

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) KALLUS KÜLTÜRLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra KIRILMAZ

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Seher GÜR

HAZİRAN-2019

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) KALLUS KÜLTÜRLERİNİN
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra KIRILMAZ

(151110104)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27 Mayıs 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 27 Haziran 2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Seher GÜR (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ahmet Kadri ÇETİN (F.Ü)

Doç. Dr. Ebru YÜCE BABACAN (M.Ü)

HAZİRAN-2019

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan ve yol gösteren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seher GÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Nazmi GÜR'e teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Nazan KARA'ya, Dilan ÇEVİK'e ve Ayça ŞAHİNALP'e teşekkürlerimi sunarım. Tüm yaşamım boyunca bana sonsuz destek olan eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalar FÜBAP FF.17.29 nolu proje ile yürütülmüştür.

**Kübra KIRILMAZ
ELAZIĞ-2019**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
SEMBOLLER LİSTESİ	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. <i>Ocimum basilicum</i> (Reyhan)'ın Morfolojik ve Botanik Bilgileri	4
2.1.2. <i>Ocimum basilicum</i> (Reyhan)'ın Kimyasal Yapısı.....	6
2.1.3. <i>Ocimum basilicum</i> Yetiştirilmesi	6
2.1.4. <i>Ocimum basilicum</i> 'un Sağlık Üzerine Etkileri.....	6
2.1.5. <i>Ocimum basilicum</i> Antioksidan Kapasitesi.....	8
2.2. Bitki Doku Kültürü.....	11
2.3. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Metotları.....	11
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Bitki Örnekleri.....	16
3.1.2. Kallus Oluşumunda Kullanılan Besi Ortamı, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Kimyasallar	16
3.1.3. Mikroorganizma Kültürleri	18
3.1.4. Mikrobiyolojik Testlerde Kullanılan Besiyeri Ve Kimyasallar	18
3.1.5. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Alet ve Kimyasallar	18
3.2. Metot	18
3.2.1. Kallus Oluşumu.....	18
3.2.1.1. Bitki ekstraktlarının Hazırlanması.....	19
3.2.2. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	20
3.2.2.1. Minimal İnhibitör Konsantrasyon(MIC) Metodu.....	20

3.2.3.	Bazı Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	20
3.2.3.1.	Yağ Asidi ve Metil Esterlerinin Analizi.....	20
3.2.3.2	A, D, E ve K Vitamin Miktarlarının HPLC Cihazı ile Analizi	21
4.	BULGULAR	22
4.1.	Kallusların Hasat Edilmesi.....	22
4.2.	Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	24
4.3.	Bazı Biyokimyasal Özelliklerdeki Bulgular.....	35
4.3.1.	Yağ Asidi Ve Metil Esterlerinin Analizi.....	35
4.3.2.	A, D, E ve K Vitamin Miktarlarının Analizi.....	37
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	38
6.	ÖNERİLER.....	42
	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ yöresinden toplanan *Ocimum basilicum* (Reyhan) bitkisinin yaprak ve yaprak sapları kullanılarak antimikrobiyal aktivite ve bazı biyokimyasal özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

İlk olarak KIN, NAA, BAP ve 2,4D bitki büyüme düzenleyicileri ile farklı oranlarda hazırlanan besi ortamlarında bitki ekstrelerinden kalluslar oluşturulmuştur. Hasat edilen kallusların ve reyhan bitkisinin etanol, metanol, kloroform ve etil asetat çözücülerini kullanılarak antimikrobiyal aktivitelere bakılmıştır. MIC yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir. Aktimikrobiyal aktivite çalışmalarında 5 adet bakteri (*Bacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*) kullanılmıştır. Araştırma sonucunda *Ocimum basilicum* bitkisinin ve kallus kültürlerinin antimikrobiyal etkisinin 125µg/ml ile 1000µg/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Ayrıca HPLC ve GC cihazları kullanılarak kallusların ve reyhan bitkisinin bazı biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Araştırma sonunda bitkide en yüksek yağ asidi Palmitik asit ve α linolenik asit olarak tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan kallus örneklerinde yağ asidi ve vitamin oranlarının örneklerde farklılık gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Ocimum basilicum*, Kallus, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT

Investigation of Antimicrobial Properties of Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Kallus Cultures

In this study, it is aimed to search the antimicrobial activity and some biochemical properties of *Ocimum basilicum* (Basil) plant collected from Elazığ region by using leaf and leaf stalks.

Firstly, KIN, NAA, BAP and 2,4D plant growth regulators and calluses were formed from the plant extracts prepared in different nutrient media. The antimicrobial activities of the harvested calli and basil plant were analysed by using ethanol, methanol, chloroform and ethyl acetate solvents. Antimicrobial activity was determined by using MIC method. During the antimicrobial activity studies, 5 bacterias (*Bacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginesa*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*) were used. At the end of the research, the antimicrobial effect of *Ocimum basilicum* plant and callus cultures ranged from 125µg/ml to 1000µg/ml.

In addition, some biochemical properties of callus and basil plant were analysed using HPLC and GC devices. At the end of the research, the highest fatty acid in the plant was determined as Palmitic acid and α linolenic acid. It was observed that the fatty acid and vitamin ratios differed in the samples of the callus samples prepared with plant growth regulators at different concentrations.

Key Words: *Ocimum basilicum*, Callus, Antimicrobial Activity

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1: Murashige Skoog (MS) Bileşenleri.....	17
Tablo 3.2: Bitki büyüme düzenleyiciler	17
Tablo 4.1: Hasat edilen kallusların kuru ve yaş ağırlıkları (gr).....	22
Tablo 4.2: <i>B.brevis</i> üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml).....	25
Tablo 4.3 : <i>B.brevis</i> üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)	26
Tablo 4.4: <i>E.coli</i> üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml).....	27
Tablo 4.5: <i>E.coli</i> üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)	28
Tablo 4.6: <i>K.pneumoniae</i> üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml).....	29
Tablo 4.7: <i>K.pneumoniae</i> üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)	30
Tablo 4.8: <i>P.vulgaris</i> üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)	31
Tablo 4.9: <i>P.vulgaris</i> üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)	32
Tablo 4.10: <i>P.aeruginosae</i> üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml).....	33
Tablo 4.11: <i>P.aeruginosae</i> üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml) ...	34
Tablo 4.12: <i>Ocimum basilicum</i> yapraklarının ve kallus ekstrelerinin yağ asidi çalışma sonuçları (%)	35
Tablo 4.13: <i>Ocimum basilicum</i> yaprak saplarının ve kallus ekstrelerinin yağ asidi sonuçları	36
Tablo 4.14: <i>Ocimum basilicum</i> yapraklarının ve kallus ekstrelerinin vitamin çalışma sonuçları (%)	37
Tablo 4.15: <i>Ocimum basilicum</i> yaprak saplarının ve kallus ekstrelerinin vitamin çalışma.....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: <i>Ocimum basilicum</i> ‘un yaprak görüntüsü	5
Şekil 2.2: <i>Ocimum basilicum</i> ‘un çiçek görüntüsü	5
Şekil 4.1: <i>Ocimum basilicum</i> bitkisinin yaprak ve yaprak saplarından elde edilen yaş kalluslar	23
Şekil 4.2: <i>Ocimum basilicum</i> yaprak ve yaprak saplarından elde edilen kuru kalluslar	23
Şekil 4.3: Antimikrobiyal çalışma öncesi hazırlanan stantlar (MIC)	24
Şekil 4.4: Antimikrobiyal çalışma sonrası görüntü	24

KISALTMALAR LİSTESİ

2,4 D	: 2,4- Diklorofenoksi asit
ATCC	: American Type Culture Collection
BAP	: Benzylaminopurin
Cfu	: Colony forming unit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPPH	: diphenyl-2 pioryl-hydrazy
EtOH	: Etil alkol
GC	:Gaz Kromatografisi
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KHCO₃	: Potasyum Bikarbonat
KIN	: Kinetin
KOH	: Potasyum Hidroksit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
MHA	: Müller Hinton Agar
MHB	: Müller Hinton Buyyon
MIC	: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MLK	: Minimal Letal Konsantrasyonlu
MRS	: Man-Rogosa Sharpe
MS	: Murashige Skoog
NAA	: Naphlasiasetik asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

SEMBOLLER LİSTESİ

α	: Alfa
gr	: Gram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
°C	: Santigrat derece
pH	: Asitlik Bazlık Birimi
spp	: Species (Türleri)
nm	: Nanometre
μm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
μL	: Mikrolitre
km	: Kilometre
L	: Litre

1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler; geçmişten günümüze sahip oldukları özelliklerine göre halk hekimliği, eczacılık, beslenme, kozmetik, parfümeri ve gıda gibi oldukça fazla kullanım alanına sahip olmuşlardır (Ceylan, 1995). Özellikle son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi anlaşılmış ve bu bitkilere olan talep de artmıştır. Gelişmiş ülkelerde ilaçların %25'ini bitki kökenli ilaçların oluşturduğu bilinmektedir (Farnsworth ve ark., 1985). Öteki taraftan gelişmiş ülkelerde sağlık anlayışının değişmesi ile yiyeceklerde yağ ve tuzun azaltılması çabaları gıdalara tat verici ve koruyucu olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımının artmasına neden olmuştur (Aktar ve Cebe, 2014). Refah seviyesinin yükselmesi ve sosyal yaşam standartının değişmesiyle, bu bitkilerin parfümeri, kozmetik ve terapi alanlarında da kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Ülkemiz, tıbbi ve aroma verici bitkiler açısından dünyadaki en zengin ülkelerden biridir. Bu zenginlik Asya ve Avrupa kıtaları üzerinde bulunan ve 780.476 km² alanı kaplayan yurdumuzun iklimsel açıdan farklılıklar göstermesinden ileri gelmektedir. Ülkemiz florasında doğal olarak yetişen ortalama 12.000 kadar bitki taksonundan yaklaşık 3.700 kadarı endemiktir. Endemikler ilk üzere ülkemizde doğal yollarla yetişen çok sayıda bitki türünün tıbbi değerleri ve aromatik özellikleri oldukça fazladır (Ceylan, 1995; Baytop, 1999; Baydar, 2013).

Türkiye'nin ihraçta bulunduğu en önemli tıbbi ve aromatik bitkiler; adaçayı, defne, anason, çemen, kimyon, biberiye, çöven, dağçayı, ihlamur, oğul otu, çörek otu, defne, kapari, kişniş, kekik, mahlep, meyan kökü, defne, rezene, kırmızıbiber, sumak, bazı yumrulu bitkiler ve reyhandır. Bu ürünler arasında kekik, defne yaprağı, anason, kimyon ve rezene yaklaşık %90 oranındadır. Türkiye bu bitkilerin ihracatından yılda yaklaşık 100 milyon dolar gelir almaktadır (Baydar, 2013).

Bu bitkilerden reyhan (*Ocimum basilicum*), önemli bir uçucu yağ ve baharat bitkisidir. Dünyada özellikle tropikal ve sıcak iklim bölgelerinde yayılış gösteren 35 kadar reyhan türü bulunmaktadır (Baydar, 2013). Türkiye florasında doğal olarak yetişmeyen reyhanın (*O. basilicum*) ve fesleğenin (*O. minimum*) kültürü yapılmaktadır. Bu bitkiler, fransızca 'basilic', almanca 'basilikum', ingilizce 'basil' olarak isimlendirilmektedir (Ceylan, 1996; Baydar, 2013).

Reyhanın ekonomik olarak en çok kullanılan bölümü yapraklarıdır. Yapraklarından ve çiçekli dallarından distilasyon ile yaklaşık %0.05-1 arasında uçucu yağ elde edilmektedir. Uçucu yağ oranı %1'in üzerinde olan, bazen %2'ye yaklaşan tipleri bulunmaktadır. Reyhanın uçucu yağının en önemli ana bileşenleri linalol, öjenol, metilkavikol ve 1,8-sineoldür (Baydar, 2013).

Reyhan uçucu yağı kozmetik, parfüm, aromaterapi, geleneksel tıp ve gıda aroması şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sakinleştirici, balgam ve gaz söktürücü etkileri vardır. Reyhan uçucu yağının antimikrobiyal, nematisidal, insektisidal, fungistatik, herbisidal ve antioksidan etkileri mevcuttur. Bu etkilere uçucu yağda bulunan metilkavikol, öjenol, metilsinamat, linalol ve kafur gibi bileşenler neden olmaktadır (Ceylan, 1996; Baytop, 1999; Baydar, 2013).

Ocimum basilicum (reyhan) uçucu yağının, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyal etki gösterdiği bilimsel çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Reyhan yağı *S.aureus*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *Salmonella* sp. ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı da oldukça etkisi vardır. Reyhanın antibakteriyal etkisi orijini, yağ kompozisyonu gibi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterir (Çelebi,2010).

Bitkinin yaprak ve dallarının hem taze hem de kurutulmuş olarak baharat değeri oldukça yüksektir. Taze ve kurutulmuş olarak kullanılan reyhan özellikle Uzakdoğu ve Akdeniz mutfağında önemli bir yere sahiptir. Pizza, çorba, salata, sos, sirke ve peynir aroması gibi çeşitli besin maddelerinin yapımında faydalanılmaktadır (Baydar, 2013).

Doku kültürü araştırmaları; bitkilerin eşeysel olarak çoğalabilmeleriyle birlikte gövde, dal, yaprak gibi herhangi bir parçalarından da eşeysiz olarak da çoğalabilme (totipotensi) özelliği onların laboratuvar koşullarında, uygun besi ortamı içeriğiyle tam bitki şeklinde gelişmelerini imkan sağlamaktadır. Steril bir ortamda, dengeli şekilde hazırlanmış besi ortamları, tek bir örnekten istenildiği kadar çoğaltım yapılmasına imkan vermektedir. Doku kültürü uygulamalarının, bitkileri genetik potansiyellerinin hedefe uygun yönlendirilmesi bakımından büyük önem arzettiği anlaşılmaktadır (Acar 1997). Ayrıca üretiminde zorluk çekilen doğal türlerimizin doku kültürü çeşitleri kullanılarak etkili bir vejetatif çoğaltma metodunun geliştirilmesi, buna bağlı olarak üretimdeki zorluklarının elimine edilmesi, ayrıca zamana bağlı kalmadan daha hızlı ve aynı anda aynı özelliğe sahip (doku, form) bir çok bitkinin üretilmesiyle peyzajımıza kazandırılması, ilaç

ve besin sanayisi için hammadde kaynağı olması gibi faktörler doku kültürünün önemini arttırmaktadır.

Ayrıca son zamanlarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin yapay ilaçlarda dikkati çekecek kadar artması, araştırmacıları doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya yöneltmiştir (Dürger ve ark.1999).

Bu çalışmada *Ocimum basilicum* (Reyhan) bitkisinin yaprak ve yaprak saplarından; farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak kallus kültürleri oluşturulacaktır. Elde edilen kallusların ve gerçek bitkinin antimikrobiyal aktivitelerine ve bazı biyokimyasal içerikleri tespit edilecektir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. *Ocimum basilicum* (Reyhan)'ın Morfolojik ve Botanik Bilgileri

Kullanılan Kısımlar	: Toprak Üstü Kısımları
Alem	: <i>Plantae</i> (Bitkiler)
Bölüm (Division)	: <i>Magnoliophyta</i> (Kapalı tohumlular)
Sınıf (Class)	: <i>Magnoliopsida</i> (İki çenekliler)
Alt sınıf (Subclass)	: <i>Asteridae</i>
Tür (Order)	: <i>Lamiales</i>
Familiya (Family)	: <i>Lamiaceae</i> (Ballıbabagiller)
Cins (Genus)	: <i>Ocimum</i>

Reyhan *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyasındandır. Bu familiya 200 kadar cins ve 2500-3000 kadar tür bulundurur. Kısmen kozmopolit olan bu familiya Akdeniz çevresinde çok sayıda tür içerir. Genellikle otsu veya ağaççık, çok ender olarak ağaç yada sarılıcı olurlar. Gövdeleri tipik olarak 4 köşeli veya bazen değil, yapraklar stipulsuz, basit, bazen pinnat veya karşılıklı çapraz salgı bezleri bulunur.

Çiçekler yaprak koltuklarında simöz şeklinde toplanmış olup kısa kümeler oluşturur. Kaliks gamosepal olup genellikle yukarıda 5 dişe ayrılmıştır. Korolla gamopetal, az çok çoğu kez 2/3 2 dudaklı, çiçekler zigomorftur. Androkeum tetramer ve didinam; ginekeum iki karpelli iki tohum taslaklı olup her biri yalancı bir bölme ve bir tohum taslaklı iki küçük locaya ayrılmıştır; dolayısıyla tek tohum taslaklı dört bölmelidir. Stilus ginobazik, ovaryumun tabanına yerleşmiş veya (*Ajuga* hariç) subterminaldir. Meyve dört merikarptan oluşmaktadır (Şekil 2.2).

Lamiaceae, genellikle tek yıllık otsu bitkilerdir bazen stolonlu olabilmektedir. Oldukça sık bir şekilde özellikle Akdeniz bölgesinde küçük kserofil karakterli çalılar şeklinde olabilmektedirler.

Yapraklar karşılıklı veya karşılıklı çapraz dizilme dışında bazen gövdeyi saran şekilde oluşmuşlardır. Yaprak sapının uzunluğu tabandakilere göre küçülür. Yaprak ayası çok çeşitlidir, bazen şeritsel olabilir ancak asla bileşik olamaz. Akdeniz türlerinde kurak iklime bir adaptasyon görülmüştür: yüzeyleri indirgenmiş odunlu formlar da, yaprak ayası

sert, kalın ve tüylüdür stomalar ise genellikle derine gömülmüştür. Gövdedeki köklerle ve dip sürgünü ile vejetatif üreme *Lamiaceae* familyasında sıkça görülmektedir.

Çiçekler ender olarak yaprakların koltuğundan ayrı olarak bulunurlar. Genellikle her biri bir yaprağın koltuğundan çıkan simozin dikazyumunda yalancı daireler şeklinde oluşurlar ve simöz bazen tipik olarak 3 çiçeğe indirgenmiştir bunlar olağan bir şekilde dallanır ve kısalmış kümeler şeklinde simözün monokazyumunda helezon şeklinde olurlar (Şekil 2.1).

Ekseriya birbirini takip eden çiçek daireleri birbirine yaklaşır; koltuksal yapraklar pulsu durumlara indirgenir ve uçta yalancı bir başak şeklini alır yada kapitulum şeklinde oluşurlar. Çiçekler tamdır ve hermafrodittir ve zigomorfiye doğru gelişir. Böceklerle tozlaşmaya ise çabuk bir adaptasyon görülür (Davis, 1965-1984).



Şekil 2.1: *Ocimum basilicum* 'un yaprak görüntüsü (URL-4,2019)



Şekil 2.2: *Ocimum basilicum* 'un çiçek görüntüsü (URL-5, 2019)

2.1.2 *Ocimum basilicum* (Reyhan)'ın Kimyasal Yapısı

Ocimum basilicum türlerine bağlı olarak farklı kimyasal yapı bulundurmaktadır. İklima, hasat zamanına ve toprak yapısına paralel olarak hem uçucu yağların oranları hemde kompozisyonları da değişebilir. En önemli aromatik bileşikler 1,8 sineol, eugenol, sitral, metilkavikol (estragol), linalool ve metilsinnamattır. Bütün reyhanlar bu bileşiklerin hepsini önemli oranlarda içerirler. Afrika kökenli türler genelde kamphor da içerirler. Ayrıca monoterpenler (ocimene, geraniol, camphor), sesquiterpenler (bisabolene, caryophyllene) ve fenilpropanoidler (metil öjenol) değişik miktarlarda bulunur ve aromayı büyü ölçüde değiştirirler (URL-1, 2018).

2.1.3. *Ocimum basilicum* Yetiştirilmesi

Reyhan humus bakımından zengin, kumlu topraklarda ve sıcak iklimde optimum gelişme göstermektedir. Ayrıca mineralce zengin topraklarda yetiştirilmesinin yanısıra üretimde kimyasal ilaçların da kullanılması gerekmektedir ve tarımının ılıman iklimde yapılması tavsiye edilmektedir.

Tohumların 1000 tanesinin ağırlığı 1,0 - 1,7 g arasında farklılık göstermektedir. Tohum çimlenmesi değişen sıcaklıklarda daha iyi gerçekleşmektedir. Çimlenme yaklaşık 14 günde gerçekleşir ve tohum çimlenme yeteneğini yaklaşık 5 yıl korumaktadır.

Reyhan için yabancı bitki bulundurmayan ekim alanı gerekir. Tarla üretiminde tohum direk olarak tarlaya ekilir. Tohumlar arası mesafe 30 – 40 cm olabilir.

Ekim işlemi, soğuk iklimlerde donma riski geçtikten sonra yapılmalıdır. Bu yüzden zorunlu olarak ilkbaharda yapılmaktadır. Biçme işlemi ise genelde olarak çiçeklenme başladığında gerçekleştirilir. Uygun yıllarda birden çok biçme işlemi yapılabilir (URL-2, 2018).

2.1.4. *Ocimum basilicum* 'un Sağlık Üzerine Etkileri

Bir çok hastalığın tedavi edilebilmesi için alternatif tıba olan ilgi gün geçtikçe artmakta ve bitkisel iyileştirme yöntemleri çoğalmaktadır. Türkiye'de de bitkilerle ilgili farmakolojik ve toksikolojik çalışmalar popüler olmuştur.

Ülkemize benzer oldukça yaygın bitki florasına sahip, ekonomik imkanları yetersiz ve ilaç üretim imkanları istenilen düzeye ulaşamamış ülkelerde, doğal kaynaklı ilaçların geliştirilmesi ve kullanılmasının arttırılması, yeterli ve uygun ilaç elde edilmesi açısından çağdaş bir yaklaşım olarak kabul görebilir. *Ocimum basilicum* : Hazmı kolaylaştırır ve mideyi sakinleştirir , balgam, gaz ve idrar söktürücüdür. Spazm gidericidir (Akgül 1993). Ayrıca öksürüğü tedavi eder (Katzung 1995).

Ocimum basilicum uçucu yağının, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisi bilimsel araştırmalar sonucunda kanıtlanmıştır. En yüksek inhibisyon zonu 17.7 mm olan *B.subtilis* bakterisine karşı Janssen vd. (1986) tarafından bulunmuştur. Reyhan yağı *S.aureus*, *E.coli*, *Salmonella* sp. *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus vulgaris* bakterilerine karşı da oldukça etkisi vardır. Reyhanın antimikrobiyal aktivitesi, yağ kompozisyonu gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir (Çelebi,2010).

Genellikle reyhan yağı gram pozitif bakterilere karşı, gram negatiflerden daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Prasad vd. 1986). *O.basilicum*'un yaprak kloroform ekstraktları, *S.aureus* mikroorganizmasına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği, Abdel-Sattar vd. (1995) tarafından yapılan çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca Caceres vd. (1990) yine reyhan yaprakların %50 oranında etanolik ekstraktının *Shigella flexneri*, *E.coli* ve *Salmonella enteritidis* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiklerini belirlemişlerdir. Adıgüzel vd. (2005) tarafından *Ocimum basilicum* L. 'un etanolik, metanolik ve hegzan ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. 55 bakteri, 4 fungus ve 1 mayadan oluşan toplam 146 mikroorganizma, agar difüzyon ve MIC metotları kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlarda, çalışılan 3 ekstraktan hiçbir örneğin antifungal etki göstermediği buna rağmen antikandidal ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Hegzan ve metanol ekstraktları 23 *Candida albicans* türünden 3'üne karşı inhibisyon etkisi gösterirken, etanolik ekstraktı etkisiz kalmıştır. *O. basilicum*'un 3 tane ekstraktında da farklı oranlarda antibakteriyel etki gözlenmiştir. Hegzan ekstraktı, metanolik ve etanolik ekstraktlara göre daha güçlü ve geniş oranda antibakteriyel aktiviteye sahip olurken, test edilen 146 bakteri türüne karşı sırasıyla %10, %9 ve % 6 oranlarında inhibisyon etkisi ortaya koymuştur. Hegzan elstraktının, metanolik ve etanolik ekstraktların MIC sonuçları, 125-250 µl/ml, 62.50-500 µl/ml ve 125-250 µl/ml arasında tespit edilmiştir.

Kolesterol, damar sertliği ve bunlara benzer diğer rahatsızlıklar, gelişmekte olan ÷lkelerdeki ciddi sağlık sorunları arasındadır. Amrani vd. (2006)'nin yaptığı çalışmada, reyhanın (*Ocimum basilicum*) Fas'ta plazma kolestrol÷n÷ d÷ř÷rmek, damar sertliği ve buna benzer hastalıkların riskini en aza indirmek için kullanılan başlıca bitki olduğu bilinmektedir. Aynı grup, kolesterole karşı reyhan ekstraktının etkisini araştırmıştır. Bu amaçla reyhan ekstraktının lipid indirme etkisi, Triton Wr– 1339 tarafından uyarılmış kan yağı y÷ksekliliğine sahip fareler ÷zerinde çalışılmıştır. Bu araştırmada reyhan ekstraktı hipolipidemik etkisinin b÷y÷k oranda fenofibrate ait olandan daha da g÷l÷ olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Ocimum basilicum* sulu ekstraktının oldukça y÷ksek bir antioksidan kapasite g÷sterdiği tespit edilmiştir (Amrani vd. 2006).

Reyhan uçucu yağı, *Aspergillus flavus* ve *A.parasiticus*'un aflatoksin salgılayan t÷rlerine karşı fungitoksik özellikler bulundurmaktadır (Çelebi,2010). Jansenn vd. (1988), reyhan uçucu yağının *T. rubrum* *Trichophyton mentagrophytes* ve *T. verrucosum*'a mikroorganizmalarına karşı inhibisyon etkisi g÷sterdiğini bulmuşlardır.

2.1.5. *Ocimum basilicum* Antioksidan Kapasitesi

Tıbbi ve aromatik bitkilerinin ticari amaçlı kullanımı bakımından kontrol÷ giderek artan bir sorun oluşturmaktadır. Örneğin tıbbi bitkiler kasten veya değil diğer bitkilerle yer değiştirebilmektedir. Bu değişiklikler zararlı da olabilmekte ve bu sebeple de kullanıcıların bitkiyi test etmesi gerekmektedir.

Bitki eşitleri genelde meyve ve çiçekleriyle bilinmektedir ancak k÷k veya yaprağa göre tanımlama yapmak oldukça zordur. Bitki anatomisi ile bitki kimyası tıbbi ve aromatik bitkilerin kimlik tespitleri için farmakognozistler tarafından uzun yıllar kullanılmıştı. Gelişmiş teknikler HPLC ile fotodiyot dizileri tayini ve hacim spektrometrisi sayesinde daha doğru bulgular alınmıştır. Ayrıca, kimyasal kimliklerini kullanarak bitki t÷rlerini tanımlayabilmek için kimyasal değişkenlikleri bilmek gerekir. Reyhana ait t÷rler ; kimyasal profillerine ve yalnız yaprak morfolojilerine bakılarak tespit edilebilmesi zor olan bitkilerdendir. ÷nk÷ yaprak şekilleri çoğu t÷rlerde birbirine benzemektedir. Bu farklılığın nedenleri; t÷rler arası değişim ve insanlar tarafından çeşitli sebeplerle kokulu yağların, besinlerin, tıbbi malzemelerin, b÷cek öld÷r÷c÷lerin, vb. y÷zyıllarca kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

Gıdalarda beslenme kalitesinin düşmesi bozulmuş aroma değişmesi yağ bileşiminin oksidatif bozulmasından kaynaklanmaktadır. Besin kalitesini sabit tutmak için antioksidanların da ilave edilmesi gerekir. Gıda endüstrisinde genel olarak BHT, BHA ve PG antioksidanları kullanılmaktadır. Buna rağmen bunların güvenli olup olmadığı hala bilinmemektedir. Bu sebeple, küresel olarak yapay antioksidanların yerini tabii kaynaklara bırakması giderek artmaktadır. Bu doğal antioksidanlar da tıbbi ve aroma verici bitkilerdir. Bunlar içinde en önemlilerinden biberiye, keklikotu (güveyotu) , kekik ve reyhan muazzam antioksidan etkiye sahiptir ve birçok gıda uygulamasında kullanılır (Hirasa 1998). Tıbbi bitkilerdeki antioksidan kapasitesi fenolik bileşiklerdeki tepkime özelliğine bağlıdır ve bu da bitkilerin indirgen madde, hidrojen tutucu ve singlet oksijen doyurucusu gibi etki göstermesine sebep olur. Bitkilerdeki fenolik bileşikler yüksek antioksidan kapasitesine sahip sekonder metabolitlerdir ve *Lamiace* türleri arasında yaygın olarak bulunur (Caragay 1992). Doğal ortamda fazlaca bulunan antioksidanlar, flavonoidler, alkaloidler ve fenolik asitlerin de aralarında olduğu sekonder metabolitlerdir. Bu bileşiklerin antioksidan kapasitesi çoğunluklu olarak kendi yapılarıyla tespit edilir, özellikle fenolik bileşiklere sahip aromatik çekirdek üzerinde bulunan hidroksil gruplarıyla tespit edilir. El değmemiş bitki organları sekonder metabolit bulundurmasına rağmen, değişmiş hücre kültürü bir çok sekonder metabolit üretimi için etkili bir yoldur. Hakkim vd. (2007)'nin gerçekleştirdikleri çalışmada, kallus kültürleri kimyasal yapısı ve antioksidan kapasitesini belirlemek amacıyla reyhan yaprak, dal ve çiçeklerinden etkili bir şekilde uyarılmıştır. 2,4-D'ye KIN eklenmesiyle kallusun gelişmesine ve sekonder metabolitlerin üretimini desteklediğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte kallusun endüksiyonu bu kullanılan konsantrasyon ve KIN'in 2,4-D ile birleşiminin yüzdesi ile doğru orantılı olduğunu bulmuşlardır. 2,4-D ve KIN ile birleştirilmiş *Coleus blumei* (kolyoz) yapraklarının eksplantları en çok kallus endüksiyonu gösterir, fakat aynı hormonların bileşimi bu bitkinin internodal kısımlarında kallus dokusu üretiminde yetersiz kalmıştır. Aynı şekilde reyhan yaprak eksplantları da 2,4-D (1mg/L) ve KIN (0.1mg/L) ile birleştirildiğinde yüksek kültür etkisini % 99.1 olarak göstermiş, fakat çiçek ve dallarda bu kadar başarı sağlamamıştır. Yaprak kısımlarının tersine, reyhanın çiçek ve dal kısımları 2,4-D (1mg/L) ve KIN (0.2mg/L) bileşimi ile desteklendiğinde en yüksek % 96.1 ve 94.6 olarak kültür etkisini göstermiştir.

Gülçin vd. (2007)'nin yaptığı çalışmada reyhanın (*Ocimum basilicum*) antioksidan kapasitesi ve serbest radikal giderme etkileri değişik yöntemler ve ekstrakt türleri

kullanılarak araştırılmıştır. Bu çalışmada, reyhanın su ve etanol ekstraktları ile etkinliklerini saptamak için 1,1-diphenyl-2 pioryl-hydrazyl (DPPH) serbest radikal giderme, süperoksit negatif iyon giderme, ferrik tiyosiyanat yöntemi, güç indirgeme, hidrojen peroksit azaltma ve metal şelatlama etkisi belirleme yöntemlerini kullanmışlardır. Analizler su ve etanol ekstraktlarının konsantrasyona ilişkili antioksidan kapasiteleri olduğunu saptamıştır. Toplam antioksidan kapasitesi ferrik tiyosiyanat yöntemi ile belirlenmiştir. 50 µg/mL konsantrasyonda su ve etanolik ekstraktların linoleik asit peroksidasyonu üstündeki inhibisyon etkisi sırayla %94,8 ve %95,5 olarak bulunmuştur. Ayrıca BHA, BHT ve α-tokoferol benzeri antioksidan maddelerin 50 µg/mL konsantrasyonunda linoleik asit peroksidasyonu üzerindeki % inhibisyon etkisi sırasıyla %97,1, %98,5 ve %70,4 olarak belirlenmiştir. Ayrıca su ve etanolik ekstraktların DPPH radikal giderme, superoxid negatif iyon giderme, güç indirgeme, hidrojen peroksit azaltma ve metal şelatlama etkilerinin etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bhamagar vd. (1993), reyhan uçucu yağının temel bileşenlerinden methyl chavicol'un *A. stephensi*, *A. aegypti* ve *C. quinquefasciatus* mikroorganizmalarına karşı toksik etki gösterdiğini, bu yüzden de hastalığa karşı korunma konusunda etkili olduğunu bildirmektedir.

Reiter ve Brandt (1985), reyhan uçucu yağının soluk borusunda ve ince bağırsak alt kısmında bulunan kaslar üzerinde rahatlatıcı etkisi olduğunu kobay hayvanlarını kullanarak yaptıkları bilimsel çalışma sonucunda bulmuşlardır.

Reyhanın su ve metanol ile hazırlanan ekstraktları, aspirin ile uyarılmış ülserli kobay fareler üzerinde çalışıldığında antiülserojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çelebi,2010) ve ülser indeksi azaltılmıştır. Pepsin yükselişi her iki ekstrakt ile azaltılmıştır. Akhtar ve Munir (1989) 'in yaptıkları araştırmada, kobay farelerinde reyhanın sulu ekstraktının, antiülser etkisine katkıda bulunan hexosamine konsantrasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Reyhan yaprak ekstraktlarının, uçucu yağlarının ve flavonoid glikozidlerinin, asetik asit ve stres ile uyarılmış ülserli farelerde antiülserojenik etkisi konusunda çalışmalar yapılmıştır. Gastrik asit, pepsin ve hexosaminlerin yükselişi üzerindeki etkileri kaydedilmiştir. Sulu, metanolik ve seu-metanolik ekstratları ile flavonoid glikozidlerin ülser indeksini azalttığı, gastrik asit ve pepsin salgılanmasını önlediği ve hexosaminleri arttırdığı tespit edilmiştir (Akhtar vd. 1992).

Bazı reyhan türleri, Tayvan da geleneksel bitkisel tedavilerde antiinflammanuar ve detoksifikasyon etkileri nedeni ile yıllardır kullanılmaktadır (Lin vd. 1995), bu bitkilerin

ekstraktlarının CC1 ve D-GalN ile uyarılmış hepaptit açıdan çalışılmış ve hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) etkisi olduğu saptanmıştır.

2.2. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, bitkilerden izole edilen doku parçalarının uygun koşullarda süresiz olarak yaşatma işlemidir (Onay vd., 2012). Bitki doku kültür teknikleri; bitkilerin neslini devam ettirebilmek bitki ıslahında farklı tekniklerle yeni çeşitler geliştirebilmek, çeşitli mikroorganizmalardan temizlenmiş bitkiler ve doğal ürünler elde etmek, ayrıca bitkileri istenilen zamanda ve istenilen miktarda üretebilmek gibi farklı amaçlarla kullanılır (Pierik, 1990 ; Gürel vd., 2013).

Temel olarak in vitro bitki hücre kültürü; bitkiden (yaprak, kök gövde vb.) bir parçanın (eksplant), daha önceden steril edilmiş, bir kap içindeki (petri, erlen vb.) besin ortamına yerleştirilmesi işlemidir. Farklı ortamlarda yapılan kültürler genellikle kallus kültürü ile başlar. Kallus farklılaşmamış bitki hücrelerinin çoğalmış kütlesidir. Direkt ve indirekt organogenez, bitki rejenerasyonu, somatik embriyogenez ve hücre süspansiyon kültürlerinin başlangıç noktası esas itibari ile kallus kültürüdür (Topçu ve lęeen 2015).

Kallus kültürleri ana bitkiden kesilerek çıkarılan organ ve doku parçalarının bitki büyüme düzenleyicileri ve karbon kaynağı içeren yarı katı besin ortamında, uygun koşullarda büyütülmesiyle oluşan, belli bir morfolojik düzene sahip olmayan hücre yığını olarak adlandırılmaktadır (Sökmen ve Gürel 2001).

2.3. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Metotları

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı farklı biçimlerde duyarlılık göstermektedir. Bu durum, antibiyotiklerin yapısına ve mikroorganizmaların cinsine göre değişiklik göstermektedir. Bu yüzden hem koruyucu amaçla hemde sağaltım için kullanılacak antimikrobiyal ilaçların önemli hastalık etkenlerine karşı olan statik ve sidal etkilerinin çok iyi belirlenmesi ve böyle ilaçların seçilerek yeterli zamanda ve dozda, bir program dahilinde kullanılması gerekmektedir. Bazı durumlarda bu da yeterli olmayabilir. Çünkü, tedavi esnasında antimikrobiyal ilaçlara karşı hastalık ajanlarının duyarlılığında değişmeler olabilmekte ve ilaçlar yetersiz kalabilmektedir.

Bütün bu sebepler göz önüne alınarak spesifik etkene karşı en etkili (sidal) antibiyotiğin seçilmesi ve kullanılması gerekmektedir. Diğer bir önemli nokta ise, duyarlılık testlerinde mikroorganizma ile antimikrobiyal ilaç direk olarak temasa girmekte ve buna göre duyarlılık ölçülmektedir. Halbuki, aynı ilaç vücuda alındığında aynı konsantrasyon her zaman sağlanamayabilir ve ilacın etkinliği çeşitli sebeplerle azalabilir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığın tespit edilmesinde, yaygın olarak kullanılan 2 yöntem vardır.

1) Tüp dilusyon tekniği: Bu teknik antimikrobiyal ilaçların MIC (minimal inhibitör konsantrasyonu) ve MLK (minimal letal konsantrasyonlu) değerlerini tespit etmek için kullanılır. Bu amaçla, Mueller-Hinton buyyonunda antimikrobiyal ilaçların 2 veya 10 katlı dilusyonları hazırlanarak gittikçe azalan yoğunlukta ilaç içeren dilüsyonlar yapılır. Örn. ilaç 1 ml'de 256 µg'dan başlayarak, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 µg/ml giderek azalan şekilde iki katlı olarak seyreltilir. Üzerlerine, hazırlanan test mikroorganizmalarının 24-48 saatlik sıvı besiyeri kültüründen 0.1 ml miktarında ilave edilir ve iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C' de 24-48 saat inkubasyona bırakılır. Tüplerdeki üreme gözle ölçülebilir. Böylece üremenin olmadığı son dilüsyon MIC değeri olarak kabul görür. Ancak, bu değer kesin olması için, çalışmanın iki paralelli yapılması uygundur. Eğer, süre az ise uygun bir süre yine inkubasyona bırakılabilir.

Üremenin gözlenmediği bu son dilusyondan alınan 0.1 mL miktarındaki inokulum 10 mL sıvı besiyerine (veya agara) ilave edilerek uygun bir süre inkubasyona bırakılır. Tüpte üremenin olmaması MLK değerini, üremenin olması MIC değerini gösterir. Agarda bazı koloniler meydana gelebilir veya hiç koloni oluşmayabilir. Koloni oluşacak olursa MIC değeri, oluşmazsa MLK değeri belirlenir. Fakat antibiyotik, inokulum ile beraber agar yüzeyine aktarılacağından etkisi sürebilir ve koloni oluşmayabilir. Bu nedenle broth kültürü daha uygun olacaktır.

2) Disk difüzyon tekniği: Kirby-Bauer tekniği olarak da bilinen bu teknikte, test mikroorganizmanın 6-8 saatlik buyyon kültüründen (hafif bulanık) Mueller-Hinton agar plaklarına 0,1-0,2 ml miktarında ekilir ve iyice yayılması sağlanır. Agarın yüzeyi oda sıcaklığında kuruduktan sonra (5-10 dk), agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda farklı antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ve 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda diskler çevresindeki inhibisyon çapları kompas veya cetvelle ölçülür ve standart çap tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı (S), indermediate (İ) ve duyarsız (R) olarak tespit edilebilir.

Disk difüzyon yönteminde daha az masraflı, az zahmetli ve daha kolay uygulanabilirliği yanı sıra, bir petri kutusunda 5-6 antibiyotiğe karşı duyarlılığı belirlemek ve en etkili ilacı belirlemek mümkündür. Bu sebeple daha çok tercih edilmektedir. Burada önemli olan, bulunan bu değerlere dayanarak kandaki ilaç yoğunluğunun ne kadar olması gerektiğini tespit etmek ve bu konsantrasyonun devamını yeterli vakitte oluşturmaktır. Genellikle, MIC değerinin üstündeki MLK değerlerinden uygun olanı seçilir ve kısa zaman içinde bu yoğunluğa ve infeksiyon kaynağına ulaşabilmek için verilecek zaman ve doz ayarlanır.

3) Diğer teknikler: Mikrotitrasyon ve agar difüzyon metotları da kullanılan teknikler arasındadır (URL-3, 2018).

Adıgüzel vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada *Ocimum basilicum* L. 'un etanolik, metanolik ve hegzan ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri in vitro koşullarda çalışılmıştır. 55 bakteri, 4 fungus ve 1 mayadan oluşan toplam 146 mikroorganizma, agar difüzyon ve MIC teknikleri kullanılarak çalışılmıştır. Sonuçlarda, test edilen 3 ekstraktın da antifungal etki göstermediği ama antikandidal ve antibakteriyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Hegzan ve metanol ekstraktları 23 *Candida albicans* türünden 3 tanesine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, etanolik ekstrakt etkisiz kalmıştır. *O. basilicum*'un 3 ekstraktı da farklı oranlarda antimikrobiyal etki göstermiştir.

Hegzan ekstraktı, metanolik ve etanolik ekstraktlara göre daha güçlü ve daha geniş oranda antimikrobiyal etkiye sahipken, test edilen 146 bakteri türüne karşı sırasıyla % 10, 9, 6 oranlarında inhibisyon etkisi gösterdiği görülmüştür. Hegzan, metanolik ve etanolik ekstraktların MIC sonuçları sırasıyla, 125-250 µl/mL, 62.50-500 µl/mL ve 125-250 µl/mL olarak bulunmuştur.

Nayeemulla ve arkadaşları (2006); *Rauvolfia tetraphylla* ve *Physalis minima* bitkilerinin yaprak ve kallus ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri çalışmada, kullandıkları beş çözücü (alkol, benzen, kloroform, petrol eteri ve metanol) arasında, kloroform ile hazırlanan ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) 0.25 ila 6 mg / ml arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Grzegorzcyk-Karolaka ve arkadaşları (2009), *Salvia viridis* L. fenolik bileşiklerini ve bunların antioksidan, antimikrobiyal potansiyelleri üzerine araştırma yapmışlardır. Bu araştırmada, *Salvia viridis*'in metanolik kallus ekstraktlarında hem gram pozitif hemde gram negatif bakterilerine karşı büyümeyi engelleyici etkiyi belirlemişlerdir. *E.coli* için 1,25 mg/mL olarak bulmuşlardır.

Nalbantbaşı ve Gölçü (2009) Kahramanmaraş yöresine ait 18 farklı şifalı bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerini tespit ettikleri çalışmalarında *Ocimum basilicum* L. bitkisinin en yüksek etkiyi *E. coli*'ye karşı agar difüzyon metoduyla inhibisyon zonunu 9 mm olarak belirlemişlerdir.

Tüzün ve arkadaşları (2011) ; *G. olivieri* bitkisinin kök ve yaprak eksplantlarının karanlıkta kallus üretim kapasitesini araştırmışlardır. WPM ve MS ortamlarına kallus dokusu oluşumunu uyarmak için 0.5 mg/mL BAP, 1mg/mL NAA ile 0.2 ve 0.5 mg/mL KIN, 1 mg/mL NAA kullanmışlardır. En iyi kallus gelişimini yaprak eksplantında, 0.5 mg/mL BAP, 1 mg/mL NAA içeren WPM'de eksplant ekimini takiben 4 hafta sonra gözlemlemişlerdir.

Abbasi F. ve arkadaşlarının (2014) *Ecballium elatarerium* bitkisindeki fenolik bileşiklerin gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerindeki etkisini tespit ettikleri araştırmada *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimarium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. fecalis* bakterilerini kullanmışlardır. *E. elaterium* meyve ve yaprak oluşumunda metanol ekstraktının MIC değerini 0,31 – 0,04 mg/mL arasında değiştiğini bulmuşlardır.

Bitkinin yaprak ve gövdesinde kökündeki fenolik bileşik miktarının 6 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Shariff ve arkadaşları (2006) *R. tetraphylla* ve *P. minima* bitkisinin kloroform ve metanol çözücülerıyla hazırlanan yaprak ve kallus ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini tespit ettikleri çalışmada *R. tetraphylla* yaprak ekstraktının MIC değerini 2-4 mg/mL arasında değiştiğini bulmuşlardır.

Londa ve ark (2006) bazı *Nigella* türlerinden elde edilen kallus kültür ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini tespit ettikleri çalışmada, en yüksek MIC değerini *Bacillus cereus* bakteri için *Nigella* türlerine göre 25 µg/mL ile 50 µg/mL arasında; *S. aureus* için 25 µg/mL ile 125 µg/mL arasında tespit etmişlerdir. *E.coli* için 50 µg/mL bulmuşlardır.

Yıldırım (2008), *Centaurea balsamita* ve *Centaurea coronopifolia* türlerinin kloroform, etil asetat, aseton ve etanol ekstraktlarının *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus salivarius* bakterileri suşlarına karşı antimikrobiyal etkileri MIC metodu kullanılarak araştırdığı çalışmanın sonucunda, ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu görmüştür. En yüksek antimikrobiyal etkiyi *C. balsamita*'nın kloroform ekstresi, *B.cereus*'a karşı göstermiştir. Çalışmasında kullandığı bitki ekstraktlarının *S.aureus* suşlarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, her iki türe ait etanol ekstraktlarının ise daha düşük aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir.

Srivastava ve arkadaşları (2013), yeşil ve mor renkli reyhan (*Ocimum basilicum*) popülasyonlarının uçucu yağ bileşimini inceledikleri bu çalışmada, yeşil renkli reyhan popülasyonunun uçucu yağ analizi sonucunda metilkavikol ve humulen epoksit II'nin oranlarını sırasıyla; %40.5 ve %1.8 olarak belirlemişlerdir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örnekleri

Ocimum basilicum (reyhan) bitkisi Elazığ yöresinde bitki kültürlerinin yapıldığı yerlerden temin edilmiştir. Araştırmada bitkinin yaprak ve yaprak sapları kullanılmıştır.

3.1.2. Kallus Oluşumunda Kullanılan Besi Ortamı, Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Kimyasallar

Besiyeri hazırlanırken karbon kaynağı olarak sukroz (Carlo Erba) (Applichem Panreac ITW Componier 131621.1211), jelleştirici olarak MS (Tablo 3.1) (Duchefa M0222.0050) ve Plant Agar (Duchefa LAB Aneogen Company MC029 Q415861142) kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak da; BAP (Carl Roth) (Art-Nr5552.2), NAA(Also Aesar)(A11069), 2,4D (Duchefa) (010931.06) ve KIN (Caisson) (12152004) (Tablo 3.2) kullanılmıştır. Sterilizasyon çalışmasında ise EtOH (Alkomed), NaOCI (Çamaşır suyu), Tween-80 (Merck) (56449087 221) ve distile su kullanılmıştır.

Tablo 3.1: Murashige Skoog (MS) Bileşenleri

	g/L
Amonyum nitrat	1,650.0
Borik asit	6.20
Kalsiyum klorit (anhidrit)	332.20
Kobaltklorit	0.0250
Bakır sülfat pentahidrat	0.0250
Disodyum EDTA dihidrat	37.260
Demir sülfat heptahidrat	27.80
Glisin	2.0
Magnezyum sülfat (anhidrit)	180.70
Manganez sülfat monohidrat	16.90
Myo-inositol	100.0
Nikotinic asit	0.50
Potasyum iyodür	0.830
Potasyum nitrat	1,900.0
Potasyum fosfat monobazik	170.0
Pridoksinhidroklorit	0.50
Sodyum molibdatdihidrat	0.250
Tiamindiklorit	0.10
Çinko sülfat heptahidrat	8.60

Tablo 3.2: Bitki büyüme düzenleyiciler

Örnek No	ÖRNEKLER
1	0,5 mg/Lt BAP + 0,5 mg/Lt NAA
2	0,5 mg/Lt BAP + 1 mg/Lt NAA
3	0,5 mg/Lt BAP + 2 mg/Lt NAA
4	0,5 mg/Lt BAP + 0,5 mg/Lt 2.4D
5	0,5 mg/Lt BAP + 1 mg/Lt 2.4D
6	0,5 mg/Lt BAP + 2 mg/Lt 2.4D
7	0,5 mg/Lt KIN + 0,5 mg/Lt 2.4D
8	0,5 mg/Lt KIN + 1 mg/Lt 2.4D
9	0,5 mg/Lt KIN + 2 mg/Lt 2.4D
10	0,5 mg/Lt KIN + 0,5 mg/Lt NAA
11	0,5 mg/Lt KIN + 1 mg/Lt NAA
12	0,5 mg/Lt KIN + 2 mg/Lt NAA

BAP : Benzylaminopurin**NAA** : Naphlasiasetik asit**KIN** : Kinetin**2,4 D** : 2,4- Diklorofenoksi asit

3.1.3. Mikroorganizma Kùltürleri

Antimikrobiyal aktiviteleri belirlemek amacıyla *Bacillus brevis* FMC 3, *Proteus vulgaris* FMC I, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomons aeruginosa* DSM 50071, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, bakterileri kullanılmıştır. Çalışılan bakteriler Fırat Üniversitesi Fen Fakùltesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.4. Mikrobiyolojik Testlerde Kullanılan Besiyeri Ve Kimyasallar

Bakterileri geliştirmek için Nutrient buyyon (LAB A Neogen Company) (LAB 068 1452241213), antimikrobiyal etkinin tespiti için ise MHA (Mùller Hinton Agar) (Himedia M173-5005) ve MHB (Mùller Hinton Buyyon) kullanılmıştır. Ayrıca kalluslarla bitki özütü hazırlamak amacıyla çözücü olarak da Metanol (Merck,1.13351.2500), Etanol (Sigma Aldrich,32221), Etil Asetat (Honeywel, 141-78-6), Kloroform (Merck , 1.02431.250) ve DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Carlo Erba,P610171871) kullanılmıştır.

3.1.5. Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Alet ve Kimyasallar

Hekzanol- İzopropanol Karışımı (VWR 24575.320,Riedel-de Haöen R11-36-37), Metanollü Sülfirik Asit (Sigma-Aldrich,34885-2,1-r,Merck K35659031 605), Sodyum klorür (NaCl) (Sigma-Aldrich 1.064404.1000), Hekzan, Potasyum Bikarbonat (KHCO₃) (Sigma-Aldrich 298-14-6), Potasyum Hidroksit (KOH) (Sigma-Aldrich 130-58-3), Asetonitril/Metanol Karışımı (Carlo Erba 901.037.2501-2,5 L), Kloroform (Merck), Vorteks (VWR), Etüv (Memmert), Santrifüj (ÜNİVERSAL 322 Hettich) SHIMADZU GC 17 Gaz Kromatografisi, DAD-UV Dedektörü ve Nucleodur LC 18 Kolonu kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Kallus Oluşumu

MS ortamı için %3 sukroz hassas terazi (SHIMADZU TXB622L)' de tartılarak behere aktarılmıştır. Daha sonra manyetik karıştırıcı (DAIHAN SCIENTIFIC ve BANTE INSTRUMENT) ile karıştırılarak çözünmesi beklenmiştir.

pH-metre (THERMO SCIENTIFIC ORION STAR A111) ile ölçüm yapılarak pH 'ı 1N HCl veya 1N NaOH ile 5.7-5.8 olması sağlanmıştır. pH 'ı ayarlandıktan sonra 1 litre besi ortamı için % 8'lik Plant Agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerinden 50mL alınarak cam petrilere aktarılmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri mikropipetler (BRAND) ile ortama eklenmiştir.

Hazırlanan besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavlandı (NUVE NC-90M) steril edilerek katılaşması için Laminer Flow kabin (BLULAB-Class II)' e konulmuştur.

Ocimum basilicum (Reyhan)'un yaprak ve yaprak sapları musluk suyu altında birkaç dakika yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyonunda ilk önce Reyhan bitkisinin eksplant kısımları steril beher içerisine alınarak üzerine %50 'lik EtOH eklenip 30 saniye bekletilmiştir. Ardından saf su ile yıkanarak tekrar steril beher içerisine alınmıştır. Üzerine hazırlanmış olan ve içerisine 2-3 damla Tween 80 damlatılan %50'lik ticari NaOCI konularak 5 dk bekletilmiştir. Son olarak saf su ile yıkanarak sterilizasyon işlemi sonlandırılmıştır.

Sterilize edilmiş olan *Ocimum basilicum* bitkisinin yaprak ve yaprak sapları 50ml hacimde Tablo1' deki gibi farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ortamına ekilmiştir. Ekim işlemi laminer flow kabin içerisinde yapılmıştır. Ekim işlemi tamamlanmış cam petrilerin kapak etrafları streç film ile sarılmıştır. Deney grupları 10'ar paralelli olarak hazırlanmıştır. 22 ± 2 ° C ve 3000 lux ışık aydınlatmalı, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık kültür odasında gelişmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 4-5 hafta kalluş gelişimi izlenmiştir.

3.2.1.1. Bitki ekstrelerinin Hazırlanması

Süre sonunda hasat edilen kallusların ıslak ağırlıkları alınmıştır. Kalluslar 50°C etüvde (Memmert) kurutulmuştur. Kurutulan kalluslardan 0,1 mg tartılarak porselen havan içerisinde dövülüp toz haline getirilmiştir. Toz hale gelen kuru kalluslar Etanol (Sigma-Aldrich), Metanol (Merck), Kloroform (Carlo Erba) ve Etil Asetat (Honeywell) çözücülerinden 10'ar ml eklenerek falcon tüpler içerisine konulmuştur. Tüpler 72 saat sıcak su banyosunda (Lab Companion) bekletilmiştir. Süre sonunda banyodan çıkartılan örnekler 110 mm'lik filtre kağıdından (Macherey-Nagel) geçirilerek etüve bırakılmıştır. Daha sonra tüpler içinde kalan tortuya DMSO eklenerek konsantrasyonlar 1000µg/mL ye ayarlanmıştır.

3.2.2 Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

3.2.2.1 Minimal İnhibitör Konsantrasyon(MIC) Metodu

Aktifleştirilen bakteri kültürlerinden bir öze alınarak sıvı besiyeri (Nutrient Broth) içerisine aktarılmıştır. Bakteriler 37 °C’de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik kültürden hazırlanan süspansiyonlar 0.5 Mc Farland standartı (1×10^5 cfu/mL) kullanılarak ayarlanmıştır. 1000µg/mL ile başlayıp seri dilisyonlar hazırlanmıştır. İlk ependorf tüpü boş kalacak şekilde 100 µL MHB tüplere aktarılmıştır. İlk iki tüpe 1000 µg/mL olacak şekilde farklı çözücüler kullanılarak hazırlanmış olan kallus örneklerinden 100 µL mikropipet ile eklenmiştir. İlk iki tüpe 1000µg/mL olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda farklı çözücüler kullanılarak hazırlanmış olan kallus örneklerinden 100µL eklenmiştir. Aynı oranda ikinci tüpten mikropipetle alınıp 3. tüpe, 3ten alınan 4e ve 4 ten alınan 5. tüpe olacak şekilde seri dilisyonlar yapılmıştır. 1000µg/mL konsantrasyonlarından başlayarak 2 µg/mL konsantrasyona kadar seyreltme yapılmıştır. Çalışma sırasında her defasında pipet ucu değiştirilmiştir. Seyreltme işlemi bittikten sonra tüplere hazırlanmış olan kültürden bakteri aşılanmıştır. 37 °C’de etüve bırakılıp 18 saat sonra sonuçlar kontrol edilmiştir.

3.2.3. Bazı Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Örneklerde yağ asidi ile A, D, E, K vitaminleri, ekstraksiyonu, Hara ve Radin (1978) tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Bunun için, doku örnekleri 3:2 (v/v) oranında hekzan-izopropanol karışımı içinde 30 sn süreyle homojenize edilip daha sonra bu homojenat 7000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilerek elde edilen supernatant kısım yağ asidi, A, D, E ve K vitaminleri, analizleri için kullanılmıştır (Hara ve Radin 1978).

3.2.3.1. Yağ Asidi ve Metil Esterlerinin Analizi

Doku yağ asidi bileşimini belirlemek için ayrılan örneklerin üzerine %2’lik metanolik sülfirik asit ilave edilip vortekslenerek numune ile iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışım 55°C’de 15 saat metilleşmeye bırakılmıştır.

Süre sonunda, tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulup %5'lik sodyum klorür (NaCl) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri hekzan ile ekstre edilip, hekzan fazı üstten pipetle alınıp %2'lik potasyum bikarbonat (KHCO₃) ile muamele edilip faz ayrımı için 4 saat beklenmiştir. Daha sonra metil esterlerini içeren karışımlar, 45°C'de, azot gazı kullanılarak çözücülerini uçurulup kalan tortu 1,0 mL n-heptanda çözülmüştür ve yağ asidi metil esterleri SHIMADZU GC 17 gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir (Christie,1990,1992).

3.2.3.2 A, D, E ve K Vitamin Miktarlarının HPLC Cihazı ile Analizi

A, D, E ve K vitaminleri için alınan örneklerin üzerine %5'lik metanolik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi ilave edilmiştir. Örnekler vortekslendikten sonra 85°C'de 15 dk bekletilmiştir. Tüpler oda sıcaklığına kadar soğutulup üzerine saf su ilave edilerek karıştırılmıştır. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2×5 mL hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı azot gazı kullanılarak uçurulup kalan tortu 1,0 mL (%60+%40,v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek otosampler viallerine alınmıştır. Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapılmıştır. Analiz için, mobil faz olarak Asetonitril/metanol (%60+%40,v/v) karışımı kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1,0mL/dk olarak belirlenip A, D, E ve K vitamin analizleri için DAD-UV dedektörü kullanılmıştır. Kolon olarak da Nucleodur LC 18 (15×4,6 cm, 5 µm; MN USA) kolonu kullanılıp, A vitamini için dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E, D, K vitaminleri ve fitosteroller için 202 nm kullanılmıştır (Sánchez-Machado vd., 2002; Lopez-Cervantes vd.,2006).

4. BULGULAR

Ocimum basilicum (Reyhan) bitkisi ile yapılan bu çalışma 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak bitki doku kültürü yöntemi ile laboratuvar koşullarında bitkinin yaprak ve yaprak sapı kullanılarak kallus oluşturulmuştur. Oluşan kalluslar kurutulmuş ve farklı çözeltiler kullanılarak ekstraler hazırlanmıştır. Kallus ekstraleleri ve kuru reyhanın MIC yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. Son olarak ise kurutulan kalluslar ile kuru reyhanın yağ asidi ve vitamin analizi yapılmıştır.

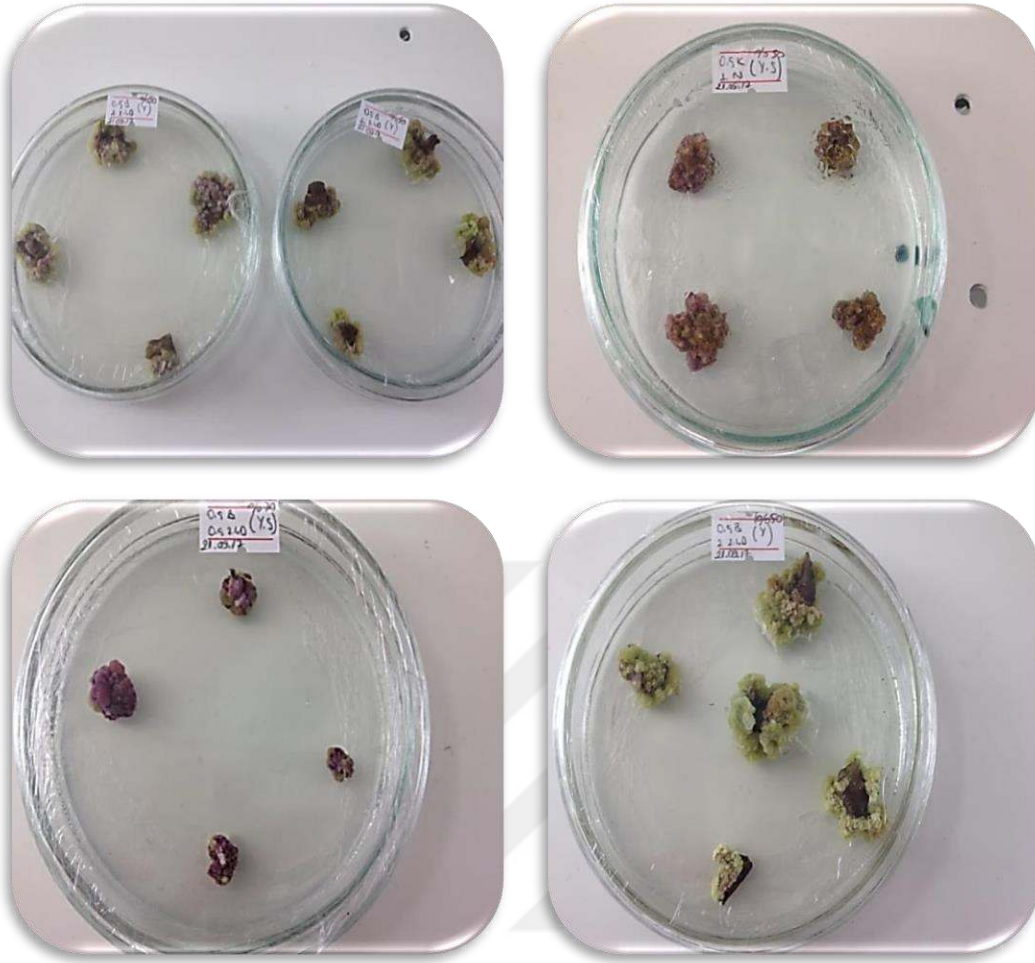
4.1. Kallusların Hasat Edilmesi

Süre sonunda kalluslar (Şekil 4.1)hasat edilerek 10 tekrarlı yapılan ekimlerden toplanan kallusların yaş ağırlıkları alınmıştır (Tablo 4.1). Daha sonra etüvde sabit tartıma getirilen örneklerin kuru ağırlıkları tespit edilmiştir. (Tablo 4.1).

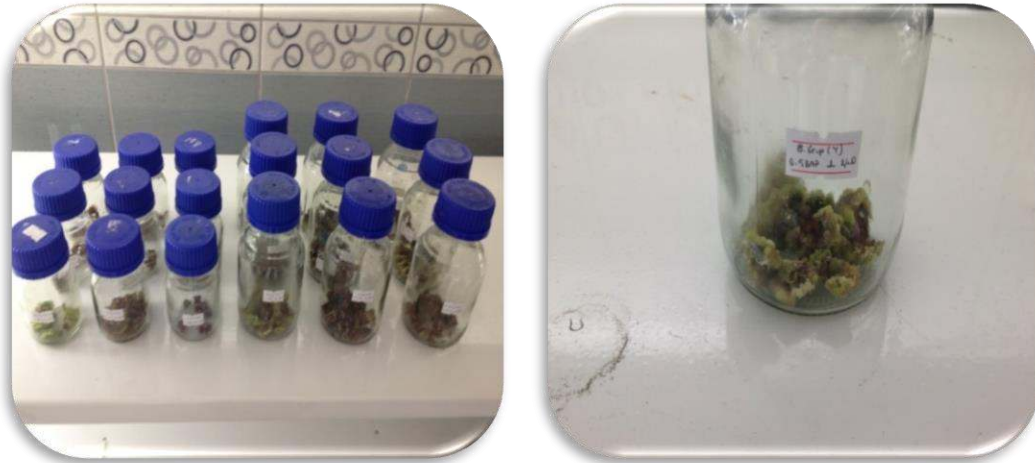
Yaprakta 12 nolu örnekte tüm büyüme faktörlerinden daha ağır kallus oluştururken 10 nolu örnekte en düşük ağırlıkta kallus (Şekil 4.2) oluşturulmuştur.

Tablo 4.1: Hasat edilen kallusların kuru ve yaş ağırlıkları (gr)

Örnekler	YAPRAK		YAPRAK SAPI	
	Yaş Ağırlık	Kuru Ağırlık	Yaş Ağırlık	Kuru Ağırlık
1	9,19	2,4	3,46	1,44
2	6,78	1,8	3,11	1,76
3	6,75	1,6	2,9	1,05
4	8,33	1,92	4,9	1,9
5	9,91	1,83	3,65	1,65
6	8,47	1,79	4,79	1,46
7	8,57	1,77	4,21	2,27
8	9,75	2,13	3,92	1,2
9	8,17	1,91	5,1	1,6
10	5,7	0,8	3,25	1,25
11	6,09	2,9	3,94	1,18
12	11,71	2,9	3,24	1,58



Şekil 4.1: *Ocimum basilicum* bitkisinin yaprak ve yaprak saplarından elde edilen yaş kalluslar



Şekil 4.2: *Ocimum basilicum* yaprak ve yaprak saplarından elde edilen kuru kalluslar

4.2. Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesi amacıyla MIC metodu kullanılmıştır. Bu amaçla *B. brevis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* gibi patojen bakteriler seçilmiştir (Şekil 4.3).

Çalışmada Reyhan ve farklı konsantrasyonlardaki büyüme faktörleri kullanılarak yaprak ve yaprak saplarından hazırlanan bitki özütlerine ait MIC sonuçları tablolarda verilmiştir (Şekil 4.4). Negatif kontrol olarak DMSO, standart antibiyotik olarak ise ampicillin kullanılmıştır.



Şekil 4.3: Antimikrobiyal çalışma öncesi hazırlanan stantlar (MIC)



Şekil 4.4: Antimikrobiyal çalışma sonrası görüntü

Tablo 4.2: *B.brevis* üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK ÖRNEKLERİ	<i>B.brevis</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	250±0.0	125±0.0	250±0.0	250±0.0
1	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
2	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
3	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
4	250±0.0	125±0.0	250±0.0	1000±0.0
5	250±0.0	125±0.0	1000±0.0	500±0.0
6	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
7	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
8	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
9	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
10	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
11	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
12	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Hem kuru reyhan hemde yapraklarıyla hazırlanan tüm ekstrelerin MIC değerleri 125-1000 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir.

Kuru reyhana ait yaprak 125 µg/ml ile *B.brevis* üzerindeki en düşük MIC değeri olup 4 ve 5 nolu örneklerin yapraklarında da aynı etki görülmüştür. Bu etki metanolün kullanıldığı çözücünde olmuştur. Negatif kontrol olarak kullanılan çözücü *B.brevis* üremesini durdurmamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.3 : *B.brevis* üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK SAPI ÖRNEKLERİ	<i>B.brevis</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	250±0.0	250±0.0	500±0.	500±0.0
1	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.
2	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
3	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
4	500±0.0	250±0.0	500±0.0	1000±0.0
5	500±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
6	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
7	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
8	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0
9	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
10	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
11	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
12	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Kuru reyhan ve yaprak saplarıyla hazırlanan tüm ekstrelerin MIC değerleri 125-1000 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir.

Kuru reyhana ait yaprak saplarında 250 µg/ml *B.brevis* üzerindeki en düşük MIC değeri olup 4, 5, 11 ve 12 nolu örneklerin yaprak saplarında da aynı etki görülmüştür. Bu etki kuru reyhanda etanol, kallus örneklerinde ise metanolün kullanıldığı çözücude olmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.4: *E.coli* üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK ÖRNEKLERİ	<i>E.coli</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	125±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
1	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
2	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
3	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	500±0.0
4	125±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
5	125±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
6	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
7	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
8	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
9	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
10	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
11	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
12	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Doğal bitki ve kallusa ait yaprak ekstresinin *E.coli* üzerine etkisine bakıldığında etanolik çözeltide 4 ve 5 nolu örneklerin MIC değeri 125µg/ml olup *Ocimum basilicum* bitkisi ile aynı etkiyi gösterdiği ve diğer örneklerden daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Metanolik çözeltide ise 2 ve 3 nolu örneklerin *Ocimum basilicum* bitkisi ile aynı sonucu verdiği görülmüştür (Tablo 4.4).

Tablo 4.5: *E.coli* üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK SAPI ÖRNEKLERİ	<i>E.coli</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
1	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
2	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
3	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
4	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
5	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
6	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
7	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	500±0.0
8	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
9	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
10	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
11	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
12	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Kuru reyhan ve yaprak sapı kallusu ekstresinin *E.coli* üzerine etkisi incelendiğinde etanolik çözeltilerde 6 nolu (0,5mg/Lt BAP+2mg/Lt 2.4D) örneğin MIC değerinin 250µg/ml olup *Ocimum basilicum* bitkisinden ve diğer örneklerden daha etkili sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Metanolik çözeltilerde ise 7 nolu (0,5mg/Lt KIN+0,5mg/Lt 2.4D) örneğin *Ocimum basilicum* bitkisi ve diğer örneklerden daha etkili sonuç verdiği görülmüştür (Tablo 4.5).

Tablo 4.6: *K.pneumoniae* üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK ÖRNEKLERİ	<i>K.pneumoniae</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	125±0.0	250±0.0	500±0.0	250±0.0
1	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
2	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
3	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
4	250±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
5	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
6	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
7	125±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
8	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
9	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
10	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
11	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
12	500±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Yaprak örneklerinin *K.pneumoniae* üzerine etkisi araştırıldığında *Ocimum basilicum* bitkisi ve 7 nolu örneğin etanolik çözeltide daha etkili sonuç verdiği tespit edilmiştir (125 µg/ml).

Doğal bitkinin metanolik ve etil asetat çözücülerine ait yapraklarla, 12 nolu örneğin metanolik örneği 250 µg/ml ile aynı etkiyi göstermiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.7: *K.pneumoniae* üzerine yaprak sapı ekstrilerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK SAPI ÖRNEKLERİ	<i>K.pneumoniae</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	250±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
1	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
2	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
3	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	250±0.0
4	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	500±0.0
5	500±0.0	500±0.0	500±0.0	250±0.0
6	1000±0.0	500±0.0	500±0.0	250±0.0
7	250±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
8	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
9	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0
10	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0
11	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
12	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Kuru reyhan ve yaprak saplarıyla hazırlanan tüm ekstrilerin MIC değerleri 125-1000 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir.

Kuru reyhana ait yaprak saplarında 250 µg/ml ile *K.pneumoniae* üzerindeki en düşük MIC değeri olup 7 nolu örnekte de görülmüştür. Bu etki etanolün kullanıldığı çözücünde olmuştur. 4 nolu örnekte metanolün kullanıldığı çözücünde etki görülürken 3,5 ve 6 nolu örneklerde ise etil asetatın kullanıldığı çözücünde aynı etki görülmüştür (Tablo 4.7).

Tablo 4.8: *P.vulgaris* üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK ÖRNEKLERİ	<i>P.vulgaris</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
1	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
2	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
3	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
4	500±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
5	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
6	500±0.0	125±0.0	1000±0.0	1000±0.0
7	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
8	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
9	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
10	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
11	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
12	1000±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

P.vulgaris üzerine; hazırlanan kuru reyhan ve yaprak örneklerinde en etkili sonuç metanolik çözeltide 6 nolu (0,5mg/Lt BAP+2mg/Lt 2.4D) örnekte 125µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonucun diğer tüm çözeltilerle hazırlanan örneklerden daha etkili olduğu izlenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.9: *P.vulgaris* üzerine yaprak sapı ekstraktlarına ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK SAPI ÖRNEKLERİ	<i>P.vulgaris</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
1	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
2	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
3	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
4	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
5	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
6	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
7	1000±0.0	250±0.0	1000±0.0	500±0.0
8	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
9	500±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
10	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
11	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
12	500±0.0	250±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

P.vulgaris üzerine hazırlanan kuru reyhan ve yaprak sapı örneklerinde ise en etkili MIC değeri 250 µg/ml olup sonuçlar metanolik çözeltide izlenmiştir. 5, 6, 7 ve 12 nolu örnekler ile *Ocimum basilicum* bitkisinin aynı sonuçları verdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.10: *P.aeruginosae* üzerine yaprak ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK ÖRNEKLERİ	<i>P.aeruginosae</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	250±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
1	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
2	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
3	500±0.0	500±0.0	500±0.0	500±0.0
4	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0
5	500±0.0	500±0.0	500±0.0	1000±0.0
6	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
7	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
8	500±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
9	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
10	250±0.0	250±0.0	1000±0.0	500±0.0
11	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
12	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Kuru reyhan ve yaprak kallusu ekstresinin *P.aeruginosae* üzerine etkisi çalışıldığında etanolik çözeltide 10 nolu örneğin MIC değeri 250µg/ml olup *Ocimum basilicum* bitkisi ile aynı etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Metanolik çözeltide ise 10 nolu örnek *Ocimum basilicum* bitkisinden daha etkili sonuç vermiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.11: *P.aeruginosae* üzerine yaprak sapı ekstrelerine ait MIC sonuçları (µg/ml)

YAPRAK SAPI ÖRNEKLERİ	<i>P.aeruginosae</i>			
	Etanol	Metanol	Kloroform	Etil asetat
Kuru Reyhan	250±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
1	250±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
2	250±0.0	1000±0.	1000±0.0	500±0.0
3	250±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
4	500±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
5	500±0.0	250±0.0	500±0.0	500±0.0
6	1000±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
7	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
8	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0
9	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0	1000±0.0
10	1000±0.0	1000±0.0	500±0.0	500±0.0
11	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	500±0.0
12	500±0.0	500±0.0	1000±0.0	1000±0.0
DMSO	>1000	>1000	>1000	>1000
Amphicillin	2			

Kuru reyhan ve yaprak sapı kallus ekstrelerinin *P.aeruginosae* üzerine etkisine bakıldığında etanolik çözeltide 1, 2 ve 3 nolu örneklerin MIC değerleri 250µg/ml olup *Ocimum basilicum* bitkisi ile aynı etkiyi göstermiştir.

Metanolik çözeltide ise 4 ve 5 nolu örnekler *Ocimum basilicum* bitkisi ile aynı sonuçları vermiştir (Tablo 4.11).

4.3. Bazı Biyokimyasal Özelliklerdeki Bulgular

4.3.1. Yağ Asidi Ve Metil Esterlerinin Analizi

Tablo 4.12: *Ocimum basilicum* yapraklarının ve kallus ekstraktlarının yağ asidi çalışma sonuçları (%)

NO	K.R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kaprik asit	1,61	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Miristik asit	1,89	-	1,38	1,14	0	0,79	0,59	0	0	0	-	-	-
Pentadeka noik asit	0	-	0,98	0	0,61	0,48	0,49	0,48	0,61	0,50	-	-	-
Palmitik asit	25,4	-	24,1	24,3	23,1	23,4	25,7	24,6	20,5	23,3	-	-	-
Palmitoleik asit	10,6	-	3,00	2,50	1,90	2,47	1,88	2,29	2,30	2,32	-	-	-
Heptadekanoik asit	0	-	0	0,83	0,55	0,53	0,58	0,51	0	0,50	-	-	-
Heptadekolinoeik asit	0	-	0	0,66	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Stearik asit	4,90	-	4,90	5,76	3,05	2,67	3,15	2,72	2,61	2,75	-	-	-
Oleik asit	5,53	-	12,3	9,82	6,24	7,13	3,41	7,39	11,1	9,02	-	-	-
Linoleik asit	12,2	-	23,1	26,3	21,4	23,6	11,2	22,77	26,4	22,3	-	-	-
α linolenik asit	29,5	-	0	0	0	32,7	45,6	33,5	30,7	33,6	-	-	-
γ -linolenik asit	0	-	24,1	21,7	35,7	0	0	0	0	0	-	-	-
Tanımlanamayan yağ asidi XX	1,66	-	1,7	1,51	2,55	2,37	3,18	2,55	2,31	2,42	-	-	-
Tanımlanamayan yağ asidi X	0	-	1,7	1,65	1,46	1,48	0,70	1,45	1,78	1,37	-	-	-
Araşidik asit	3,23	-	1,05	1,88	1,34	1,05	1,16	1,33	0,77	1,18	-	-	-
Araşidik asit	1,55	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Dokosadienoik asit	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Lignoserik asit	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-

Tablo 4.13: *Ocimum basilicum* yaprak saplarının ve kallus ekstralarının yağ asidi sonuçları

NO	K.R	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kaprik asit	1,61	0	0,64	0	0	0	0,30	-	-	-	0	0	0
Miristik asit	1,89	0,88	0,67	0,99	0	0	0,99	-	-	-	0	0	0,58
Pentadeka noik asit	0	0	0,70	0,79	0,43	0,57	0,46	-	-	-	0	0	0
Palmitik asit	25,4	21,8	23,3	23,1	19,6	22,0	23,3	-	-	-	21,4	21,2	21,5
Palmitoleik asit	10,6	2,61	2,25	2,51	2,17	2,25	2,43	-	-	-	2,60	2,39	2,69
Heptadekanoik asit	0	0	0	0	0,67	0,55	0,48	-	-	-	0	0,51	0,54
Heptadekolinoeik asit	0	0	0	0	0,63	0	0	-	-	-	0	0	0
Stearik asit	4,90	3,40	5,26	3,00	2,47	2,62	3,56	-	-	-	3,15	2,53	2,98
Oleik asit	5,53	15,1	9,88	10,0	7,20	8,01	7,79	-	-	-	10,6	10,2	8,08
Linoleik asit	12,2	23,1	22,2	21,4	23,2	23,9	13,2	-	-	-	23,3	21,6	20,4
α linolenik asit	29,5	0	0	0	37,1	32,7	40,4	-	-	-	32,1	35,9	35,8
γ -linolenik asit	0	25,2	29,8	32,0	0	0	0	-	-	-	0	0	0
Tanımlanamayan yağ asidi XX	1,66	1,83	2,03	2,26	2,88	2,55	2,87	-	-	-	2,28	2,40	2,50
Tanımlanamayan yağ asidi X	0	1,74	1,42	1,28	1,45	1,66	0,90	-	-	-	1,35	1,34	1,20
Araşidik asit	3,23	1,14	1,33	1,28	0,94	1,04	0,90	-	-	-	0,97	1,07	1,23
Araşidik asit	1,55	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0
Dokosadienoik asit	0	1,30	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0
Lignoserik asit	0	0,82	0	0	0	0	0,66	-	-	-	0	0	0,78

Ocimum basilicum doğal bitkisinin yaprak ve yaprak sapı ile kallus ekstralarının yağ asidi ve metil esterlerinin analizi sonucunda Palmitik asit, Palmitoleik asit, Linoleik asit ve α linolenik asit değerlerinin yüksek ve birbiriyle paralel sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.12).

Analizler sonucunda α linolenik asit değerlerinin % 29.5 ile % 33.6 arasında, palmitik asit değerlerinin % 25.4 ile % 23.3 arasında, linoleik asit değerlerinin % 12.2 ile %26.4 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Tablo 4.13).

4.3.2. A, D, E ve K Vitamin Miktarlarının Analizi

Tablo 4.14: *Ocimum basilicum* yapraklarının ve kallus ekstraktlarının vitamin çalışma sonuçları (%)

Örnek no	K2	R Tok	D2	A Tok	Ergo-sterol	K1	Stigma-sterol	Beta-streol	Retinol	R ast
K.R	4,45	0	9,2	3,7	0	0	741,6	352,55	0	0,2
1	2,5	2,2	20,8	11	16,05	4,35	874,6	394,6	0	0
2	1,2	0,3	11,6	8	0	4,65	223,3	262,1	0	0
3	0,9	1,6	15,8	34	14,7	3,3	414,3	587,2	0	0
4	1,4	3,1	14,8	0	0	2,6	1286	913,65	0	0,1
5	0,9	1,4	10,9	6,0	0	1,45	666	354,75	0	0
6	3,2	3,6	16	4,2	22,9	6,0	1054,6	1508,8	0	0,1
7	2,7	3,5	24,4	14	0	0	2275	1319,3	0	0,1
8	3	2,5	18,9	8,8	0	0	928,8	686,5	0	0,1
9	1,2	0,9	8,85	7,2	0	0,4	1400	653,65	0	0
10	0,9	1,5	12,9	3,2	0	2,1	231,85	258,6	0	0
11	1,9	2,1	14,7	51,	0	4,3	707,35	540,45	0	0
12	0,6	0,8	10,8	15,	0	3,8	259,2	531,35	0	0

Tablo 4.15: *Ocimum basilicum* yaprak saplarının ve kallus ekstraktlarının vitamin çalışma

Örnek no	K2	R Tok	D2	A Tok	Ergo-sterol	K1	Stigma-sterol	Beta-streol	Retinol	R ast
K.R	4,4	0	9,2	3,7	0	0	741,65	352,55	0	0,05
1	5	5,5	38	26	17,6	6,6	3090,55	744,75	0	0,05
2	1,9	2,5	19	65	42,1	3,9	1719,6	477,35	0	0
3	1,6	4	20	0	0,6	1,7	1182,45	346,7	0	0,05
4	0,9	1,0	8,3	18	22,35	3,6	704,15	1057,35	0	0,1
5	1,8	2,3	4,1	15	0	4,2	882,5	1276,9	0	0,05
6	3,4	1,5	11	15	22,05	10	949,2	1594,7	0	0,05
7	1	1,5	9,2	18,	0	0	828,3	987,4	0	0
8	1,9	2,4	12	4,1	0	0	1655,65	649,8	0	0,05
9	1,1	2	2,9	10	0	5,8	654,45	952,7	0	0,05
10	1,7	3,8	20	65	0	3,0	1749,8	676,7	0	0
11	2,3	2	20	4,7	0	2,5	1834,95	552,9	0	0,05
12	2	3,1	14,	3,6	0	1,1	1465,2	1013,35	0	0,1

Bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan kallus örneklerinde vitamin oranlarının büyüme faktörlerine bağlı olarak değişiklik gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.15, Tablo 4.16).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıbbi ve aromatik bitkiler hastalıkların önlenmesi ve iyileştirilmesi için ayrıca gıda, parfümeri ve kozmetik alanlarında geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışma bitkimiz olan *Ocimum basilicum* önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olup, günümüzde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda *Ocimum basilicum* bitkisi ve bitkiye farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri uygulanarak elde edilen kallus kültürlerinin antimikrobiyal aktivitesi ve biyokimyasal analizleri araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda, bu büyüme faktörlerinin bazı kallus kültürlerinde, antimikrobiyal aktiviteyi etkileyen etkenlerden biri olduğu ortaya konmuştur.

Adıgüzel vd. (2005) tarafından *Ocimum basilicum* L. 'un etanolik, metanolik ve hegzan ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri in vitro koşullarda çalışılmıştır. 55 bakteri, 4 fungus ve 1 mayadan oluşan toplam 146 mikroorganizma, agar difüzyon ve MIC yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlarda, test edilen 3 ekstraktan hiçbir örneğin antifungal etki göstermediği ama antikandidal ve antibakteriyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Hegzan metanol ekstraktları 23 *Candida albicans* türünden 3 tanesine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, etanolik ekstrak etkisiz kalmıştır. *O. basilicum*'un 3 ekstraktı da farklı oranlarda antimikrobiyal etki göstermiştir. Hegzan ekstraktı, metanolik ve etanolik ekstraktlara göre daha güçlü ve geniş oranda antimikrobiyal etkiye sahip olurken, test edilen 146 bakteri türüne karşı sırasıyla %10, 9, 6 oranlarında inhibisyon etkisi ortaya koymuştur. Hegzan, metanolik ve etanolik ekstraktların MIC sonuçları sırasıyla, 125-250 µl/mL, 62.50-500 µl/mL ve 125-250 µl/mL olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer bulgular veren çalışmada araştırmacının bulguları bizim araştırmamızla benzerlik göstermektedir. Bizim çalışmamızda MIC değerleri 125 µl/mL ile 1000 µl/mL arasında değişkenlik göstermiştir.

Nayeemulla ve arkadaşları (2006); *Rauvolfia tetraphylla* ve *Physalis minima* bitkilerinin yaprak ve kallus ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini inceledikleri çalışmada, kullandıkları beş çözücü (alkol, benzen, kloroform, petrol eteri ve metanol) arasında, kloroform ile hazırlanan ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) 0.25 ila 6 mg / ml arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda *Ocimum basilicum* bitkisinin ve kallusların MIC değerinin 125 µg/mL (0.125 mg/ml) ile 1000

$\mu\text{g/mL}$ (1 mg/mL) arasında değiştiği sonuçların daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın sebebi farklı bitki ve mikroorganizma seçiminden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Grzegorzcyk-Karolaka ve arkadaşları (2009), *Salvia viridis* L. fenolik bileşiklerini ve bunların antioksidan, antimikrobiyal potansiyelleri üzerine araştırma yapmışlardır. Bu araştırmada, *Salvia viridis*'in metanolik kallus ekstraktlarında gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı büyümeyi engelleyici etkiyi tespit etmişlerdir. *E. coli* için 1,25 mg/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda da *Ocimum basilicum* bitkisinin ve kallus ekstrelerinin etkisi *E. coli* için MIC değeri 125 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir.

Nalbantbaşı ve Glc (2009) Kahramanmaraş yöresine ait 18 farklı şıfalı bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerini tespit ettikleri çalışmalarında *Ocimum basilicum* bitkisinin en yüksek etkiyi *E. coli*'ye karşı agar difüzyon metoduyla inhibisyon zonunu 9 mm olarak belirlemişlerdir. Yöntem olarak farklılık göstermesine rağmen aynı bitkinin aynı bakteriye karşı antimikrobiyal etkisi yaptığımız çalışmada da tespit edilmiştir.

Tüzün ve arkadaşları (2011) ; *G. olivieri* bitkisinin kök ve yaprak eksplantlarının karanlıkta kallus üretim kapasitesini araştırmışlardır. WPM ve MS ortamlarına kallus dokusu oluşumunu uyarmak için 0.5 mg/mL BAP, 1mg/mL NAA ile 0.2 ve 0.5 mg/mL KIN, 1 mg/mL NAA kullanmışlardır. En iyi kallus gelişimini yaprak eksplantında, 0.5 mg/mL BAP, 1 mg/mL NAA içeren WPM'de eksplant ekimini takiben 4 hafta sonra gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da *Ocimum basilicum* bitkisinden kallus üretimi aynı şekilde MS ortamlarında BAP, KIN, NAA ve 2.4D bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak yapılmıştır.

Abbasi F. ve arkadaşlarının (2014) *Ecballium elatarerium* bitkisindeki fenolik bileşiklerin gıda kaynaklı patojen bakteriler üzerindeki etkisini tespit ettikleri araştırmada *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimarium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *E. fecalis* bakterilerini kullanmışlardır. *E. elaterium* meyve ve yaprak oluşumunda metanol ekstraktının MIC değerini 0,31 – 0,04 mg/mL arasında değiştiğini bulmuşlardır. Bitkinin yaprak ve gövdesinde kökündeki fenolik bileşik miktarının 6 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer bakterilerle yaptığımız yaptığımız çalışmamızda yaprak ve yaprak saplarında en yüksek MIC değeri 125 $\mu\text{g/mL}$ (0,125 mg/mL) olarak tespit edilmiş olup benzer sonuç alınmıştır.

Shariff ve arkadaşları (2006) *R. tetraphylla* ve *P. minima* bitkisinin kloroform ve metanol zcleriyle hazırlanan yaprak ve kallus ekstraktlarının antimikrobiyal

aktivitesini tespit ettikleri çalışmada *R. tetraphylla* yaprak ekstraktının MIC değerini 2-4 mg/mL arasında değiştiğini bulmuşlardır. Araştırmacıların çalışma bitkisi *Ocimum basilicum*'a göre daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir (1-0,125 mg/mL).

Landa ve ark (2006) bazı *Nigella* türlerinden elde edilen kallus kültür ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini tespit ettikleri çalışmada , en yüksek MIC değerini *Bacillus cereus* bakteri için *Nigella* türlerine göre 25 µg/mL ile 50 µg/mL arasında ; *S. aureus* için 25 µg/mL ile 125 µg/mL arasında tespit etmişlerdir. *E. coli* için 50 µg/mL bulmuşlardır. *Ocimum basilicum* bitkisi ve kallus ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırdığımız çalışmamızda en yüksek MIC değeri çalışılan tüm bakterilerde 125 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Yıldırım (2008), *Centaurea balsamita* ve *Centaurea coronopifolia* türlerinin kloroform, etil asetat, aseton ve etanol ekstraktlarının *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus salivarius* bakterileri suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri MIC kullanılarak araştırdığı çalışma sonucunda, ekstraktların test mikroorganizmalarına karşı farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu görmüştür. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *C. balsamita*'nın kloroform ekstresi, *B. cereus*'a karşı göstermiştir. Çalışmasında kullandığı bitki ekstraktlarının *S. aureus* suşlarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, her iki türe ait etanol ekstraktlarının ise daha düşük aktiviteye sahip olduğunu belirtmiştir. Araştırmacının çalışması yöntem olarak bizim araştırmamızla paralellik göstermesine rağmen bulguları bizim araştırmamıza göre düşük olduğu, benzer bir şekilde metanol ve etanol ekstraktlarında daha iyi alınmıştır.

Yaptığımız araştırma sonucunda MIC yönteminde kullandığımız çözücüler içerisinde, antimikrobiyal etkinin en yüksek olduğu bulgular etanol ve metanole ait çözücülerde tespit edilmiştir. 0,5mg/Lt BAP+2mg/Lt 2.4D ve 0,5mg/Lt KIN+0,5mg/Lt 2.4D hormon konsantrasyon ve kombinasyonunda gelişen kallusların metanolik ve etanolik ekstraktlarının gerçek bitkiden daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Srivastava ve arkadaşları (2013), yeşil ve mor renkli reyhan (*Ocimum basilicum*) popülasyonlarının uçucu yağ bileşimini inceledikleri bu çalışmada, mor renkli reyhan popülasyonunun uçucu yağ analizi sonucunda metilkavikol ve humulen epoksitinin oranlarını sırasıyla; %40.5 ve %1.8 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda *Ocimum*

basilicum bitksinin uçucu yağ analizi yapılmış ve 18 yağ asidi tespit edilmiştir. %0,1 ile % 45 oranları arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Ocimum basilicum ‘un yaprak, yaprak sapı ve kallus ekstrelerinin yağ asidi ve metil esterleri araştırması sonucunda palmitik asit değerinin; gerçek bitki ve kalluslarla benzer sonuçlar verdiği, palmitoleik asit değerinin gerçek bitkide daha yüksek olduğu, linoleik ve α linolenik asit değerlerinde ise kallus ekstrelerinin doğal bitkiden daha etkili sonuç verdiği tespit edilmiştir.



6. ÖNERİLER

Tıbbi ve aromatik bitkiler hastalıkların önlenmesi ve iyileştirilmesi için ayrıca gıda, parfümeri ve kozmetik alanlarında geçmişten günümüze yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bir bitki olan reyhanın en çok kullanılan bölümü yapraklarıdır. Yapraklarından ve çiçekli dallarından distilasyon ile yaklaşık %0.05-1 arasında uçucu yağ elde edilmektedir. Reyhan uçucu yağı kozmetik, parfüm, aromaterapi, geleneksel tıp ve gıda aroması şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca sakinleştirici, balgam ve gaz söktürücü etkileri vardır. Reyhan bitkisinin antimikrobiyal, nematisidal, insektisidal, fungistatik, herbisidal ve antioksidan etkileri mevcuttur.

Ayrıca son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar artması, bilim insanlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya yöneltmiştir.

Bu çalışmada günümüzde yaygın olarak kullanılan *Ocimum basilicum* (Reyhan) bitkisine, farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri uygulanarak yaprak ve yaprak saplarından oluşturulan kallus kültürlerinin antimikrobiyal ve bazı biyokimyasal analizleri sonucunda bitkiye benzer veya daha etkin sonuçlar elde edilmesi yapılacak araştırmalara önemli referans olacaktır. Bulunan bulgular ışığında hem ilaç sanayi ham madde temini hemde eczacılık, bitki biyoteknolojisi ve kozmetik alanlarında ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Ayrıca bitki kültüre alınarak elde edilecek kallusların istenilen özelliklerinin arttırılabileceği, bu alanda farklı çalışmalara da temel oluşturulabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Sattar, A., Bankova, V., Kujumgiev, A., Galabov, A., Ignatova, A., Todorova, C. and Popov, S. 1995.** Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmazie*, 50;62–65.
- Acar .,1997.** Arpada doku kültürü ve bitki ıslahında yararlanma olanakları (Seminer). Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Adıgüzel, A., Güllüce, M., Şengül, M., Ögütcü, H., Şahin, F., Karaman, I. 2005.** Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. *Turk J Biol* 29 , 155-160
- Akgül, A. 1993.** Baharat Bilimi & Teknolojisi. Birinci Baskı, Ankara, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları* No: 15, Ankara:79-81.
- Akhtar, M.S. and Munir, M. 1989.** Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Solanumnigrum*, *Brassica oleraceae* and *Ocimum basilicum* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 27, 163–176.
- Akhtar, M.S.A., Akhtar, A.H. and Khan, M.A. 1992.** Antiulcerogenic effects of *Ocimum basilicum* extracts, volatile oils and flavonoid glycosides in albino rats. *Int. J. Pharmacognosy*, 30, 97–104.
- Aktar, S., Cebe, G.E. 2014.** Bitkisel drogların aktar-eczahane-eczane serüveni. XI. *National Conference on the History of Turkish Pharmacy*, 25-28 May 2014, Mersin.
- Amrani, S., Harnafi, H., El Houda Bouanani, N., Aziz, M., Caid, H.S., Manfredini, S., Besco, E., Napolitano, M., and Bravo, E. 2006.** Hypolipidaemic Activity of Aqueous *Ocimum basilicum* Extract in Acute Hyperlipidaemia Induced by Triton WR-1339 in Rats and its Antioxidant Property *Phytother. Res.* 20; 1040– 1045.
- Baydar, H., 2013.** Tıbbi Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (Genişletilmiş 4. Baskı). *SDÜ Yayınları*, 303s, Isparta.
- Baytop, T., 1999.** Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte ve Bugün). *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, İstanbul, Türkiye, p. 520.
- Baytop T. 1999.** Therapy with Medicinal Plants in Turkey. 2nd Edition, İstanbul, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 207.

- Bhamagar, M., Kapur, K.K., Jalees, S. and Sharma, S.K. 1993.** Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* Linnaeus and *O. sanctum* Linnaeus plants essential oils and their major constituents against vector mosquito species. *J. Entomol. Res.*, 17; 21–26.
- Caceres, A., Cano, O., Samayoa, B. and Aguilar, L. 1990.** Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 30; 55–73.
- Canan Yağcı Tüzün, Mehmet Cihat Toker ve Gülnur Toker. 2009.** *Gentiana olivieri* Griseb.'in Kallus Kültürlerinin Kurulması ve Sekonder Metabolitlerin Araştırılması Tarım Bilimleri Dergisi, Cilt:19, Sayı:3.
- Caragay, A. B. 1992.** Cancer preventive foods and ingredients. *Food Technol.*, 56, 6568.
- Ceylan, A., 1995.** Tıbbi Bitkiler I, 3. Baskı., *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, İzmir.
- Christie, W.W., 1990.** Gas chromatography and lipids, *The Oil Press*, Glaskow.
- Çelebi.,2010.** Fesleğenin (*Ocimum basilicum*) Fenolik Madde Dağılımı ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Davis, P. H. 1965-1984.** Flora of Turkey and the EastAegean Islands. Edinburgh U.P.
- Dube, S., Upadhyay, P.D., Tripathi, S.C. 1989.** Antifungal physicochemical and insect-repellent activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. *Can. J. Bot.*, 67, 2085-2087.
- Dürger,B., Ceyhan, M., Alitsaous, M., Uğurlu, E.,1999.** *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. *J. Of Biology* , 23: 377-384.
- Farnsworth, N.R., Akerev, O., Bingel, A.S. 1985.** The bulletin of world health organization, 63: 9865-9871.
- Faydaoğlu, E. Sürücüoğlu, M.S. 2011.** Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi, *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1): 52-67.
- Gülçin, İ., Elmasta, M., and Aboul-Enein, H.Y. 2007.** Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies *Phytother. Res.* 21; 354–361.
- Hara, A. and Radin, NS., 1978.** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Anal. Biochem.*, 90, 420–426.

- Hirasa, K., and Takemasa, M. 1998.** Spice Science Techonolgy; *Dekker*: New York.
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, H., Tsuda, T., Shirai, T., and Tatenatsu, M. 1986.**
Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 1071-1902.
- IzabelaGrzegorzcyk-Karolaka,ŁukaszKuźmaa,PawełLisieckib ve AnnaKissc., 2019.**
Accumulation of pheenic compounds in different in vitro cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential, *Phytochemistry Letters* 30,324-332.
- Janssen, A.M., Chin, N.L.J., Scheffer, J.J.C. and Baerheim Svendsen, A. 1986.**
Screening forantimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharmaceutisch Weekblad, Scientific edition*, 8; 277–280.
- Katzung, B.G. 1995.** Temel ve Klinik Farmakoloji. 1. baskı, *Barış Kitabevi*, İstanbul.
- Kayaalp, S.O. 2001.** Klinik Farmakolojinin Esasları ve Temel Düzenlemeler, 2.Baskı, Hacettepe-TAŞ, Ankara.
- Lin, C.C., Lin, J.K. and Chang, C.H. 1995.** Evaluation of hepatoprotective effects of “Chhit-Chan-Than” from Taiwan. *Int. J. Pharmacognosy*, 33; 139–143.
- Nayeemulla Shariff, M. S. Sudarshana, S. Umesha ve P. Hariprasad., 2006.**
Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts, *African Journal of biotechnology*, 570 006, Karnataka, India.
- Nuray Yıldırım, 2008.** *Centaurea balsamita* Lam. ve *Centaurea coronopifolia* Lam. Türlerin Antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
- Prasad, G., Kumar, A., Singh, A.K., Bhattacharya, A.K., Singh, K. and Sharma, V.D. 1986.** Antimicrobial activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. *Fitoterapia*, LVII; 429–432.
- Pierik, R.L.M., 1989.** In Vitro Culture of Higher Plants Martinus Nijhoff Publishers, *Dordrecht* 90-247-3531-9.
- Reiter, M. and Brandt, W. 1985** Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittelforschung*, 35; 408–414.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J. and Paseiro-Losada, P., 2002.** High performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macro algae, *Journal of Chromatography A*, 976, 277–284.

- Shariff ,N., Sudarshana,M. S., Umesha, S., Hariprasad, P., 2006.** Antimicrobial activity of, *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts, Department of Botany, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore 570 006, Karnataka, India. 2Department of Applied Botany and Biotechnology, University of Mysore, Manasagangotri, Mysore 570 006, Karnataka, India.
- SkMoquammel Haque, Avijit Chakraborty and Biswajit GhoshL.,2016.** High-frequency somatic embryogenesis and artificial seeds for mass production of true-to-type plants in *Ledebouria revoluta*: an important cardioprotective plant DOI: 10.1007/s11240-016- 1030-5
- Sökmen ve Gürel., 2000.** Sekonder Metabolit Üretimi. ‘Bitki biyoteknoloji. I- Doku Kültürü ve Uygulamaları Cilt I,211-61
- Srivastava, H. C., Srivastava, A., Shukla, P., Maurya, A. S., Tripathi, S.,2013.** Analysis of The Essential Oils Of Two Different Cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) From India, *IJPSR*, 4(4):1398-1400.
- Topçu ve Çölgeçen., 2015.** Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derl. Der.*, 8 (2): 09-29.
- URL-1, 2018** http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/engl/spice_welcome.html.
- URL-2, 2018** <http://www.bahce.biz/bitki/baharat/baharatlar/feslegen.htm>.
- URL-3, 2019** <http://www.mikrolobiyoloji.org>.
- URL-4, 2019** www.onikibigi.com
- URL-5, 2019** www.reyhan.gen.tr.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında, Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 2007 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne girdim ve 2011 yılında mezun oldum. 2015 yılında Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım.

