilmesi (Her bir beher içerisinde sıvı azotla öğütülmüş 20 gr' lık bitki yaprağı konulmuştur)

Akçakesme bitkisinin farklı solventlerle muamelesi sonrasında elde edilen ekstraktlar, ağızlarına Whatman No. 1 filtre kağıdı konulmuş 4 ayrı erlene süzdürülmüştür. Kağıtlarda ki karışımların tamamının erlene süzülmesi beklenmiştir. Süzülme işlemi tamamlandıktan sonra kağıtlar alınmıştır. Erlene süzülen solventli karışımlar beherlere solvent adları yazılarak ilgili karışımların adının yazılı olduğu beherlere aktarılmıştır.



Şekil 3.8. Whatman No. 1 filtre kağıdından süzdürülmesi işlemi

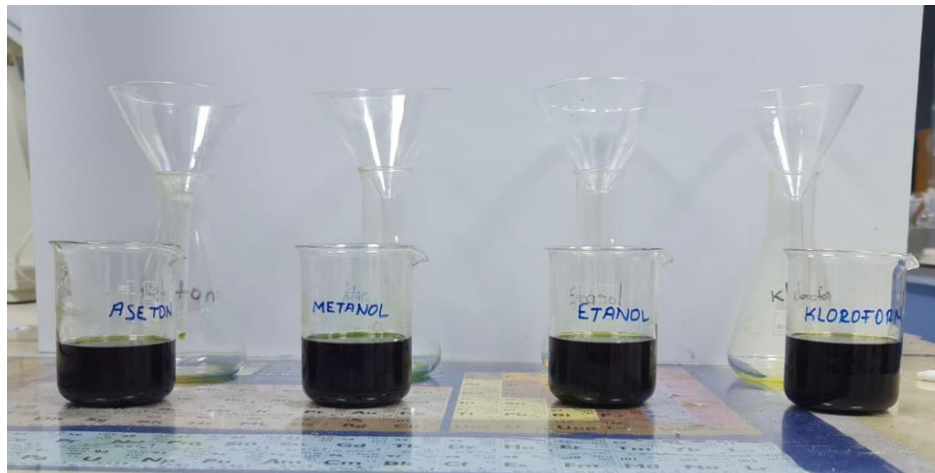


Şekil 3.9. Whatman No. 1 filtre kağıdından tamamen süzdürülmesi ile elde edilen ekstraktlar

1. Erlendeki asetonlu numune, aseton yazılı olana behere,
2. Erlendeki metanollu numune, metanol yazılı olana behere,
3. Erlendeki etanollu numune, etanol yazılı olana behere,
4. Erlendeki kloroformlu numune, kloroform yazılı olana behere aktarılmıştır.



Şekil 3.10. Elde edilen ekstraktların behere aktarılması



Şekil 3.11. Elde edilen ekstraktların muamale edildiği solventlerin adlarının yazılı olduğu ilgili beherlere aktarılması

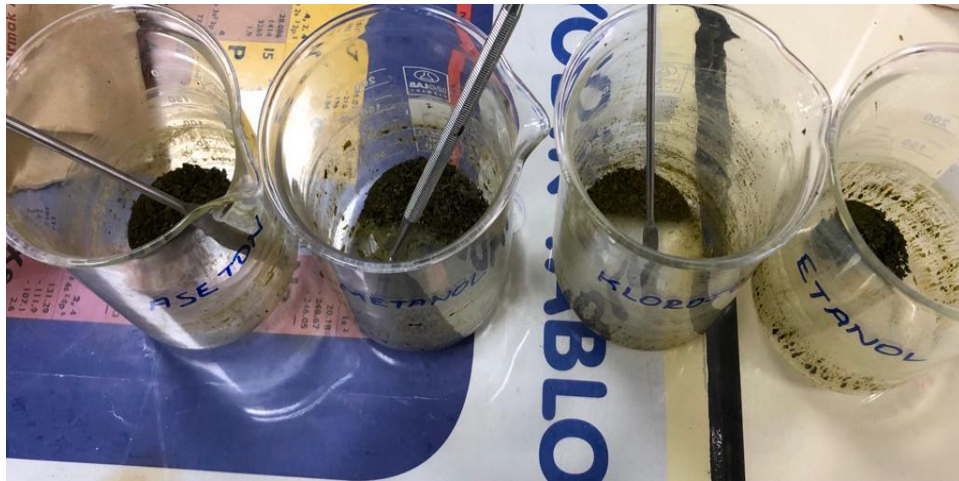
Behere dökülen solventli karışım, solvent uçup içindeki maddeler kalana kadar bekletildi.



Şekil 3.12. Ekstraktların, solventler uçana kadar bekletilmesi



Şekil 3.13. Solventler uçana kadar ekstraktların bekletilmesi



Şekil 3.14. Solventlerin tamamen uçmasıyla geriye kalan kuru ve toz haldeki bitki ekstresi

AKÇAKESME (*Phillyrea latifolia*) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN ANTİBAKTERİYEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİNDE AGAR DİLÜSYON VE DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ

Solventlerle ekstraksiyon işleminin bekleme süresinde, aquaz ekstraktı yöntemi uyguladığımız diğer örnek ile agar dilüsyon yapılmıştır.

Bitkinin antibakteriyel özelliklerini belirlemek için iki farklı yöntem kullanılmıştır: kantitatif ve kalitatif yöntemler. Kantitatif yöntem olarak sıvı besiyerinde dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Kalitatif yöntem ise disk difüzyon yöntemi olarak adlandırılan bir yöntemdir. Bu tekniklerle bitkinin antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiştir.

4.1. Agar Dilüsyon Yöntemi (18+2 Kuralı)

Agar dilüsyon testi, bakteriyel büyümeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunu (MIC) belirlemek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, geometrik bir artışla (genellikle iki kat artışla) antibiyotik konsantrasyonları agar besiyerine eklenir. Ardından belirli sayıda (genellikle 104) bakteri inoküle edilir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri üzerinde bakteriyel büyüme gözlenir. Agar dilüsyon testi, aynı anda birden fazla bakteriye karşı test yapma imkanı sağlar.

1/1 oranında; 18 ml agar + 4 ml etken madde

1/2 oranında; 18 ml agar + 2 ml etken madde

1/4 oranında; 18 ml agar + 1 ml etken madde

1/8 oranında; 18 ml agar + 0,5 ml etken madde

1/16 oranında; 18 ml agar + 0,25 ml etken madde

Bu teknik için gerekli olana agarın hazırlanışı;

- LB Broth (Miller)
- Bacto-agar
- 1,5 L distile su

Erlen içerisine 1,5 L distile su, 37,5 g LB, 22,5 g bacto-agar ekleyip içine balık atıp manyetik karıştırıcıda 300 rpm' de 100 °C' de kaynayıncaya kadar çalkalanmıştır. Agar kaynadıktan sonra ağız alüminyum folyo ile iyice kapatıp, otaklava atıp, 121 °C sıcaklıkta 15-20 dakikada sterilizasyon yapılmıştır.

5 adet boş petri kabına sırasıyla;

1. Petriye (1/1 oranında etken madde)
10 ml+8 ml agar
4 ml aquaz ekstrakt
2. Petriye (1/2 oranında etken madde)
10 ml+8 ml agar
2 ml aquaz ekstrakt
3. Petriye (1/4 oranında etken madde)
10 ml+8 ml agar
1 ml aquaz ekstrakt
4. Petriye (1/8 oranında etken madde)
10 ml+8 ml agar
0,5 ml aquaz ekstrakt
5. Petriye (1/16 oranında etken madde)
10 ml+8 ml agar
0,25 ml aquaz ekstrakt işlemi uygulanmıştır.

Tablo 4.1. Aquaz ekstraktı ile elde edilen örnekten agar dilüsyon tekniğı uygulama tablosu

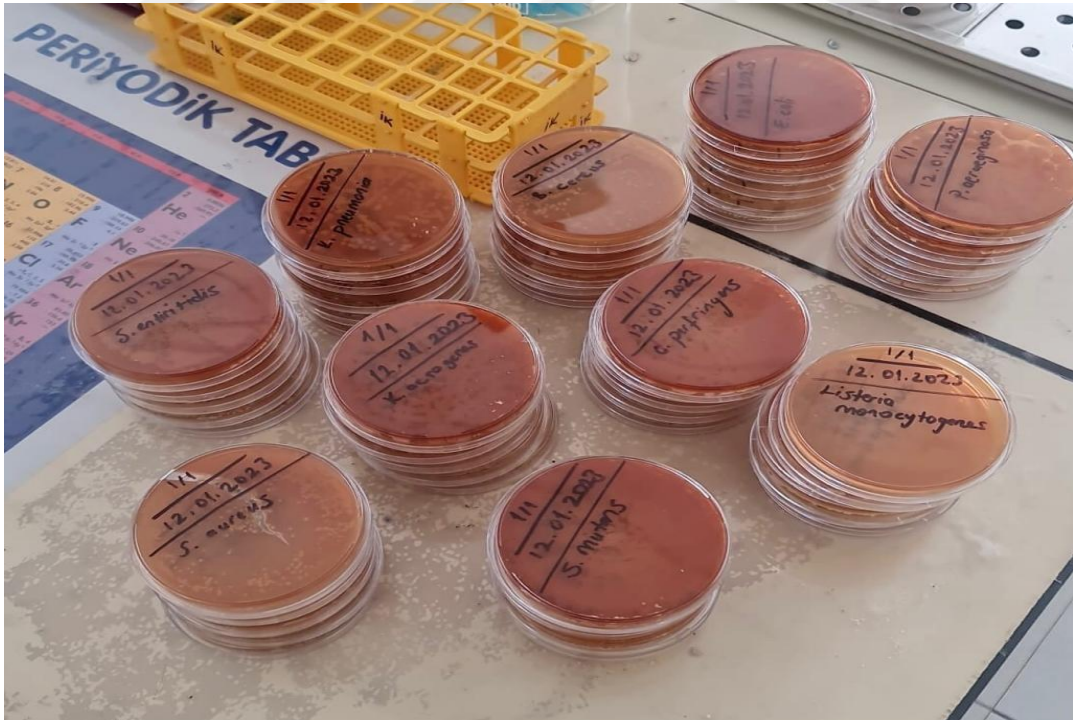
Agar Dilüsyon Tekniğı		
Dilüsyon Oranı	Agar (ml)	Etken Madde (ml)
1/1	18	4
1/2	18	2
1/4	18	1
1/8	18	0,5
1/16	18	0,25

Etken madde+ agar eklenip besiyeri katılaşmaya bırakılmıştır.Hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimi hazır hale getirilmiştir.Ekim yapılacak 10 bakterinin her biri

için 10 farklı tüp hazırlanmıştır. Bu tüplere 1 ml Broth eklenmiş ve her bir bakteri, McFarland 0.5 seviyesinde bulanıklık olacak şekilde sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Broth ve bakteri bulunan tüpler bulanıklık olacak şekilde vortexlenmiştir.

Deneyde kullanacağımız 10 bakterinin, *Bacillus cereus* ATCC: - , *Listeria monocytogenes* ATCC:51774, *Staphylococcus aureus* ATCC:6538, *Streptococcus mutans* ATCC:35668, *Clostridium perfringens* ATCC: -, *Klebsiella aerogenes* ATCC:13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:15442, *Escherichia coli* ATCC:35218, *Salmonella enteritidis* ATCC: - Prof. Dr.İsa Karaman temin edilmiştir, her bir bakteri hazırlanan petrilere (broth+bakteri dilüsyonundan) 100 µL olacak şekilde 1 tur ekilmiştir. Her bir bakteri ekimi için aynı işlem 10 tur olduğundan işlem sonucunda 50 petri kabımız olmuştur.

Üzerine ekim yapılmış petri kapları 36,5 C°' de etüvde 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra etüvden çıkan petrilere bakteri üremesi olup olmadığına bakılmıştır. Sonuç tabloda belirtildiği gibidir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullandığımız bakterilerin ekildiği, etken maddeyle hazırlanmış besiyerleri



Şekil 4.2. *S. aureus* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.3. *S. enteritidis* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



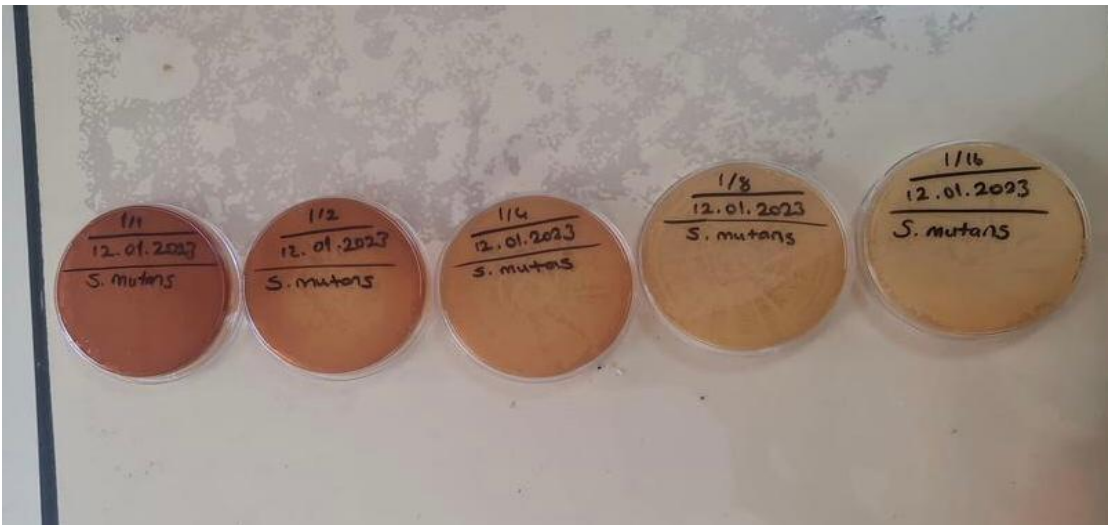
Şekil 4.4. *K. pneumoniae* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.5. *K. aerogenes* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.6. *B. cereus* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.7. *S. mutans* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.8. *C. perfringens* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



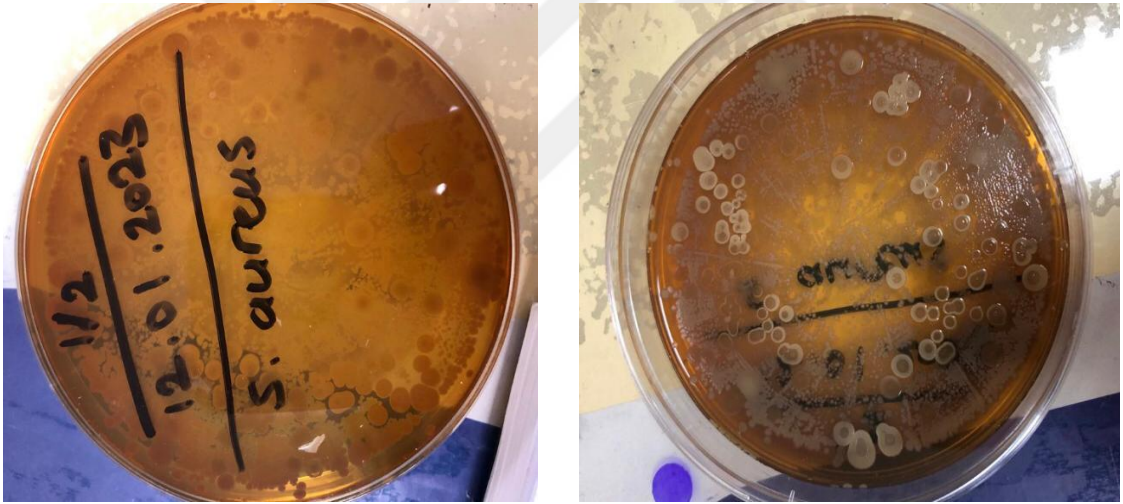
Şekil 4.9. *E. coli* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



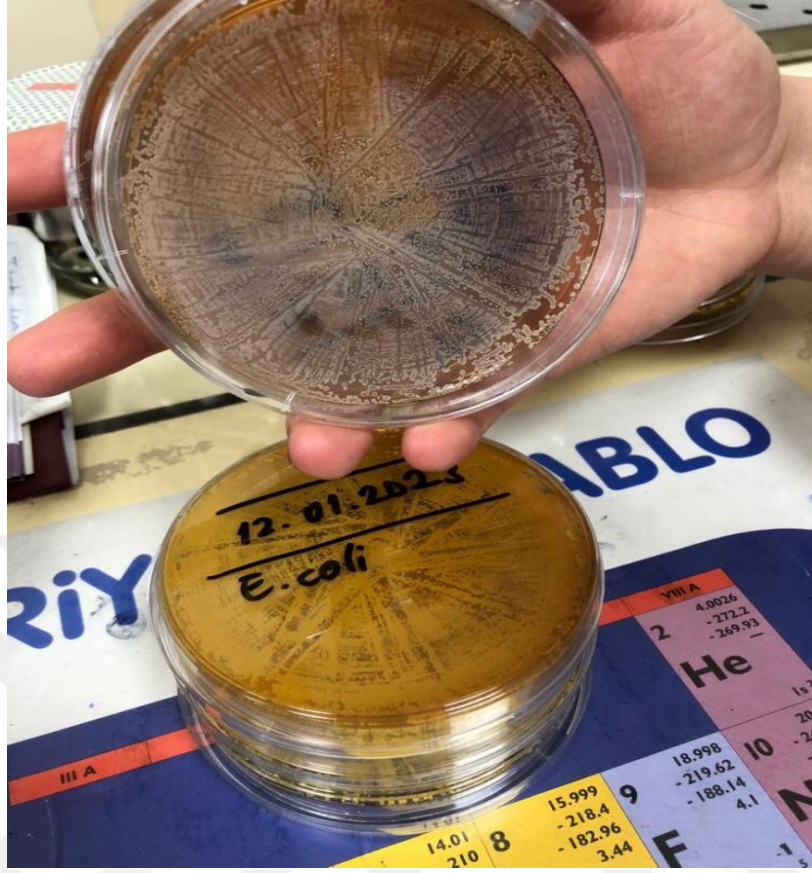
Şekil 4.10. *L. monocytogenes* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.11. *P. aeruginosa* bakterisinin belirli oranlarda dilüe edilip besiyerine ekilmesi



Şekil 4.12. *S. aureus* bakteri üremesi



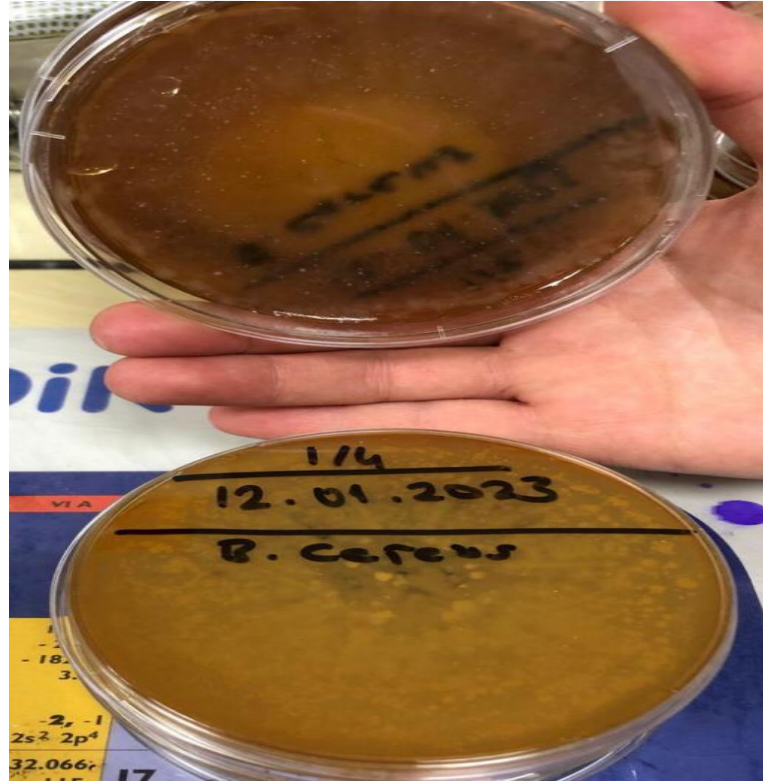
Şekil 4.13. *E. coli* bakteri üremesi



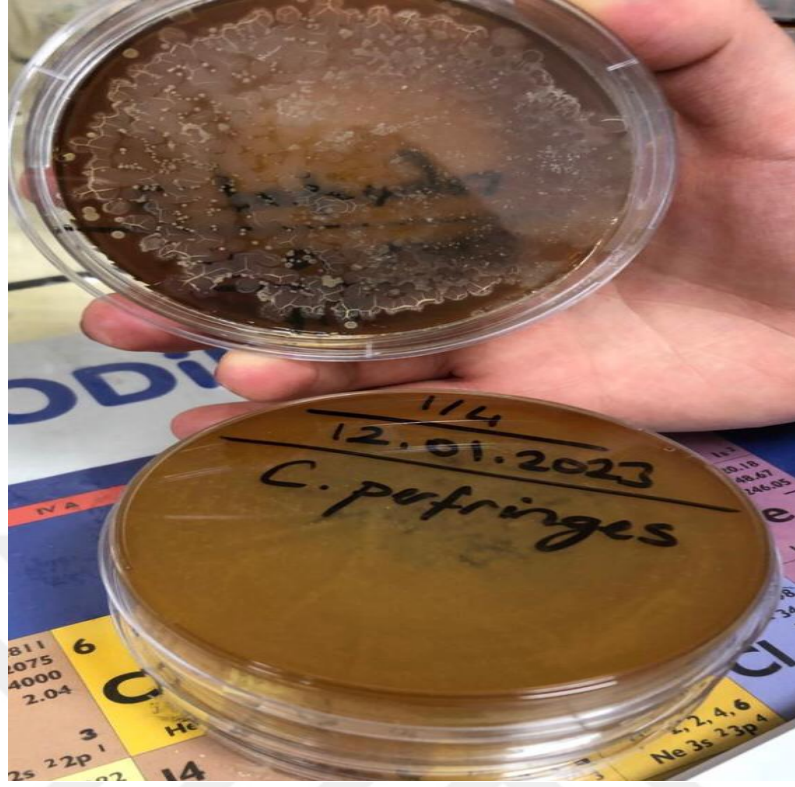
Şekil 4.14. *S. mutans* bakteri üremesi



Şekil 4.15. *S. enteritidis* bakteri üremesi



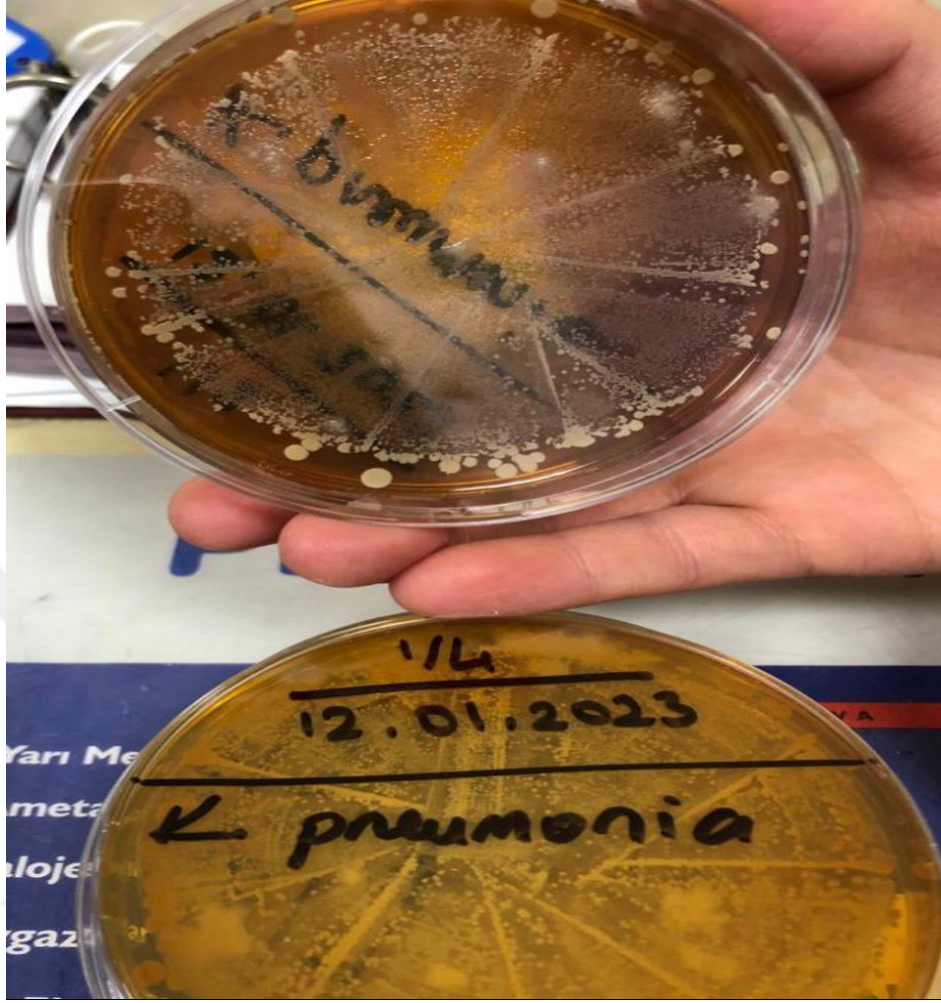
Şekil 4.16. *B. cereus* bakteri üremesi



Şekil 4.17. *C. perfringens* bakteri üremesi



Şekil 4.18. *P. aeruginosa* bakteri üremesi



Şekil 4.19. *K. pneumoniae* bakteri üremesi

Tablo 4.2. Agar dilüsyon tekniği sonuç tablosu

Maddenin Dilüsyonları (mg/ml)					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella aerogenes</i>	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+

(+): Bakteri üremesi var.

(-): Bakteri üremesi yok.

4.2. Disk Difüzyon Yöntemi

4.2.1. Agar Difüzyon Yöntemi

Agar difüzyon yöntemi, mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılığını veya bir ortamdaki antimikrobiyal maddenin varlığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, test edilecek mikroorganizma uygun agar besiyeri içeren bir petri kutusuna ekilir. Daha sonra uygun şekilde eklenen antibiyotik besiyerinde difüzyon yoluyla yayılır. Test mikroorganizmasının gelişimini engelleyip engellemediği, antibiyotiğin difüze olduğu alanda belirlenir. Agar difüzyon yöntemi, mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılıklarını kantitatif olarak ölçen ve MIC değerlerini belirleyen bir yöntemdir.

4.2.2. Kâğıt Disk Agar Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, hızlı üreyen aerob ve fakültatif anaerob bakteriler için pratik ve standartlara uygun bir test olup, hala rutin laboratuvarlarda tercih edilmektedir. Bu yöntem, antibiyotiğin inhibisyon etkisini kantitatif olarak ölçer. Testte, antibiyotiğe duyarlılık veya direnç gösteren bölgeler disk etrafında gözlenir. Bakterinin o antibiyotiğe karşı dirençli olduğunu gösteren sonuç, inhibisyonun görülmediği durumdur. Kirby-Bauer Disk Yöntemi, antibiyogram için en yaygın olarak kullanılan difüzyon yöntemidir.

"Kirby-Bauer Disk Difüzyon Test Protokolü" adı verilen yaygın bir yöntem kullanılarak mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan bu testte, besiyerine belirli bir yoğunluktaki bakteri yayılır ve antibiyotik emdirilmiş diskler besiyeri üzerine yerleştirilir. Bir gece boyunca inkübasyon yapıldıktan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunun çapı ölçülür ve bakterinin bu antibiyotik maddeye karşı duyarlılık düzeyi belirlenir (Hudzicki, 2009; Anonim 2006).

- Bu yöntemin prensibi, test materyalinin agar üzerinde difüzyon yoluyla yayılmasına ve yayıldığı mesafede test mikroorganizmalarını inhibe etme prensibine dayanır. Test edilecek materyaller, emdirildikleri kağıt disklerle birlikte agar yüzeyine yerleştirilir.
- Kirby-Bauer yönteminde, test edilen mikroorganizmanın 6-8 saatlik kültüründen (hafif bulanık) Mueller-Hinton besiyerine 0,1-0,2 mL ekim yapılır. Ekilen mikroorganizma besiyeri yüzeyine steril bir swab yardımıyla yayılır. Agar

yüzeyi 5-10 dakika oda sıcaklığında kurutulur, değişik antibiyotikleri içeren diskler farklı konsantrasyonlarda agar yüzeyine yerleştirilir. Sonra, petri kutuları 24-48 saat boyunca inkübasyona alınır. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülür. Bu çaplar, bir standard zon tablosuyla karşılaştırılarak mikroorganizmanın antibiyotiğe duyarlılık düzeyi belirlenir.

- Disk difüzyon yöntemi, antimikrobiyal madde içeren kağıt disklerin, test edilmesi istenen mikroorganizmadan hazırlanan standart süspansiyonun yayılmış olduğu agar plakların yüzeyine yerleştirilen bir tekniktir. Böylelikle, diskte bulunan antimikrobiyal madde besiyerine yayılır ve bakterinin üremesini etkiler. Sonuç olarak, disk etrafında bakteri üremeyen dairesel bir inhibisyon alanı (zon) oluşur. İnhibisyon zonunun çapı, bakterinin duyarlılığıyla doğrudan ilişkilidir. Bu alanın çapı, farklı antimikrobiyal maddeler için değişebilen duyarlılık sınırı değerleriyle karşılaştırılır. İnhibisyon alanının büyüklüğüne göre, duyarlı, orta veya dirençli şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir (Öztürk, 2009).
- Disk difüzyon yöntemleri, ilacın doygun diskten agar (Mueller-Hinton) içine doğru yayılması prensibine dayanır. Diskler standart olarak 6 mm çapında üretilir ve test edilecek ilacın belirli bir miktarını içerir. Petri kabı üzerine 90 mm çapında, etrafında 6 disk ve orta kısmına 1 disk gelecek şekilde yerleştirilir. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak, 8 mm veya daha geniş inhibisyon zonu gösteren bitki ekstraktları test mikroorganizmalarının McFarland 0.5 bulanıklık seviyesinde inokule edilmiş Mueller-Hinton broth (Oxoid) üzerine belirli miktarlarda uygulanarak, üreme olmamış minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) tespit edilmeye çalışılır (Ferreira et al., 2006; Durmaz, Hülül, Çelik, 2018; Ksü, s.2).
- İlaç disklerinin agar üzerine uygulanması, bakterinin agara ekiminin ardından 15 dakikadan daha uzun sürmemelidir. Bakteri hücre kitlesi belirli bir noktaya ulaştığında, antimikrobiyal maddenin etkisi aşılr ve bakteri üremesi gerçekleşir. Deneyler, optimal sıcaklıkta (35-37 °C) ve bakterinin üremesi için optimal süre de (16-20 saat) bekletilir (Akyüz, 2007). Difüze olmuş antimikrobiyal maddenin, çoğalan ve inhibe olan bakterilerin ara yüzeyindeki konsantrasyonu

kritik konsantrasyon olarak adlandırılır ve dilüsyon testleriyle belirlenen MİK'lere yakındır. Üremeyi tespit edilmeyen en düşük madde konsantrasyonu MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) olarak kabul edilir.

- Sonuçların yorumlanması: İnhibisyon zon çapları milimetrik cetvellerle ölçülür. Elde edilen zon çapları daha önceden belirlenen standartları ile karşılaştırılır; duyarlı, dirençli ve orta duyarlı.
- Bu yöntemde, dimethyl sulfoxide (DMSO) ile %8'lik konsantrasyonlara sahip ekstraktlardan 20 µL alınarak 6 mm çaplı Whatman No: 3 kağıt disklerine emdirilmiştir. Diskler oda sıcaklığında aseptik koşullarda kurutulup daha sonra test mikroorganizma konsantrasyonları 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır. Mueller-Hinton agar (Oxoid) üzerine inoküle edildikten sonra, besiyerinin üzerine yayılmış ve 5 dakika boyunca besiyerin emmesi beklenmiştir. Ardından, ekstrakt çözeltisi emdirilmiş diskler aseptik şartlarda belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak metanol, dimethyl sulfoxide ve su kullanılırken, pozitif kontrol olarak 10 µg streptomisin antibiyotik diski kullanılmıştır (Ferreira ve ark., 2006; Durmaz, Hülül, Çelik, 2018).

4.2.2.1. Antibiyotik Duyarlılık Testi Yaparken Kullanılacak Besiyeri

- Besiyeri steril olmalıdır. Besiyerinin pH' ı 7.2 -7.4 ve agar kalınlığı 4 mm olmalıdır.
- Besiyeri yüzeyinde sıvı kalıntısı, yırtık, çatlak vs. olmamalıdır.
- Agar/kapak yüzeyinde su damlacıkları olmalı, kurumamalıdır.
- Torbalı plakların dayanıklılığı +4 °C' de 2 hafta olup Torbada plakların dayanıklılığı ise +4 °C' de 8-10 haftadır (Meb, s.6)

4.2.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Yaparken Kullanılacak Antimikrobiyal

Diskler

- Antimikrobiyal diskler kullanmadan önce buzdolabında 8°C veya daha düşük sıcaklıkta veya - 14°C' nin altında saklanma, Soğuk zincire uyulmalıdır

- Disk kartujları açılmamış ambalajlarda kullanımdan 1- 2 saat önce buzdolabından çıkarılmalı ve açılmadan önce oda sıcaklığına gelmelidir.
- Bu kartujlar ambalajdan çıkarıldıktan sonra kapakları sıkıca kapatılmalı ve içinde nem alıcı bulundurarak saklanmalıdır.
- Antibiyotik diskler, kullanılmadığında buzdolabında saklanmalı ve mutlaka üzerinde yazan son kullanım tarihlerinden önce tüketilmelidir (Meb, s.6).

4.2.2.3. Koloni Seçimi

Kolonilerin alınması için steril eküvyon (koton swab) veya halkalı öze kullanılır. Bakteri kolonilerinin alındığı halkalı öze, içinde Mueller-Hinton Broth besiyeri bulunan 5 ml'lik tüpün içine daldırılıp, karışması sağlanır ve kolonilerin besiyerine iyice karışması sağlanır. Süspanse olan tüpte ki bulanık, 2-8 saat üreme sonunda, 0,5 McFarland Standardı ile eşleştirilerek ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml tekabül eden) standardize edilir. Gözümüzle bulanıklık ayarlaması yaparken ise hem standardın hem de süspansiyonun çok iyi karıştırıldığına dikkat etmeliyiz..Çok iyi karışması için vortexlenir. Bu karışım agarlı petrilere inokulum yapılır (Meb, s.16,17,18)

- Steril bir pipetle 100 ml süspansiyon (bakteri+broth karışımı) çekilmiştir.
- Agarın bir tarafından başlanıp yüzeyin tamamına yayılması sağlamıştır.
- Petri kutusu 60 derece döndürülerek aynı işlem tekrarlanmıştır.Bu yayma işlemi birkaç kez tekrarlanarak tüm yüzeye yayılması sağlanmıştır.
- Agarın yüzeyinin kuruması için oda sıcaklığında 10-15 dakika beklenmiştir (Meb, s.16,17,18)

4.2.2.4. Antimikrobiyal Disklerin Yerleştirilmesi

- Antimikrobiyal diskler oda ısısına getirilir. Aynı gruptaki antibiyotiklerin etki mekanizmaları aynıdır. Mümkün olduğu kadar çok sayıda farklı grup antibiyotik diski ile test yapılır.
- Diskler, aralarında 2- 2,5cm aralık ve plak kenarından 1,5cm uzak olacak şekilde steril bir pens ya da otomatik disk dağıtıcı ile agarın yüzeyine 5 disk yerleştirilir.
- Üzerlerine hafifçe pens ile bastırarak disklerin agarla temasının tam olması sağlanır (Meb, s.19)

4.2.2.5. İnhibisyon Zonlarının Değerlendirilmesi

- Antibiyotik etkili ise üremenin olmadığı bir inhibisyon zonu oluşur.
- Görünür bir zemin üzerinde disklerle birlikte inhibisyon zon çapları milimetrik cetvelle ölçülür.
- Disklerde dahil olacak şekilde verilen zon çapları, her bir disk için ayrı ayrı değerlendirilir (Meb, s.20,21)

4.2.2.6. Testin Sonuçlarının Denetlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının tekrarlanabilir olması, yani aynı koşullarda tekrar edildiğinde, sonuçlar ya aynı ya da birbirine çok yakın olmalıdır. Bu testlerin uygun koşullarda yapılıp yapılmadığı, kalite kontrol yani referens suşları denetlenir. Denetim sonrası beklenen sonuçlar elde edilemez ise antibiyotik duyarlılık testleri tekrarlanmalıdır.

4.2.2.7. Zon Çapının Tanımlanması

- Duyarlı (Susceptible, S): Enfeksiyonun, önerilen dozda o ilaç ile başarılı bir şekilde tedavi edilebileceğini gösterir.
- Orta Derecede Duyarlı (intermediate, I): ilacın normalden yüksek dozlarının kullanıldığında klinik olarak etkili olacağını gösterir.
- Dirençli (Resistant, R): Tedavide güvenilir bir etkinlik yoktur.

DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Bu yöntem “Kirby-Bauer Disk Difüzyon Test Protokolü” ne göre uygulanmıştır.

Yöntem ile, belirli miktarda ki bakteri, besiyerine yayılmış ve antibiyotik emdirilmiş diskler bu besiyeri üzerine yerleştirmiştir. Bir gecelik beklemeden sonra diskin etrafında ki inhibisyon zon çapı ölçülmüş ve bakterinin antibiyotik maddeye karşı duyarlılık düzeyi saptanmıştır.

0,5 McFarland standart prosedürüne göre ayarlanan bakteriler Mueller-Hinton Agar (MHA) ortamına steril edilmiş eküvyon çubuk kullanılarak yayma ekim ile ekilmiştir. Ekimden sonra 5 bölmeye ayırdığımız ve işaretlediğimize yaptığımız besiyerlerinde ilgili alanlara 6 mm çapında birer boş disk yerleştirilerek 2 ml solventte

400 mg çözdürülmüş ekstraktan 20 µl emdirilmiştir. Böylelikle her 6 mm çapındaki boş diske 4 mg ekstrakt emdirilmiştir. Bu işlem her bir bakteriye tek tek uygulanmıştır. Besiyerine aynı zamanda, pozitif kontrol için erytromycin, gentamicin, streptomycin, tetracyclin(4), sulbactam-cefoperazona, imipenem ve tetracyclin antibiyotik diskleri yerleştirildi.. Negatif kontrol için bölümlere yerleştirilen boş disklerle 20 µl metanol, 20 µl etanol, 20 µl aseton ve 20 µl kloroform emdirilmiştir. 36,5 °C’ de 1 günlük inkübasyondan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek kaydedilmiştir.

Disk difüzyon tekniği masrafı ve zahmeti az ve uygulaması kolay olması sebebiyle tercih edilmiştir. Bu teknikle bir petri kutusunda bakterinin 5-6 antibiyotiğe duyarlılığını ve en etkili olan antibiyotiklerin hangisi olduğunu tespit etmek mümkün olmuştur. (Arda 2000).

*Disk Difüzyon Tekniği; tüm ekstraktlar için iki kez tekrarlanmıştır.

4.3.1. Disk Difüzyonda Etken Madde (E.M.)

1. Etanolle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü, bitki ekstresi (Etanol ekstraktı)
2. Metanolle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü, bitki ekstresi (Metanol ekstraktı)
3. Asetonle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü, bitki ekstresi (Aseton ekstraktı)
4. Kloroformle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü, bitki ekstresi (Kloroform ekstraktı)

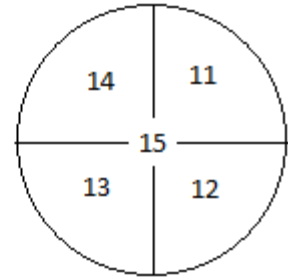
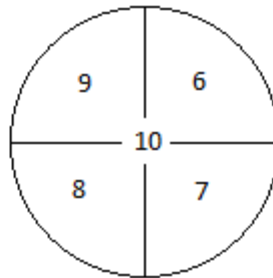
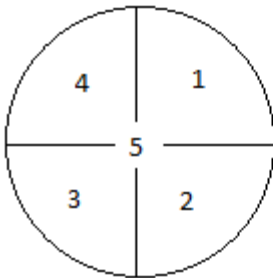
4.3.2. Disk Difüzyonda Çözücü Saf Madde - Negatif Kontrol (N.K.)

1. Saf etanol
2. Saf metanol
3. Saf aseton
4. Saf kloroform

4.3.3. Disk Difüzyonda Pozitif Kontrol (P.K.)

1. Erythromycin

2. Gentamicin
3. Streptomycin
4. Tetracycline(4)
5. Sulbactam / cefoperazone
6. Imipenem
7. Teyracycline



Şekil 4.20. Disklerin yerleştirilmesi için petri kaplarının 5 bölmeye ayrılması

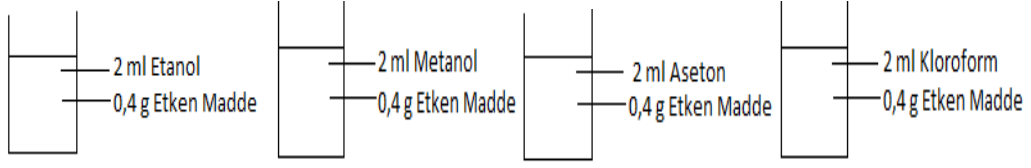


Şekil 4.21. Bakteri ekilmiş petri kaplarının 5 bölmeye ayrılması

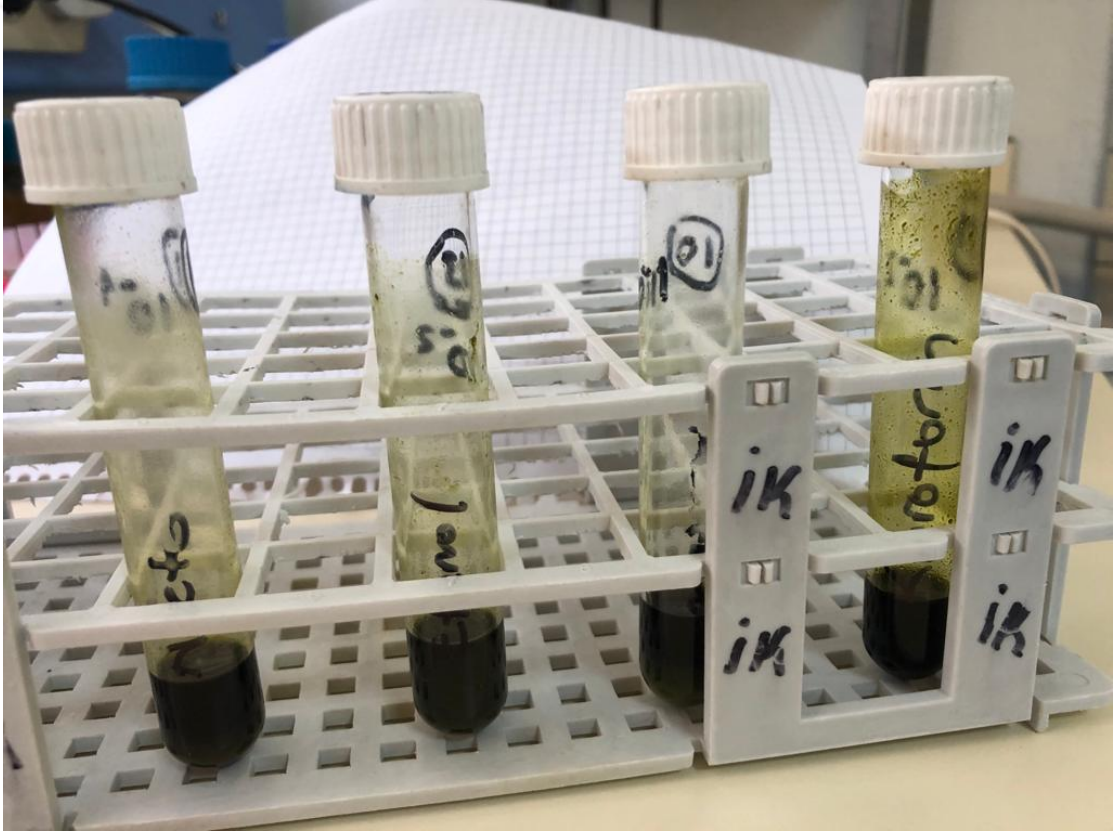
Petri Kaplarına Sırasıyla;

Petriye ekilmesi için her bir bakteriden; tüplere 2 ml broth ve bakteriden (0.5 Mc Farland bulanıklık standartına uygun olacak şekilde) alınıp eklenmiş, dilüsyonlar hazırlanmıştır. Kullanılacak olan 10 bakteri için bu şekilde tüplere 10 ayrı dilüsyon hazırlanmıştır. Her bakteri için ekilmek üzere 3 petri kabı kullanılmıştır. Bu 3 petri kabının her birine hazırladığımız bakteri dilüsyonlarından 100'er µl ekilmiştir.

Ekimi tamamlanmış petri kapları, boş disklerin ve antibiyotik disklerin yerleştirilmesi için bölümlere ayrılmıştır. 10 bakterinin her biri için kaplar 5 bölmeye ayrılmıştır. Her bir bölmeye yerleştirilen boş disklere sırasıyla 20 µl etken madde damlatılmıştır. Etken madde, tüplere 2 ml saf çözücü ve önceden hazırlanmış 0,4 g solventle muamele edilmiş kuru bitki ekstresi konup vortixlenip elde edilmiştir. Tüplerde ki etken maddelerde hangi saf çözücüyü kullandıysak, o çözücüyle elde edilmiş bitki ekstresinin olmasına dikkat edilmiştir. Şekil 4.22. de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. 1. tüpte etanol: 200 mg/ml, 2. tüpte metanol: 200 mg/ml, 3. tüpte aseton: 200 mg/ml, 4. tüpte kloroform: 200 mg/ml



Şekil 4.23. Bitki ekstresi hangi solventle elde edildiyse o solventin saf haliyle karışımının bulunduğu tüpler

*Etken Madde: Solventle muamele edilip kurutulmuş bitki özütü

Bitki hangi solventle muamale edilip kurutulduysa o saf solventin olduğu tüpe etken madde eklenir.

10 bakteri her birinin 1. Petri kapları 5 bölmeye ayrıldı. Her bölmeye yerleştirilen boş disklerle sırasıyla 20 µl etken madde ve negatif kontrol için 20 µl çözücü saf madde damlatıldı.

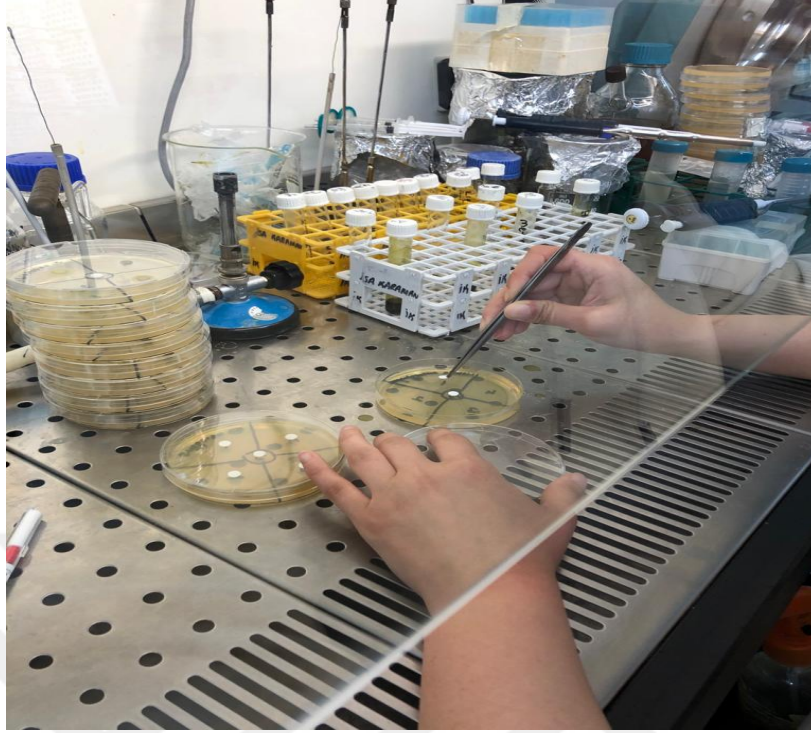
- 1 nolu kısma Etanolle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü bitki ekstresi (Etanol ekstraktı),
- 2 nolu kısma Metanolle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü bitki ekstresi (Metanol ekstraktı),
- 3 nolu kısma Asetonle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü bitki ekstresi (Aseton ekstraktı),
- 4 nolu kısma Kloroformle muamele edilmiş bitkinin kuru özütü bitki ekstresi (Kloroform ekstraktı) damlatıldı.
- 5 nolu kısma çözücü saf etanol (negatif kontrol için) damlatıldı.

10 bakteri her birinin 2. Petri kapları 5 bölmeye ayrıldı. 7,8,9 no'lu bölmeye yerleştirilen boş disklerle sırasıyla (negatif kontrol için) 20 µl çözücü saf madde damlatıldı. 9, 10 no'lu bölümlere antibiyotikli diskler yerleştirilmiştir (pozitif kontrol için).

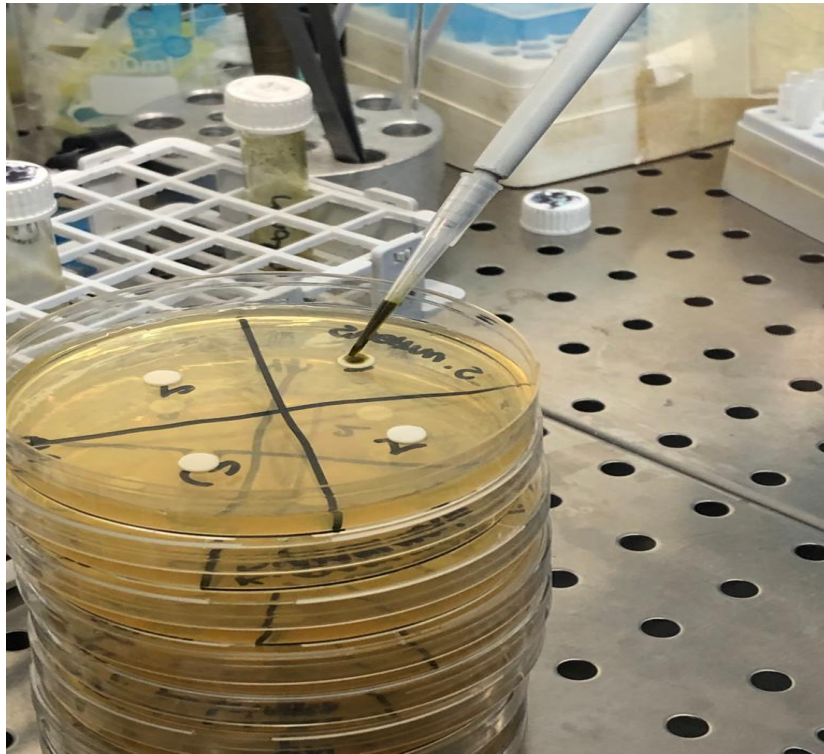
- 6 nolu kısma saf metanol,
- 7 nolu kısma saf aseton,
- 8 nolu kısma saf kloroform damlatıldı.
- 9 nolu kısma Erythromycin diski,
- 10 nolu kısma Gentamicin diski yerleştirildi.

10 bakteri için, her birinin 3. Petri kabı 5 bölmeye ayrıldı. Her bölmeye farklı antibiyotik içeren diskler yerleştirilmiştir (pozitif kontrol için).

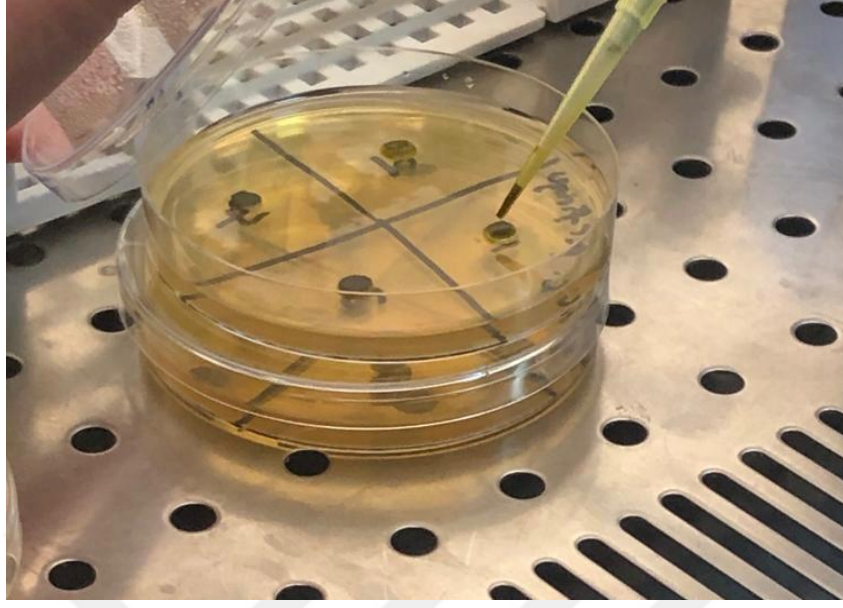
- 11 nolu kısma Streptomycin diski,
- 12 nolu kısma Tetracycline(4) diski,
- 13.nolu kısma Sulbactam / cefoperazone diski,
- 14 nolu kısma Imipenem diski,
- 15 nolu kısma Tetracycline diski yerleştirildi.



Şekil 4.24. OXOID Blank (boş) disklerin ve antibiyotik disklerin bölümlere yerleştirilmesi



Şekil 4.25. Bakteri ekilmiş petrilere ki boş disklere bitki esktresinin emdirilmesi



Şekil 4.26. Bakteri ekilmiş petrilere yerleştirilen disklere etken maddelerin emdirilmesi



Şekil 4.27. Bakteri ekilmiş petri kaplarında ki disklerde zon oluşumu

Tablo 4.3. Etken Maddenin Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerinde oluşturduğu zon çapları

BAKTERİLER	Antimikrobiyal Madde			
	E.M.No: 1	E.M.No: 2	E.M.No: 3	E.M.No: 4
<i>Escherichia coli</i>	NE	8	NE	NE
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Salmonella enteritidis</i>	13	10	11	NE
<i>Bacillus cereus</i>	11	9	NE	NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Listeria monocytogenes</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Clostridium perfringens</i>	10	10	8	NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Streptococcus mutans</i>	10	14	8	NE
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	NE	NE	NE

NE (No Effect) : Zon oluşmadı

Tablo 4.4. Çalışmada kullanılan ekstraksiyon çözeltilerin (negatif kontrollerin) inhibisyon çapları

BAKTERİLER	Antimikrobiyal Madde			
	N.K.No: 1	N.K.No: 2	N.K.No: 3	N.K.No: 4
<i>Escherichia coli</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Salmonella enteritidis</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Bacillus cereus</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Listeria monocytogenes</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Clostridium perfringens</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Streptococcus mutans</i>	NE	NE	NE	NE
<i>Staphylococcus aureus</i>	NE	NE	NE	NE

*NE (No Effect): Zon oluşmadı.

Tablo 4.5. Çalışmada kullanılan pozitif kontrollerin inhibisyon çapları

BAKTERİLER	Antimikrobiyal Madde						
	P.K. E	P.K. CN	P.K. S	P.K. TE(4)	P.K. CES	P.K. IPM	P.K. TE
<i>Escherichia coli</i>	30	25	25	19	20	30	20
<i>Klebsiella aerogenes</i>	27	20	20	15	19	24	22
<i>Salmonella enteritidis</i>	23	20	15	17	23	32	11
<i>Bacillus cereus</i>	35	30	15	13	NE	NE	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31	27	25	12	15	21	15
<i>Listeria monocytogenes</i>	36	27	25	12	15	21	15
<i>Clostridium perfringens</i>	35	27	16	15	16	22	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	25	30	15	22	25	15
<i>Streptococcus mutans</i>	24	20	13	14	15	25	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	22	NE	16	22	32	26

NE (No Effect): Zon oluşmadı.

5. TARTIŞMA

Ülkemizde doğal olarak yetişen yaklaşık 9,000 bitki türünün olduğu ve bu bitkilerin kimyasal içerikleri ve tıbbi etkileri konusunda yetersiz araştırmaların bulunduğu belirtilmektedir. Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO), birçok ülkedeki yayınlara dayanarak hazırladığı araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam tür sayısının yaklaşık 20,000 olduğunu bildirmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalarda, akçakesme bitkisinin yapısında flavonoid glikozitleri, lignan ve fenilpropanoidlerin bulunduğu ortaya konulmuştur. Akçakesme bitkisinden elde edilen ekstraktların analizlerinde ise quercetin, luteolin, tyrosol, cyanidin ve apigenin gibi bileşikler içerdiği yapılan literatür taramalarından anlaşılmaktadır. Literatür taramalarından elde edilen bilgiler doğrultusunda bu bitkinin yaprak ve meyvelerin antibakteriyel özellik gösterdiği ve *P.latifolia* (akçakesme) bitkisinin yapraklarının, triterpenoid bileşikler, flavonoid glikozitler, lignan ve fenilpropanoidlerin birleşiminden oluştuğu görülmektedir (Agati, Galardi, Gravano, Romani ve Tattini, 2002; Uysal, 2020).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, *P.latifolia* (akçakesme) bitkisinin yapraklarından aquaz ekstrakt yöntemi ve sıvı azotla öğütme yönetimiyle (etanol, metanol, kloroform ve aseton çözeltileri kullanarak) bitkinin ekstraktları elde edilmiştir. Agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile *Bacillus cereus* ATCC: - , *Listeria monocytogenes* ATCC:51774, *Staphylococcus aureus* ATCC:6538, *Streptococcus mutans* ATCC:35668, *Clostridium perfringens* ATCC: -, *Klebsiella aerogenes* ATCC:13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:15442, *Escherichia coli* ATCC:35218, *Salmonella enteritidis* ATCC: -, bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir.

6. SONUÇ

Yöntemin seçiminde; maddelerin sayısı, miktarı, çözünürlüğü ayrıca kullanılacak mikroorganizma cinsi, özelliği ve yoğunluğuna bakılmıştır. Sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına ilaveten en az emekle en kısa sürede, en ekonomik olan yöntem tercih edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçlarının tekrar

edilebilir olmasına ve aynı koşullarda tekrarlandığında ise sonuçların aynı veya birbirine çok yakın olmasına dikkat edilmiştir. Çalışma uygun koşullarda yapılmış olup beklenen sonuç ilk testte gözlenmediği için antibiyotik duyarlılık testi bir kez daha tekrarlanmıştır.

Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ve broth dilüsyon metodu kullanarak Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemeye çalışmıştır. Bitkinin ekstraktları kullanılarak yapılan bu çalışmanın disk difüzyon sonuçlarına göre; disklerinde dahil olduğu zon çaplarının ölçümünden sonra her bir disk tek tek değerlendirilmiştir. İnhibisyon zon çaplarını milimetrik cetvelle ölçüp, elde edilen zon çapları daha önceden belirlenen standartları ile karşılaştırılmıştır. Bakterilerin *Phillyrea latifolia* bitkisinin ekstraktlarına karşı duyarlı, dirençli ve orta duyarlı olup olmadıkları gözlenmiş, sonuç olarak bitkiden elde ettiğimiz etken maddenin disk difüzyonun pozitif kontrollerle yapılan denemelerde Tetracycline antibiyotiği ile *Salmonella enteritidis* ATCC: - bakterinin zon çaplarının (11 mm) eşdeğer sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde bu etken maddenin pozitif kontrollerle yapılan denemelerinde Tetracycline(4) antibiyotiği ile *Streptococcus mutans* ATCC:35668 bakterisinin zon çaplarının (14 mm) eşdeğer olduğu tespit edilmiştir.

Bacillus cereus ATCC: - , *Listeria monocytogenes* ATCC:51774, *Staphylococcus aureus* ATCC:6538, *Clostridium perfringens* ATCC: -, *Klebsiella aerogenes* ATCC:13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC:700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:15442, *Escherichia coli* ATCC:35218, bakterilerine karşı bu etken maddenin pozitif kontrollerle yapılan denemelerinde ise eşdeğer sonuç görülmemiş olup beklenen zon çapının oluşmadığı ve antibakteriyel aktiviteye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. Bitkinin etanol, metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin zayıf olduğu sonucuna varılmış ve MIC değerlerine bakılmamıştır.

KAYNAKÇA

- ABBASOĞLU, U. (1996). Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri. *Fabad*, 1996, 22. <http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum21/Issue3/3.pdf>, (10.02.2023).
- ALKİM (t.y.). *Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Diskleri*. <http://www.alkimsaglik.com.tr/urunlerimiz/bioanalyse/antimikrobiyal-duyarlilik-testi-diskleri.html> (11.02.2023).
- ALTINOLUK, H. K. (2013). *Çeşitli Bitkisel Ekstraktların İrrigasyon Materyali Olarak Kullanımlarının E. faecalis ve C. albicans Üzerine Antibakteriyel Etkinliklerinin Değerlendirilmesi* (Yayımlanmamış Doktora Tezi). Kırıkkale Üniversitesi SBE.
- Bakterilerin Anatomik Yapısı (t.y.). https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/105272/mod_resource/content/1/4.%20HAFTA%20BAKTER%C4%B0LER%20-2.pdf, (10.02.2023).
- AKBAĞ, H.I. (2013). *Katırtırnağı (Spartium Junceum), Kermes Meşesi (Quercus Coccifera), Deniz Üzümlü (Ephedra Major), Akçakesme (Phillyrea Latifolia) Bitkilerinin Keçiler İçin Besleme Potansiyeli*. (Doktora Tezi). Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- AKÇALI, K., TUNÇKOL, B., BUHARALI, G. (2022). *Phillyrea Latifolia L. (Akçakesme) Bitkisinden Elde Edilmiş Bitki Ekstarktı İle Boyanmış Yünlü Kumaşların Boyama Özelliklerinin İncelenmesi*. Bartın Üniversitesi Ulus MYO Giyim Üretim Teknolojisi ve Ormancılık ve Orman Ürünleri Programı. Ankara: Detay Yayıncılık.
- BARAN, S. (2021). *Türkiye'de Endemik Olarak Yayılış Gösteren Haplophyllum Vulcanicum Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılması*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi FBE.
- BARKA, A. B. A. (2019). *Akçakesme (Phillyrea latifolia) Bitkisinin Gökkuşığı Alabalıklarının (Oncorhynchus mykiss) Bağışıklık Yanıtı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi*. (Yayımlanmamış Doktora Tezi). Kastamonu: Kastamonu Üniversitesi
- BAŞER, F. (2016). *Ülkemizde Doğal Yayılışa Sahip Karayosunlarından Sphagnum Centrale C.E.O. Jensen ve s.Capillifolium (Ehrh.)Hedw'un (Bryophyta) Anti-Mikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- BOZKURT, B. (2022). *Mürdüm Eriğinin (Prunus Insititia L.) Antioksidatif, Antidiabetik Ve Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Adana: ATÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- CANIYILMAZ, A. (2015). *Phillyrea latifolia, Cistus creticus ve Arbutus andrachne Türlerinin Kimyasal İçeriğinin ve Fenolik Ekstraktlarının İncelenmesi*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- ÇOBAN, E.Ç. (2019). *Portakal Ve Limon Kabuklarının Antioksidan Ve Antibakteriyel Özellikleri*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi FBE.
- DEMİRPEK, U. (t.y.). *Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri*.<https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>, (15.02.2023).
- DEMİRPEK, U. (t.y.). *Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri*. <https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>, (12.02.2023).
- DOVLETOVA, A. (2020). *Isatis Floribunda Boiss. ex Bornm.(Brassicaceae) Bitkisinde rapd-pcr Yöntemi ile Genetik Çeşitlilik Analizi*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Aksaray: Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- DURMAZ, H., HÜLÜL, M. ve CELİK, H. (2018). Meyan (*Glycyrrhiza glabra* L.) Bitkisinin Antibakteriyel ve Antioksidan Aktiviteleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 7: 37-41.
- ERDOĞAN, A. E. ve EVEREST, A. (2013). Antimikrobiyal Ajan Olarak Bitki Bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2): 27-32.
- EUCAST (2015). *Antimikrobik Duyarlılık Testine Yönelik EUCAST Disk Difüzyon Yöntemi*. https://www.tmc-online.org/userfiles/file/EUCAST_Disk_Difuzyon_Slayt_Gosterisi_surum_5_0_Ocak_2015.pdf, (11.02.2023).
- <http://earsiv.kastamonu.edu.tr:8080/jspui/bitstream/123456789/938/1/Abobekir%20B.%20Ali%20BARKA.pdf>, (12.12.2022).
- https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20.500.12812/97196/yokAcikBilim_158267.pdf?sequence=-1&isAllowed=y, (02.02.2023).
- HÜLÜL, M. (2016). *Hatay, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa Biberlerinin Antioksidan ve Antibakteriyel Özellikleri*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Şanlıurfa: Harran Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü.
- KAÇAR, D., BAYRAKTAR, O., ERDEM, C., ALAMRI, A. S. ve GALANAKIS, C. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Plants Grown in the Mediterranean Region. *JSFA Reports*, 2(9): 452-461.
- KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ (t.y.). *Antibiyotik Duyarlılık Testleri*. https://tipfakultesi.ksu.edu.tr/depo/belgeler/Antibiyotik%20Duyarl%C4%B1%C4%B1k%20Testleri_1903071052408349.pdf, (12.02.2023).
- KAYAHAN, K. ve ÇELİK, D. (2022). *Akademik, Araştırma, Uygulama ve Güncel Gelişmeler*. Ankara: Detay Yayıncılık.
- KESİCİ, G., DÖNMEZ, H., EMRAH, İ. ve ALAY AKSOY, Ş. (2015). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antibakteriyel Aktivitesi ve Tekstil Sektöründe Kullanımı. *SDU Journal of Science*, 10(2): 27-34,
- KIRBAĞ, S. ve ZENGİN, F. (2006). Elazığ Yöresindeki Bazı Tıbbi Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 16(2): 77-80.

- KIU, R. ve HALL, L. J. (2018). An Update on the Human and Animal Enteric Pathogen *Clostridium Perfringens*. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1): 1-15.
- KÖK, Ö. (2022). *Bazı Endemik Bitki Türlerinin Farklı Ekstraktlarının Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Karaman: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi.
- KÜÇÜKYILDIRIM, S. (2020). Streptomisin Klebsiella aerogenes' de Spontan Mutasyonların Hızı ve Moleküler Spektrumuna Etkisinin in Vitro Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 50(3).
- MENEKŞEOĞLU, C. (2021). *Tokat Bölgesinde Yetişen Usnea Flipendula ve Evernia Prunastri Liken Örneklerinden Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Tokat: GOP Üniversitesi FBE.
- SALMANLI, M. (2020). *Farklı Antimikrobiyal Ajanların Streptococcus Mutans Sortaz A Enzimi Üzerindeki Etkinliklerinin Moleküler Modelleme Yöntemi ile İncelenmesi*. (Uzmanlık Tezi). Trabzon: KATÜ Diş Hekimliği Fakültesi.
- ŞEN, C. (2011). *Hibiscus sabdariffa L. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Edirne: Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- TAYLOR & FRANCIS (2018). *An Update on the Human and Animal Enteric Pathogen Clostridium Perfringens*. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0144-8> (11.02.2023).
- TC Milli Eğitim Bakanlığı. (2011). *Antibiyotik Duyarlılık Testi* (Yayın no. 725TTT107). http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Antibiyotik%20Duyarl%C4%B1%C4%B1k%20Testi.pdf, (02.02.2023).
- TUTAR, U. (2012). *Eisenia Fetida Türü Toprak Solucanlarından Elde Edilen Farklı Ekstraktların Bitki Patojenleri Üzerindeki Antibakteriyel ve Antifungal Aktivitelerinin Araştırılması*. (Yayımlanmamış Doktora Tezi). Tokat: GOP Üniversitesi FBE.
- ÜRE, M. A. (2018). *Kars Yöresinde Kazlarda Salmonella Enteritidis Antikorlarının ELISA ile Araştırılması*. (Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Kars: Kafkas Üniversitesi SBE.
- YAVUZ, M. ve KORUKLUOĞLU, M. (2010). Listeria Monocytogenes' in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1): 1-10.
- YAVUZ, M. ve KORUKLUOĞLU, M. (2010). Listeria monocytogenes' in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1): 1-10.
- YURDAKUL, Ö., KEYVAN, E., KAHRAMAN, H. A., ŞEN, E. ve BAYRAKTAROĞLU, A. R. (2018). *Bacillus cereus'un Risk Profili ve Halk Sağlığı Yönünden Etkileri*. 1st International Health Science And Life Congress (Ihslc 2018). Burdur: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi.

ÖZGEÇMİŞ

