



SALVIA WIEDEMANNI BOISS.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR
Yüksek Lisans Tezi

Ayşe ÜSKÜNDAĞ

Eskişehir 2023

SALVIA WIEDEMANNI BOISS.
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

Ecz. Ayşe ÜSKÜNDAĞ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gökarp İŞCAN

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2023

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe ÜSKÜNDAG'ın “*Salvia wiedemanni* Boiss. üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” başlıklı tezi 19/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Gökalp İŞCAN	
Üye	: Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Gamze GÖGER	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET
SALVIA WIEDEMANNII BOISS. ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR

Ayşe ÜSKÜNDAĞ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2023

Danışman: Prof. Dr. Gökalg İŞCAN

Salvia wiedemannii Boiss. (Lamiaceae) halk arasında “Sultantacı” olarak bilinen, soğuk algınlığı, peptik ülser ve ağrı tedavisinde kullanılan Türkiye için endemik bir türdür. Halk arasında yaygın kullanımı olmasa da yapılmış sınırlı sayıda çalışma ile farklı kısımlarının ve ekstralarının çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu görülmektedir. Çalışmamız kapsamında, mayıs ayında toplanan bitkinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağın bileşimi GK/KS ve GK/AID ile aydınlatılmıştır. Uçucu yağ yanında, yine toprak üstü kısımlardan elde edilen *n*-hekzan, etil asetat, %70 etanol ve su ekstralarının seçilmiş bakteri ve *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmış, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Yapılan ön çalışmalarda biyoaktivitesi saptanan uçucu yağ ve %70 etanol ekstresinin biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşuna karşı minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) değerleri belirlenmiştir. Yapılan kromatosepektrometrik analizlerde uçucu yağın bileşiminin %96’sı belirlenmiş, ana bileşenler α -pinen, β -pinen ve 1,8-sineol olarak tespit edilmiştir. %70 etanol ekstresinin, *S. aureus* üzerinde 125 μ g/mL dozda (MİK) en yüksek inhibitör etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Uçucu yağın *S. aureus* üzerinde MBİK 500 μ g/mL, MBEK 2000 μ g/mL; %70 etanol ekstresinin MBİK 125 μ g/mL, MBEK 1000 μ g/mL olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Salvia wiedemannii*, Uçucu yağ, Ekstre, Antimikrobiyal, Anti-biyofilm aktivite

ABSTRACT
PHARMACOGNOSTICAL STUDIES ON *SALVIA WIEDEMANNII* BOISS.

Ayşe ÜSKÜNDAĞ

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2023

Supervisor: Prof. Dr. Gökalg İŞCAN

Salvia wiedemannii Boiss. (Lamiaceae) is an endemic species for Turkey and is known as "Sultantacı" among the Anatolian people and used in the treatment of colds, peptic ulcers and pain. Although it is not widely used among the public, it is seen that different parts and extracts have various bioactivities with a limited number of studies. Within the scope of our study, the composition of the essential oil obtained by hydrodistillation from the above-ground parts of the plant collected in May was clarified with GC/MS and GK/FID. In addition to essential oil, antimicrobial effects of *n*-hexane, ethyl acetate, 70% ethanol and water extracts obtained from above-ground parts were investigated against selected bacteria and *Candida* species, and minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined. The minimum biofilm inhibition concentration (MBIC) and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) values were determined against the biofilm forming *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain of essential oil and 70% ethanol extract, whose bioactivity was determined in the preliminary studies. In the chromato-spectrometric analysis, 96% of the essential oil composition was determined, and the main components were determined as α -pinene, β -pinene and 1,8-cineole. It was determined that 70% ethanol extract showed the highest inhibitory effect on *S. aureus* at 125 μ g/mL dose (MIC). The MBIK value of the essential oil on *S. aureus* was 500 μ g/mL, MBEC 2000 μ g/mL; the MBIK of 70% ethanol extract was determined as 125 μ g/mL and MBEC as 1000 μ g/mL.

Key words: *Salvia wiedemannii*, Essential oil, Extract, Antimicrobial, Anti-biofilm activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca her konuda yardımlarını, ilgisini, özverilerini, desteğini ve emeklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Gökâl İŞCAN'a,

Bitkimin toplanma ve teşhis sürecinde yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE'ye,

Laboratuvar çalışmalarında, ekstraksiyon sürecinde yardımlarını esirgemeyen, değerli hocam Araş. Gör. Burak TEMİZ'e,

Benim her zaman yardımına koşan, yol gösteren, bilgilerini esirgemeyen arkadaşım Araş. Gör. Zeynep GÜLCAN'a,

Hayatım boyunca her konuda maddi manevi yanımda olan, destek veren, yol gösteren canım anneme, babama ve ablama,

Bu zor, stresli sürecin içinde güneş gibi doğan canım yeğenime ve bu süreçte yanımda olan sabreden tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

19/06/2023

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Ayşe Üskündağ

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	4
2.1. Lamiaceae (Ballıbabagiller)	4
2.2. <i>Salvia</i> L.....	5
2.3. <i>Salvia wiedemannii</i> Boiss.....	6
2.4. <i>Salvia wiedemannii</i> Boiss. ile İlgili Yapılan Çalışmalar	8
2.5. Doğal Ürünlerde Antimikrobiyal Aktivite.....	11
2.6. Antimikrobiyal Doğal Madde Arayışında Kullanılan Bazı Yöntemler	12
2.6.1. <i>Difüzyon</i>	12
2.6.1.1. <i>Disk difüzyon</i>	12
2.6.1.2. <i>Agar kuyu difüzyon</i>	13
2.6.1.3. <i>Agar plug difüzyon</i>	13
2.6.1.4. <i>Cross streak</i>	14
2.6.1.5. <i>Poisoned food</i>	15
2.6.1.6. <i>İnce tabaka kromatografisi (İTK)-Biyootografi</i>	15
2.6.2. <i>Dilüsyon yöntemleri</i>	15
2.6.2.1. <i>Sıvı dilüsyon</i>	16
2.7. Mikroorganizmalarda Biyofilm	17
2.8. Biyofilm Oluşum Basamakları.....	20

2.8.1. Dönüşümlü tutunma.....	21
2.8.2. Geri dönüşümsüz tutunma	21
2.8.3. Koloni oluşumu.....	22
2.8.4. Olgun biyofilm oluşumu.....	22
2.8.5. Kopma ve ayrılma	22
2.9. Biyofilmin yapısı.....	22
2.10. Biyofilm yapısında iletişim Quorum sensing (QS)	24
2.11. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Bitkisel Materyal	26
3.2. Kullanılan kimyasallar ve standart maddeler	27
3.3. Kullanılan cihaz ve apareyler	27
3.4. Ekstraksiyon	28
3.5. Uçucu Yağ Eldesi.....	29
3.6. Gaz kromatografisi (GK)- Kütle spektrometresi (KS)	29
3.7. Gaz kromatografisi (GK)/Alev iyonlaşma dedektörü (AİD).....	30
3.8. Antimikrobiyal Çalışmalar	30
3.8.1. Kullanılan besiyerleri	30
3.8.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve inkübasyon.....	30
3.8.3. Agar kuyu yöntemi.....	30
3.8.4. Mikrodilüsyon yöntemi.....	31
3.8.4.1. Antikandidal etki.....	31
3.8.4.2. Antibakteriyel etki.....	32
3.8.5. Antibiyofilm Aktivite.....	32
3.8.5.1. Minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu	32
3.8.5.2. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Uçucu Yağ Bileşimi	36
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	38
4.2.1. Agar kuyu yönteminin sonuçları	38
4.2.2. Mikrodilüsyon yönteminin sonuçları.....	39
4.2.3. Minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyon sonuçları.....	42
4.2.4. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon sonuçları	43

5. TARTIŞMA.....	47
KAYNAKÇA.....	50
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>S. wiedemannii</i> Boiss. ile ilgili yapılan çalışmalar ve sonuçları.....	10
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar ve standart maddeler	27
Tablo 3.2. Kullanılan cihaz ve apareyler	27
Tablo 4.1. <i>S. wiedemannii</i> ekstralarının ve uçucu yağının yüzde verimi	35
Tablo 4.2. <i>S. wiedemannii</i> Boiss. uçucu yağının bileşimi	35
Tablo 4.3. Ekstrelerin ve uçucu yağın <i>Candida</i> ve bakterilere karşı MİK değerleri	39
Tablo 4.4. Uçucu yağın ana bileşenlerinin biyolojik etkileri	39
Tablo 4.5. Önceki çalışmalara göre etanol ekstresinin ana bileşenleri	41
Tablo 4.6. Örneklerin absorban tablosu (resazurin, 600 nm)	43
Tablo 4.7. Örneklerin <i>S. aureus</i> ATCC 6538 suşuna karşı % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Biyofilm yapısının şematik gösterimi	23
Şekil 2.2. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar	25
Şekil 3.1. Minimum Biyofilm İnhibisyon petrilerinin planı	34
Şekil 4.1. Uçucu yağ ve etanol ekstresinin % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu.	45
Şekil 4.2. Ampisilin % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu	45



GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>S. wiedemannii</i> Boiss.'nin yayılışı	6
Görsel 2.2. <i>S. wiedemannii</i> Boiss	7
Görsel 2.3. A- Disk difüzyon yöntemi B-Agar kuyu difüzyon yöntemi C- Agar plug difüzyon	13
Görsel 2.4. Agar plug yöntemi	14
Görsel 2.5. Cross streak yöntemi	14
Görsel 2.6. Biyofilmin oluşum basamakları	21
Görsel 3.1. Bitkinin toplandığı bölgedeki fotoğrafı ve herbaryum örneği	26
Görsel 3.2. <i>S. wiedemannii</i> 'nin etil asetat, n-hekzan, %70 etanol ekstraktları	28
Görsel 3.3. Uçucu yağ eldesi ve Clevenger aparatı	29
Görsel 4.1. <i>C. albicans</i> ve <i>C. tropicalis</i> agar difüzyon sonucu	37
Görsel 4.2. <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> petriyelerinin agar difüzyon sonucu	37
Görsel 4.3. Antibakteriyal etki testi plaklarından örnekler	38
Görsel 4.4. 1. petri MBİK-Kristal viyole, 2. petri MBİK-Resazurin	42
Görsel 4.5. 1. petri MBEK-CV, 2. Petri MBEK-Resazurin	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
AİD	: Alev İyonlaşma Dedektörü
AMP	: Antimikrobiyal Peptit
ATCC	: American Type Culture Collection
AÜ-BİBAM	: Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
BChE	: Butirilkolinesteraz
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ECOFF	: Epidemiyolojik Sınır Değer
EPS	: Ekstraselüler Polimerik Madde
GK	: Gaz kromatografisi
GK/KS	: Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi
HSV-1	: Herpes Simplex Virüs 1
IC50	: %50 Oranında İnhibe Eden Madde Konsantrasyonu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
KS	: Kütle Spektrometresi
KV	: Kristal Viyole
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon

MBİK	: Minimum Biyofilm İnhibisyon Konsantrasyonu
MBEK	: Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MHA	: Muller Hinton Agar
MHB	: Muller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
PDA	: Potato Dekstroz Agar
QS	: Quorum Sensing
RNA	: Ribonükleik Asit
SE	: <i>S. wiedemannii</i> %70 Etanol Ekstresi
SEA	: <i>S. wiedemannii</i> Etil Asetat İnfüzyonu
SF	: %0,085 NaCl
SH	: <i>S. wiedemannii</i> <i>n</i> -Hekzan Ekstresi
Sİ	: <i>S. wiedemannii</i> İnfüzyon
SUY	: <i>S. wiedemannii</i> Uçucu Yağ
TMC	: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
UV	: Ultraviyole

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrobiyoloji tarihinde mikroorganizmalar çoğunlukla sıvı ortamlardaki planktonik halleriyle bilinmektedir (Donlan, 2002). Ancak yalnızca planktonik bir yaşam şeklinde olmadıkları, 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek'un kendi dışından aldığı plaklar içinde yaşayan mikroorganizmaları tanımlamasıyla biyofilm yapısının varlığı ilk olarak ortaya konmuştur ve Leeuwenhoek biyofilmi küçük hayvanımsı yapı olarak tabir etmiştir (Körmezli vd., 2022). Tıp dünyasında ise biyofilm kavramı 1970'lerden sonra yerleşmiştir (Öztürk, 2018).

Biyofilm en basit tabiriyle mikroorganizmaların canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri hücre dışı polimerik matriks içinde çok hücreli gibi davranarak oluşturdukları topluluklardır. Planktonik bakteriler genelde biyofilm oluşturma eğilimindedir, biyofilm oluşturarak planktonik forma kıyasla daha üstün bir hale geçmektedirler (Körmezli vd., 2022). Biyofilm yapısı planktonik bakterilere kıyasla antimikrobiyallere ve biyositlere karşı dirençli bir haldir. Biyofilm tek bir tür mikroorganizmayı içerebildiği gibi farklı mikroorganizmaları da içerebilmektedir, ancak doğal şartlarda tek tür mikroorganizmadan oluşmuş biyofilm yapısı nadir görülmektedir (Öztürk, 2018). Günümüzde ise biyofilm oldukça ciddi sağlık sorunlarına sebep olmakla birlikte kalıcı ve tekrarlayan enfeksiyonların temel nedeni olarak gösterilmektedir (Verderosa vd., 2019). Yapılan çalışmalara göre insanlarda enfeksiyon kaynaklı tüm hastalıkların %80'inin, nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonların ise %65-75'inin sebebi olarak yine biyofilmler gösterilmektedir (Aktaş, 2018; Sakarya, 2018; Ünal ve Tayfur, 2017). Ayrıca ABD'de yapılan plastik cerrahi operasyonların %2'sinde biyofilm enfeksiyonları sebebiyle protezin değiştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Ünal ve Tayfur, 2017).

Biyofilmler dental plaklar, periodontitis, otitis media, osteomyelitis, kronik tonsilit, kistik fibrosiz pnömonisi, safra yolu enfeksiyonları, enfeksiyöz böbrek taşları, bakteriyel prostatit ve çeşitli implant kaynaklı enfeksiyonlara ve daha birçok inatçı enfeksiyona yol açmaktadır (Ünal ve Tayfur, 2017). Biyofilmler canlı dokular, implantlar, endüstriyel borular, içme suyu boruları ve doğal su sistemleri dahil olmak üzere çok çeşitli yüzeylerde oluşabilmektedir (Donlan, 2002). Biyofilmler tıbbi ve endüstriyel açıdan çeşitli sorunlara sebep olmaktadır. Biyofilm yapısı mikroorganizmayı çevresel şartlardan korumakla birlikte, fagositoza uğramayı zorlaştırmakta ayrıca

antimikrobiyallere, dezenfektanlara, konakçı canlının savunma sistemine karşı oldukça dirençli hale getirmektedir (Körmezli vd., 2022).

Biyofilm yapısı planktonik formdakilere kıyasla bakterilere antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı çok daha fazla direnç kazandırır. Her geçen gün artan dezenfektan ve biyosit dirençliliği sebebiyle hem enfeksiyonunun tedavisi zorlaşmakta hem de tedavinin maliyeti oldukça artmaktadır (Arar, 2015). Mevcut bakterisidal temelli antibiyofilm teknolojilerinin hiçbirisi tek başına biyofilm oluşumunu engelleyememektedir (Ceyhan, 2008).

Tüm bu sebeplerle mevcut antibiyotiklere direnç, araştırmacıları biyofilmleri yok etmede yeni yöntemler ve tedavi ajanlarını araştırmaya itmiştir (Lu vd., 2019). Son yirmi yılda biyofilm oluşumunu ve mikroorganizmalar arasında haberleşmeyi sağlayan Quorum Sensing (QS) sistemini önlemede bitkilerden elde edilen doğal ürünleri içeren yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir (Lu vd., 2019).

Bitkiler ve bitkisel ilaçlar farklı kültürlerde çok uzun yıllardır farklı amaçlarla hastalıkların tedavisi ve önlenmesi amacıyla halk arasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde de mevcut antibiyotik tedavilerine direnç ve doğal tedavi yöntemlerine rağbet bizi yeni antibiyofilm stratejilerini araştırmaya itmiştir. Özellikle antimikrobiyal etkileri iyi bilinen uçucu yağlar bu yönde çok çalışılan bitkisel madde grubudur. Güncel tedavi yöntemlerinde biyofilmlerin antibiyotiklere olan direnci tedaviyi zorlaştırıp maliyetini arttırmakta ve insan sağlığı açısından düşünüldüğünde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılmasıyla oluşan sorunlar bizi günümüzde de oldukça popüler olan uçucu yağ ve bitkisel ekstraktların kullanılarak bunların antibiyofilm etkisini araştırmaya itmiştir. Lamiaceae familyasında yer alan bir cins olan *Salvia* sp. ülkemizde de geniş yayılım göstermektedir. Dünyada *Salvia* ismiyle bilinen ve halk arasında adaçayı olarak adlandırılan bitki ülkemizde yaygın bir şekilde nezle, grip, üst solunum yolu enfeksiyonlarında ayrıca gaz söktürücü, midevi, tonik, diüretik olarak ve çay olarak kullanılmaktadır (Eröz, 2001; Akıncı, 2018; Şenol, 2009). Ayrıca harici olarak yara iyi edici ve antiseptik olarak da kullanılmaktadır (Eröz, 2001). Antioksidan, antimikrobiyal, antialzheimer, hipotansif, antihiperglisemi, antihiperlipidemi, antikanser, antienflamatuar, antienzimatik ve cilt iyileştirici özellikleri bilinmekte ve gıda olarak ve tıbbi amaçlar ile kullanılmaktadır (Sharifi-Rad vd., 2018; Yılmaz vd., 2023). *Salvia*

türlerinin antiviral ve antibakteriyel özelliklerinin varlığı da antibiyofilm çalışması açısından bize umut vermiştir (Çadırcı vd., 2012).

Salvia wiedemannii Boiss. Lamiaceae familyasında yer alan İç Anadolu Bölgesinde yayılış gösteren odunsu aromatik, endemik bir bitkidir. Halk arasında yaygın kullanımı olmamasına rağmen uçucu yağı ve ekstralarının bileşimleri antiviral ve antibakteriyel etkileri açısından umut vericidir. Bu düşünceler ışığında bu çalışmada İç Anadolu Bölgesinde lokal olarak yayılış gösteren ve biyoaktif bir bitki olan *Salvia wiedemannii*'nin çeşitli ekstralarının ve yapısı aydınlatılan uçucu yağının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi üzerinde çalışmalar yapılmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Lamiaceae (Ballıbabagiller)

Yaklaşık 250 cins 7000'den fazla türden oluşan Lamiales ordosunda yer alan Lamiaceae familyası; Labiate, Ballıbabagiller, Nanegiller olarak da bilinmektedir ve gen merkezi Akdeniz Bölgesidir (Başer ve Kırimer, 2018; Eröz, 2001; Napoli, Siracusa, Ruberto, 2020). Türkiye Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden birisidir (Başer ve Kırimer, 2018; Koyuncu, 2010). Tropik ve subtropik alanlarda geniş yayılış göstererek hemen hemen dünyanın her bölgesinde varlığını gösteren kozmopolit bir familyadır (Başer ve Kırimer, 2018, Eröz, 2001).

Lamiaceae familyası 245 cins ve 7886 türden oluşan geniş bir familyadır (Napoli, Siracusa, Ruberto, 2020). 46 cins, 603 tür, 179 alttür ve varyeteden oluşan 782 taksonu Türkiye'de yayılış göstermektedir. 346 takson (271 tür ve 75 alttür ve varyete) ise endemiktir (Başer ve Kırimer, 2018).

Genellikle yüksek miktarda ve farklı bileşimlerde uçucu yağa sahip aromatik bitkilerin yer aldığı Lamiaceae familyası çoğunlukla otsu, çalimsı veya yarıçalimsı bitkilerden oluşur nadiren ise odunsudur. Gövdeleri enine kesitte sıklıkla dört köşelidir. Toprak üstü üreme ve vejetatif organlar uçucu yağ üreten glandüler trikomlar ile kaplıdır (Enache ve Neagoie, 2020). Familyanın önemli karakteristik özellikleri yapraklarının dekkusat dizilişli olması, çiçeklerin her nodusta vertisilastrum olması, korollanın bilabiat olması, baş kısmı sekiz hücreli salgı tüylerine sahip olması, meyvelerin ise 4 nuksa ayrılmasıdır (Abak, 2018; Tanker, 2014 s. 275).

Lamiaceae familyası biyolojik ve tıbbi uygulamalarda önemli role sahip çok çeşitli bitkileri içermektedir. Lamiaceae familyasında yer alan bitkilerin tıbbi, farmakolojik, kozmetik ve endüstriyel alanlarda öneme sahip olduğu bilinmektedir. Lamiaceae familyasının *Salvia* L. (adaçayı), *Thymus* L. (kekik), *Rosmarinus* L. (biberiye), *Lavandula* L. (lavanta), *Mentha* L. (nane) gibi birçok önemli cinsi olup, bunların en büyüklerinden birisi de Türkiye'de adaçayı olarak adlandırılan *Salvia* cinsidir. Türkiye'de Lamiaceae familyasında 53'ü endemik olmak üzere 101 taksonla temsil edilen en büyük ikinci cins *Salvia* L. cinsidir (Yılmaz vd., 2023).

Dünyada *Salvia* cinsine ait 1000'e yakın tür bulunmakta olup bunlar çoğunlukla Akdeniz, Amerika, Güneydoğu Asya ve Güney Afrika'da yayılış göstermektedir çok

geniş yayılış gösteren bu cins de hemen hemen kozmopolit yapıya sahiptir (Kunduhoglu vd., 2011, Topcu, 2006, Eröz, 2001).

2.2. *Salvia* L.

Salvia L. dünya üzerinde yaklaşık 1000 tür ile temsil edilmektedir (Turdiboev vd., 2022). *Salvia* L. hemen hemen tüm dünyada yetişir ve yaygın olarak bulunur fakat başlıca üç bölgede yayılış göstermektedir; Güney Doğu Asya, Güney Avrupa, Orta ve Güney Amerika (Yousefzadi vd., 2007; Topcu vd., 2017). Orta Asya’da 24’ endemik olmak üzere 41 yerli *Salvia* türü bulunmaktadır (Turdiboev vd., 2022). *Salvia* türleri Türkiye’de yaygın olarak görülmektedir (stn vd., 2016). 53’  endemik olmak üzere 101 tür ile temsil edilmektedir. Bu tür %52,5 oranda endemiktir. *Salvia* türlerinin ihracatı ve kullanımı açısından Türkiye önemli bir ülkedir (Küpeli Akkol vd. 2008).

Salvia kelimesi Latince salvare kökünden türemiştir ve iyileştirmek anlamına gelmektedir (Kaya vd., 2009). *Salvia* türünün iyileştirici özelliği çok eski zamanlardan beri bilinmektedir (Yılmaz vd., 2023). Antik ağlardan bu yana birçok hastalığı tedavi amacıyla halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Topcu, Yücer ve şenol, 2017). Türkiye’de adaçayı olarak bilinen *Salvia* türleri tonik uyarıcı idrar söktürücü gaz giderici ve antiseptik olarak kullanılmaktadır (Kunduhoglu vd., 2011). *Salvia* türleri Avrupa halk hekimliğinde hafızayı güçlendirmek için kullanılmaktadır (Orhan vd., 2007).

Halk arasında bitki ayı ve baharat olarak geniş kullanıma sahiptir. Çeşitli kullanım alanları, fitokimyasal ve farmakolojik araştırmalarla birlikte *Salvia* türleri ‘her derde deva bitki türü’ olarak kabul edilmektedir. Yunan tıbbında kullanılan ‘‘Bahçesinde adaçayı yetişen neden ölsün?’’ ifadesi bu türün kullanım alanı ve değerlerini anlamak adına çok etkileyici bir ifadedir ([http-3](http://3)).

Salvia türleri uçucu yağ bakımından zengin ve hoş kokulu aromatik bitkilerdir (adırcı vd., 2012). Ayrıca uçucu olmayan fenolik bileşikleri, antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinden dolayı Avrupa’da ve diğer birçok ülkede gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır (Kandemir vd., 2022).

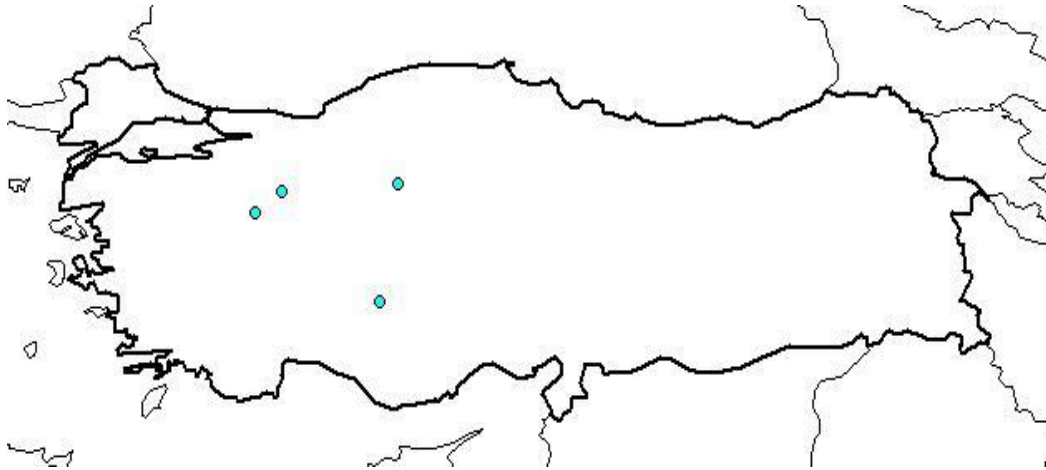
Salvia türleri antiseptik, antibakteriyel, astrenjen, antiinflamatuvar, antiviral, sitotoksik, spazmolitik, antikonvülsan, antimikobakteriyel aktiviteleri içeren bir dizi biyolojik etkiye sahiptirler (adırcı vd., 2012). Çeşitli *Salvia* türleri eski çağlardan bu yana romatizmal ağrılarda, kanama ve menstural rahatsızlıklarda, kolik şişkinlik, ishal,

kabızlık, karın ağrısı gibi çeşitli gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, soğuk algınlığı, grip, bronşit, tüberküloz gibi rahatsızlıklarda ve hatta epilepside kullanılmıştır (Yousefzadi vd., 2007; Üstün ve Sezik, 2011; Topçu, 2016). Ayrıca *Salvia* türleri hafızayı kuvvetlendirmede ve baş ağrısında da kullanılmaktadır (Çatık ve Atalay, 2022). Çeşitli *Salvia* türleri ile yapılan çalışmalarda antimikrobiyal ve insektisit etkilerine dair olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Gün vd., 2011; Özkan vd., 2009).

Geleneksel Türk halk hekimliğinde de farklı hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Yılmaz vd., 2023). Günümüzde hala *Salvia* türleri halk arasında sık kullanılmakta ve bilim insanları tarafından çeşitli araştırmalara konu olmaktadır. Bu tür etkileri dolayısıyla tıp, kozmetik, parfümeri ve gıda endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır (Yousefzadi vd., 2007).

2.3. *Salvia wiedemannii* Boiss.

Salvia wiedemannii Boiss. Ülkemizde İç Anadolu'nun kireç taşı yamaçlarında, yol ve tarla kenarlarında endemik olarak yetişmekte olan Lamiaceae familyasının *Salvia* cinsine ait aromatik bir bitkidir (Görsel 2.1). Mayıs ve temmuz aylarında çiçeklenmekte olup İran-Turan bölgesine ait çok yıllık, odunsu bir bitkidir.



Görsel 2.1. *S. wiedemannii* Boiss. 'nin yayılışı (http-1)

S. wiedemannii Boiss. Görsel 2.2'de görüldüğü gibi 10-20 cm boyunda dik gövdeli, gövdesinde ince, genellikle yukarı yönlü tüyler bulunan odunsu bir bitkidir (Kaya, 2011). Genelde Lamiaceae familyası bitkilerinde olduğu gibi gövdesi dikdörtgen şeklindedir (Kaya, 2011). Yapraklar pinnatisekt, kenarları düz, yaprakların ucu ise

sivridir. Çiçek durumu 2-6 çiçekli vertisilat, brakte ise ovat, ovat-lanseolat şeklindedir (Kaya, 2011). Kaliks kırmızımsı-mor tübüler çan şeklinde iki dudaklı üst dudak üç dişli alt dudak iki dişlidir ve kaliksin iç yüzeyinde kısa tüyler bulunmaktadır (Kaya, 2011). Korolla leylak-mavi renkli iki dudaklı, üst dudak halkalı, alt dudak iki uçludur, dudaklar yoğun glandüler trikomlarla kaplıdır (Kaya, 2011).



Görsel 2.2. *S. wiedemannii* Boiss.

S. wiedemannii Boiss. aromatik bir bitkidir ve bu bitkiden elde edilen uçucu yağın ana bileşenlerinden biri 1,8-sineol (ökaliptol) olarak belirlenmiştir (Kaya vd., 2009). Ökaliptol geleneksel tıpta bronşit, sinüzit ve soğuk algınlığı için sekretolitik bir ilaç olarak da kullanılmıştır (Kaya vd., 2009). Ökaliptol pastil, boğaz spreyi, gargara gibi birçok farmasötik form içerisinde antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu uçucu yağ α -pinen ve β -pineni de yüksek oranlarda içermektedir (Kaya vd., 2009).

S. wiedemannii Boiss. Türk halk hekimliğinde bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Üstün vd., 2016). *S. wiedemannii* Boiss. Bilecik ili Osmaneli ilçesinde halk arasında toprak üstü kısımlarında soğuk algınlığında, peptik ülserde ve ağrı tedavisinde kullanılmaktadır fakat bu türün bölgede halk arasında kullanımı pek yaygın değildir (Koyuncu, 2010; Üstün ve Sezik, 2011; Topçu, Yücer ve Şenol, 2017).

2.4. *Salvia wiedemannii* Boiss. ile İlgili Yapılan Çalışmalar

S. wiedemannii Boiss. ekstre ve uçucu yağlarının bileşenleri ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Anadolu *Salvia* türlerinin toprak üstü kısımları, çiçekleri ve yaprakları flavonoidler, triterpenoidler, monoterenler içerirken türün kök kısımları çoğunlukla diterpenoid bileşikler içerir. *S. wiedemannii* Boiss.'in toprak üstü kısımlarında ise abiaten diterpenoidler bulunmaktadır bunlar; 14-oksoimarik asit, 3-oksoabiete-8,11,13-trien, 7-O-asetilhorminon, kriptanol, ferruginol, horminon, wiedemannik asit, wiedelakton, pimaron diterpenoidler; 7- β -hidroksisandarkopimarik asit, izopimarik asit, 12-metoksipsiferik asittir (Topçu, Yücer, Şenol, 2017).

Demirci ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada Eskişehir-Çatacık lokasyonundan toplanan *Salvia wiedemannii* Boiss.'in herbasından elde edilen uçucu yağın bileşenleri GK/KS'de incelenmiş α -pinenin bağlı yüzdesi %32,8, β -pinenin bağlı yüzdesi ise 17,7 bulunmuştur. (Demirci vd., 2002).

Kaya ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada *Salvia wiedemannii* Boiss.'den elde edilen uçucu yağın bileşenleri dört ana kimyasal sınıfa ayrılabilir: monoteren hidrokarbonlar, oksijenli monoterenler, seskiterpen hidrokarbonlar ve diğerleri. Bu çalışmada uçucu yağın totalde, %96'sını oluşturan 35 bileşik tanımlanmıştır. Uçucu yağın ana bileşenleri yüzdeleri ile beraber şu şekilde bulunmuştur: 1,8-sineol (%38,4), β -pinen (%24,5) ve α -pinen (%13,6) (Kaya vd., 2009). Kunduhoğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada *S. wiedemannii*'nin uçucu yağının ana bileşeni %36,2 oranda α -pinen olarak bulunurken bunu sırasıyla %14,2 1,8-sineol, %13,3 β -pinen, %7,4 kamfor, %5,4 *p*-simen, %4,3 kamfen takip etmektedir. Yılmaz ve arkadaşları tarafından 2023 yılında Konya Cihanbeyli lokasyonundan toplanan *Salvia wiedemannii*'nin toplam fenolik ve flavanoid içeriği SK-KS/KS'de belirlenmiştir. Toplam fenol konsantrasyonu $29,79 \pm 0,57$ μ g PEs/mg, toplam flavanoid konsantrasyonu ise $11,24 \pm 0,12$ μ g PEs/mg olarak tespit edilmiştir. Kinik asit, fumarik asit, protokateşik asit, klorojenik asit, protokateşik aldehit, kafeik asit, luteolik asit, salisilik asit, izokersetin, hesperidin, rosmarinik asit, kosmosiin, astragolin, kersetin, naringenin, luteolin, apigenin, akasetin bileşenleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Salvia wiedemannii*'nin fenolik bileşenleri arasında en çok bulunan bileşen 5,157 mg/g ile rosmarinik asit olmuştur (Yılmaz vd., 2023). *Salvia wiedemannii*'nin metanol ekstresi

GK/KS’de incelenmiş α -amirin, oleanolik asit, ursolik asit triterpenleri tespit edilmiştir (Yılmaz vd., 2023).

Bu bitki ile ilgili biyoaktivite çalışmaları da mevcuttur. Bunlardan aşağıda bahsedilmiştir.

Şenol ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı çalışmada 55 *Salvia* türü incelenmiş ve *S. wiedemannii*’nin etil asetat ve metanol ekstresinin DPPH radikal süpürücü etkisi %90’nın üzerinde saptanmıştır (Şenol vd., 2010).

Üstün ve Sezik’in 2011 yılında *Salvia wiedemannii* Boiss.’nin kloroform, etanol, bütanol ve su ekstraktlarının fareler üzerinde yapılan çalışmalarda analjezik etkiye sahip olduğu bulunmuştur ve kloroform ekstresinin morfine yakın bir analjezik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma halk arasında analjezik kullanımının doğruluğunu kanıtlamıştır (Üstün ve Sezik, 2011).

Salvia wiedemannii Boiss.’nin uçucu yağı Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayan asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzimleri üzerinde orta derecede etkili bulunmuştur (Kunduhoglu vd., 2011).

Salvia wiedemannii Boiss.’nin uçucu yağı çeşitli mikroorganizmalar üzerinde bakteriyostatik etki göstermiş ve çeşitli funguslar üzerinde standart antifungallerden daha etkili bulunmuştur (Kunduhoglu vd., 2011).

Üstün ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmalar sonucunda *Salvia wiedemannii* Boiss.’nin çeşitli ekstrelerinin HSV-1 ve parainfluenza-3 üzerinde yapılan antiviral çalışmaları üzerinde su, kloroform, etanol ekstrelerinin HSV-1 üzerinde kontrol ile aynı şekilde antiviral aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur ve aynı çalışmada bu ekstreler antiviral ve sitotoksik etkiler açısından umut verici bulunmuştur (Üstün vd., 2016).

Salvia wiedemannii Boiss.’nin uçucu yağının kojik asit referans alınarak tirozinaz enzimi üzerinde inhibisyon aktivitesi incelenmiş ve kojik asite göre bu inhibisyon aktivitesi, oldukça düşük bulunmuştur (Yılmaz vd., 2023).

Bu çalışmalar ile ilgili daha ayrıntılı bilgiler Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. *S. wiedemannii* Boiss. ile ilgili yapılan çalışmalar ve sonuçları

Ekstre/ UY	Aktivite	Sonuç	Referans
Toprak üstü	Analjezik	Tail flick testinde 500 mg/kg dozda analjezik	Üstün ve
CHCl ₃ ekstresi		aktivite	Sezik, 2011
BuOH ekstresi	Antiviral	Parainfluenza (PI) üzerinde sitopatojenik etki	Üstün,
		inhibisyon konsantrasyonu 16-64 mg/mL	Özçelik,
			Baykal, 2016
H ₂ O, CHCl ₃ ,	Antiviral	HSV-1 üzerinde sitopatojenik etki inhibisyon	Üstün,
EtOH ekstreleri		konsantrasyonu 16-<0,25 µg/ml	Özçelik,
			Baykal, 2016
Uçucu yağ	Antimikrobiyal	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 suşuna karşı MİK değeri	Kunduhoglu
		12,5 µl/mL,	vd., 2011
		<i>E. faecium</i> NRRL 2354 suşuna karşı MİK değeri	
		12,5 µl/mL,	
		<i>C. albicans</i> NRRL 12983 suşuna karşı 50 µl/mL,	
		<i>C. glabrata</i> NRRL 1431 25 µl/mL,	
		<i>S. cerevisiae</i> NRR 12796 12,5 µl/mL	
Uçucu yağ	AChE	400 µM konsantrasyonda %55.95±2.01	Kunduhoglu
	inhibisyon		vd., 2011
Uçucu yağ	BchE	400 µM konsantrasyonda %50.97±3.12	Kunduhoglu
	inhibisyon		vd., 2011
MeOH ekstresi	Enzim	AChE inhibitör aktivite 58.23± 2.01 mg/mL	Yılmaz vd.,
	inhibisyon	BChE inhibitör aktivite 41.67±1.64 mg/mL	2023
		Tirozinaz inhibitör aktivite 15.41±4.68 mg/mL	
		Elastaz inhibitör aktivite 26.76±0.08 mg/mL	
		Kolejenaz inhibitör aktivite 9.78± 0.06 mg/ml	
MeOH ekstresi	Antioksidan	IC50 249,89±1,69 mg/mL	Yılmaz vd.,
	(ABTS)		2023
MeOH ekstresi	Antioksidan	İyon şelatlama aktivitesi IC50 4865 ±0.22 mg/mL	Yılmaz vd.,
			2023
Diklorometan	AChE enzim	100 µg /mL' de yüzde inhibisyon 5.56 ± 0.40	Şenol vd.,
ekstresi	inhibitör etkisi		2010
Etil asetat	Antioksidan	25 µg /ml' de yüzde inhibisyon 53.47 ± 0.08	Şenol vd.,
ekstresi	(DPPH)	50 µg /mL' de yüzde inhibisyon 84.42 ± 0.72	2010
		100 µg /mL' de yüzde inhibisyon 90.85 ± 0.25	

2.5. Doğal Ürünlerde Antimikrobiyal Aktivite

Dünya sağlık örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl milyonlarca insan antimikrobiyal direnç sebebiyle hayatını kaybetmektedir (http-6). DSÖ'nün 2019 yılında yayınladığı 'Küresel Sağlığa Yönelik 10 Tehdit' bildirisi içerisinde antimikrobiyal direnç 5. sırada yer almakta ve bu ciddi bir sağlık sorunu olarak değerlendirilmektedir (http-8). 1928 yılında penisilinin keşfi ile başlayan antibiyotik serüveni günümüzde insanların ihtiyaçları dışında ve yanlış kullanımları başta olmak üzere çeşitli sebeplerle direnç geliştirerek inatçı kalıcı enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Ünal, Öztürk ve Selçuk, 2022). Penisilin keşfi üzerinden çok geçmeden 1940'lı yıllarda hastane kaynaklı stafilokokların %40'ı penisiline duyarlı bulunmuştur (Demirtürk ve Demiral, 2004). Direnç sorununun ortaya çıkmasıyla beraber çoklu antibiyotik tedavileri başlamıştır. Fakat bu tür antibiyotiklere de hızla direnç gelişmiştir. DSÖ 2019'daki bildirisinde 600.000 tüberküloz hastasının %82'sinin çoklu ilaç tedavisine de dirençli olduğunu bildirmiştir (http-8).

Sağlık bakanlığı tarafından düzenlenen 7. Akılcı Antibiyotik Kullanımı sempozyumunda 2011 yılında ülkemizde toplam ilaç satışının %13'ünü antibiyotiklerin oluşturduğu ancak bu rakamın 2021 yılında %6'ya gerilediği belirtilmektedir (http-7). Ayrıca her yıl 700.000'den fazla kişinin antibiyotik direnci sebebiyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir (http-7).

Antimikrobiyallerin sadece tıp dünyasında değil; gıda, tarım ve hayvancılıkta da bilinçsiz şekilde kullanımı antimikrobiyal direnç döngüsünde önemlidir.

Tüm bu veriler antimikrobiyal direncin ciddiyetini gözler önüne sermekte ve yavaş yavaş toplumsal bilinç oluşmaya başlamaktadır. Bu sebeplerle tedavide yeni arayışlar başlamış ve doğal antimikrobiyallerde bir seçenek olarak sunulmuştur. Bitkiler uzun yıllardır halk hekimliğinde yaygın bir şekilde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkiler bileşimindeki organik asitler, fenolik bileşikler ve uçucu yağlar ile antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Yücel, Şengün ve Öztürk, 2018). Fakat etki mekanizmaları net olarak açıklanamamaktadır.

Bitkilerden elde edilen antimikrobiyal peptitler (AMP) mikroorganizmalar üzerinde çeşitli etkileri ile Multidrug resistant, (çoklu ilaç direnci, MDR)pompasını inhibe ederek etki gösterebilecek yeni antibiyotiklerin keşfi için potansiyel bir aday

olarak gösterilmiştir (Onbaşlı, Yuvalı Çelik ve Katırcıoğlu, 2020). Çeşitli tıbbi aromatik bitkilerden ekstre edilen uçucu yağlar da bakteriyel, viral ve fungal patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal etkiye sahiptir (Swamy, Akhtar ve Sinniah 2016). Swamy ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı çalışmada yakın tarihte uçucu yağlar patojen mikroorganizmaların tedavisinde alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Swamy, Akhtar ve Sinniah 2016). Bitkiler geniş bir kimyasal çeşitliliğe sahip oldukları için yeni antimikrobiyal ilaç geliştirmede önemli kaynaklar olabilir (Vila, Freixa ve Cañigüeral 2013). Güncel çalışmalarda bu yönde ilerlemektedir.

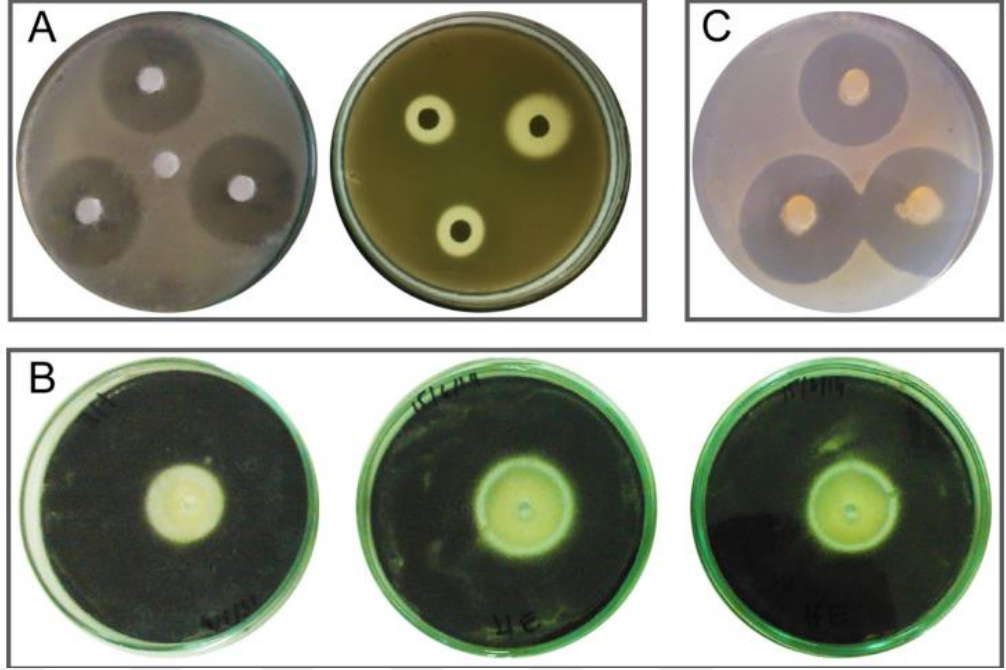
2.6. Antimikrobiyal Doğal Madde Arayışında Kullanılan Bazı Yöntemler

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemler difüzyon ve dilüsyon yöntemidir.

2.6.1. Difüzyon

2.6.1.1. Disk difüzyon

Disk difüzyon yöntemi 1940 yılında keşfedilen rutin olarak laboratuvarda antibiyotik duyarlılığının saptanması için en çok kullanılan, ucuz, kolay ve aynı anda birden fazla antimikrobiyalın test edilebildiği kalitatif bir yöntemdir (http-4; Balouiri, Sadiki ve Ibnsouda, 2016; http-5). Mikroorganizmaların inoküle edildiği besiyere kâğıt disklerle emdirilmiş antibiyotiklerin difüze olması temeline dayanır (Görsel 2.3) (http-4). Uygun şartlarda inkübe edilen petri üzerinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülür (Balouiri, Sadiki ve Ibnsouda, 2016). İnhibisyon zonu uygulamada ideal antibiyotik seçimini sağlasa da bakteristatik ya da bakterisidal açıdan bilgi vermemektedir (Balouiri, Sadiki ve Ibnsouda, 2016). Doğal maddelerin keşfinden kâğıt disklerle antibiyotikler yerine bitki veya mikroorganizma ekstraktları emdirilerek hedef mikroorganizma aşılı plaklara yerleştirilir. Klinik laboratuvar standartları enstitüsü (CLSI) standartlarına göre bakterilerin ideal büyüme ortamı Muller Hinton Agar (MHA), inkübasyon sıcaklığı 35° ve inkübasyon süresi 16-18 saat olarak verilmiştir, funguslar için ise ideal büyüme ortamı %2 glikoz ve 0,5 mg/mL metilen mavisi ile desteklenmiş MHA, inkübasyon derecesi 35° ve süresi 20-24 saat olarak verilmiştir.



Görsel 2.3. A- Disk difüzyon yöntemi B-Agar kuyu difüzyon yöntemi C- Agar plug difüzyon yöntemi (Balouiri, Sadiki, Ibensouda, 2016).

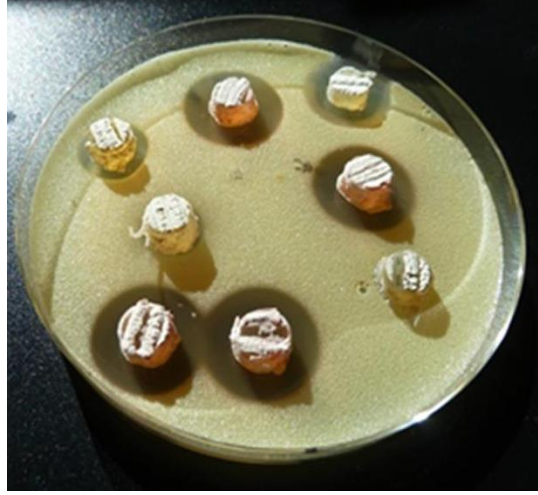
2.6.1.2. Agar kuyu difüzyon

Agar-well difüzyon da denmektedir. Agarda açılan kuyucuklara diskler yerine sıvı formda antimikrobiyal ajanlar koyulmaktadır (Görsel 2.3 B).

Antifungallerin duyarlılık testinde kullanılmaktadır. Mikroorganizma yetiştirilmiş katı besiyeri içeren petride belirli yerlere kuyucuk açılarak bu kuyucukların içerisine antimikrobiyal ajanların difüze edilmesi temeline dayanır (Aytar vd., 2019).

2.6.1.3. Agar plug difüzyon

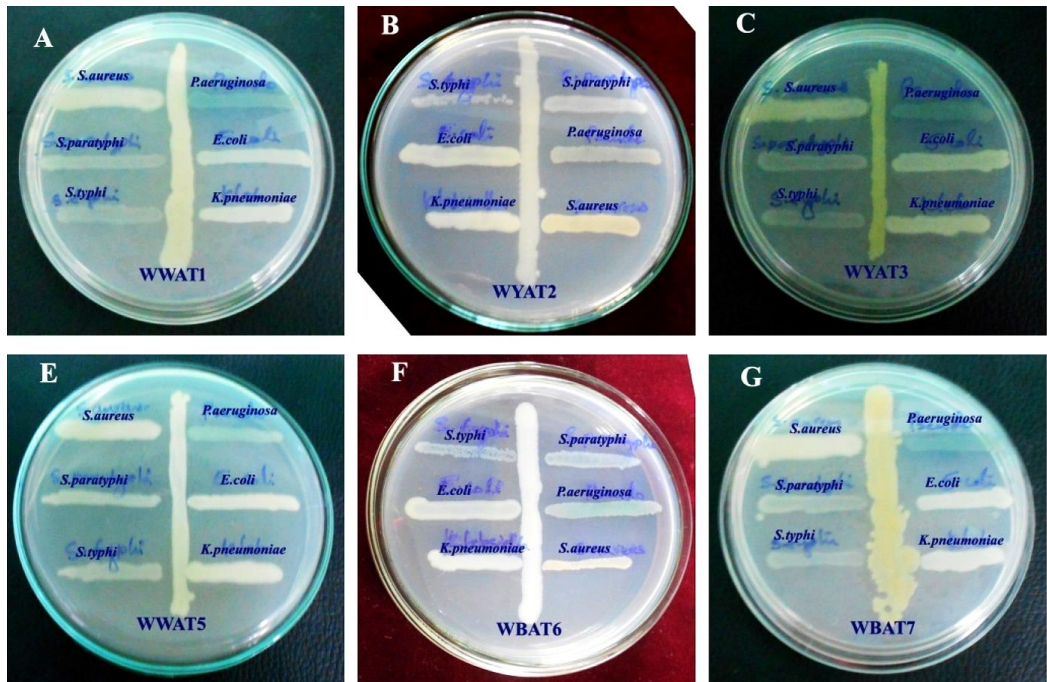
İki organizma arasındaki antagonizmayı belirlemek için kullanılır ve disk difüzyon yöntemine benzer bir prosedüre sahiptir (Görsel 2.4). Farklı bir petride gelişmiş mikroorganizma kültüründen alınan disklerin hedef organizma aşılı besi ortamına transferine dayanır (Balouiri, Sadiki, Ibensouda, 2016).



Görsel 2.4. Agar plug yöntemi (Sarmiento-Vizcaino vd., 2021)

2.6.1.4. Cross streak

Hızlı bir şekilde antagonizmi saptamada kullanılır. Hedef mikroorganizma katı besiyerine ortada tek bir çizgi şeklinde ekilir ve 2-5 gün inkübasyona bırakılır (Görsel 2.5). Ardından test mikroorganizmaları aynı petriye hedef mikroorganizmayı dik kesecek şekilde ekilir ve etkileşimler inhibisyon zonları incelenir. Bu yöntem her izolatin aynı şartlarda (besiyeri, inkübasyon süre, sıcaklık) bulunan aynı veya benzer türlerin hassas bir kontrolü ile karşılaştırılmasını sağlar (Uddhav ve Sivagurunathan, 2016).



Görsel 2.5. Cross streak yöntemi (Ashitha et al., 2019)

2.6.1.5. *Poisoned food*

Genellikle antifungal etki belirlenmesinde kullanılır. Yumuşak agar (molten agar) içine test edilecek bileşik ya da ekstre istenen konsantrasyonda eklenir ve uygun sıcaklıkta petri kabına dökülür. Bir gecelik ön inkübasyondan sonra ortaya disk şeklinde test edilecek filamentli fungus yerleştirilir ve tekrardan inkübasyona bırakılarak zon çapları ölçülür (Balouiri, Sadiki, Ibsouda, 2016). Kontrol petrisi (ekstre içermeyen) hazırlanır zon çapları ölçülerek hesaplamalar yapılır (Das, Tiwari, Shrivastava 2010).

2.6.1.6. *İnce tabaka kromatografisi (İTK)-Biyootografi*

İTK-biyootografi yönteminde ekstrenin etkili bileşiklerinin kromatogram üzerinde hedefe yönelik tespit edilmesine yarayan basit, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Üç temel yöntem üzerinden gerçekleştirilebilir (Balouiri, Sadiki, Ibsouda, 2016; Dewanjee vd., 2015).

Agar difüzyon (kontak biyootografi) yönteminde İTK plağı aşılınmış petriye yatırılıp bekletilir ve daha sonra çıkarılır. Petri inkübasyona bırakılır ve inhibisyon zonları incelenir.

Direkt biyootografide plak direkt aşılınmış agara batırılır ve üzerine aşılınmış besiyeri püskürtülerek inhibisyon zonları incelenir.

Agar overlay biyootografide ise plak tabandaki aşılınmamış besiyeri üzerine yerleştirilerek üzerine önceden aşılınan molten agarın (agar agar miktarı azaltılmış) dökülüp dondurulması ve inkübasyonu temeline dayanır (Balouiri, Sadiki, Ibsouda, 2016).

2.6.2. *Dilüsyon yöntemleri*

Dilüsyon testlerinde mikroorganizmaların ve antibiyotiğin bir dizi seri seyreltmelerle agar plağı ya da buyyonda gözle görülür bir üreme oluşturması test edilir (http-4). Dilüsyon yöntemleri antimikrobiyal ajanların konsantrasyonunu tahmin etme imkânı sunduğundan MİK (Minimum inhibitör konsantrasyon) değerini saptamak için kullanılmaktadır (http-5). Mikroorganizmanın üremesinin gözle görülür bir şekilde inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/L) MİK olarak tanımlanmaktadır (http-5). Antibiyotik duyarlılık testlerinde referans testlerdir. Kantitatif bir yöntemdir (http-5).

Dilüsyon yöntemi tüpte veya agarda olmak üzere yani besiyeri ortamına (sıvı veya katı) göre ikiye ayrılır tüpte olan sıvı besiyeri broth dilüsyon, katı besiyerinde gerçekleştirilen ise agar difüzyon olarak adlandırılır (Balouiri, Sadiki, Ibensouda, 2016).

2.6.2.1. Sıvı dilüsyon

Sıvı besiyerlerinde seyreltme esasına dayanan yöntemdir. Çalışılan hacimlere göre ikiye ayrılır. 2 mL'den daha büyük hacimde tüplerde gerçekleştirilen aynı temele dayanan yöntem makrodilüsyon olarak adlandırılır (Balouiri, Sadiki, Ibensouda, 2016). Makrodilüsyon yöntemi günümüzde yüksek maliyet ve sarf malzeme tüketimi yüzünden tercih edilmez.

Mikrodilüsyon 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasında 2 mL den daha küçük hacimlerde antimikrobiyal ajanın seyreltilmesi esasına dayanan yöntemdir (Balouiri, Sadiki, Ibensouda, 2016). Uygulaması kolay ve hızlı bir yöntemdir. Seri halde dilüe edilen numunenin belli sayıda hedef mikroorganizma ile etkileştirilmesidir.

Antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanmasında dünyada yaygın olarak kullanılan ve kabul gören iki ana standart bulunmaktadır. Bu standartlar öncesinde ülkemizin de kullandığımız CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) ve Avrupa Birliği'nde kullanılan EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)'dır (Söyletir, 2013).

EUCAST Avrupa ülkelerinin birlikte oluşturduğu duyarlılık testlerinin sonuçlarının uzlaşa temeline dayandığı, kaynaklara erişimin ücretsiz olduğu, klinik sınır değerlerin yanında epidemiyolojik sınır değerleri (ECOFF) de içeren bir standarttır. Ülkemizde Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'nin (TMC) internet sitesinde Türkçe olarak erişilebilmektedir.

CLSI standartlarına ise erişim ücretlidir. Türkiye'de 2014 ve 2015'in başlarında CLSI standartları kullanılırken, 2015 yılının sonlarına doğru laboratuvarlarda EUCAST standartlarını kullanmaya başlamıştır (Milletli Sezgin vd., 2019).

Her iki yönteminde birbirine kıyasla artı ve eksileri bulunmaktadır. Bu iki yöntemi başlıca farkı sınır değerleridir. CLSI'nın önerdiği sınır değerleri klinik sınır değerleri gösterir ve antibiyotiklerin rutin dozlarda kullanıldığında ulaştıkları kan konsantrasyonlarındaki hedef mikroorganizmaya karşı etkinliği hakkında yorum yapmamızı sağlar (Milletli Sezgin vd., 2019). EUCAST hem klinik sınır değeri hem de

ECOFF değerini gösterir. ECOFF değeri ise fenotipik olarak dirençli olmayan bakteri izolatının en yüksek MİK değeridir (<http-10>). EUCAST'ın Avrupa Birliği lkelerinde kullanılması ve erişimin ücretsiz olması önemli artırlarındandır.

2.7. Mikroorganizmalarda Biyofilm

Biyofilm varlığı ilk olarak 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek'un kendi dişinden aldığı plaklar içinde yaşayan mikroorganizmaları kendi mikroskobuyla inceleyip küçük hayvanımsı yapılar olarak tanımlamasıyla ortaya konmuştur (Körmezli vd., 2022). Leeuwenhoek gördüğü yapıyı akıl almaz sayıda hayvancık olarak tanımlamıştır. Aslında biyofilm varlığı çok eski yıllara dayanmamaktadır (Donlan ve Costerton, 2002). Fakat 1970'li yıllara kadar çalışmalar planktonik hücreler üzerinden yapılmıştır (Rabin vd., 2015). 1978 yılına kadar biyofilmler ile ilgili çok çalışma yapılmamıştır (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilm enfeksiyonlarının önemi biyofilm kavramı kullanılmadan önce 1970'lerin başında kronik olarak enfekte kistik fibröz hastalarından alınan balgam ve akciğer dokusundaki *P. aeruginosa* bakterilerinin kümelenmiş topluluklar halinde gözlenmesiyle anlaşılmıştır. 20. yüzyılın başlarında birçok bilim insanı artık bakterilerin sadece serbest yüzen formda olmadığını yüzeyle tutunarak yaşadığını bildirmiştir (Rabin vd., 2015).

1933 yılında Henrici biyofilmleri akan suda değil daha çok su altında yaşadıklarını gözlemlemiştir (Rmbling vd., 2014).

1935 yılında Zo Bell Allen deniz suyundan aldığı örnekleri mikroskop altında incelemiş ve su altındaki mikroorganizmaların genelde planktonik değil bir yzeeye yapışık halde büyüdüğünü gözlemlemiştir (Rmbling vd., 2014).

1976 yılında Marshall biyofilmi bakterilerin bir yzeeye bağlanması olarak tanımlaması ile biyofilm teorisi ortaya çıkmıştır (Beğendik, 2003).

1978 yılında John W. Costerton biyofilmin yzeeye tutunması için glikokaliks yapısına ihtiyaç duyduğunu ortaya koymuştur (Rmbling vd., 2014).

Biyofilm terimini ilk kez kullanıldığı iki tıbbi rapor da 1981 yılında yayınlanmıştır. Bu raporların birisi Costerton'a diğeri ise İsvete'ki Lund niversitesi diş

hekimlerine aittir. Costerton ve arkadaşları biyofilm oluşturan bakterilerin glikokaliks adı verilen hidrat, anyonik bir matriks ile kaplı olduğunu göstermişlerdir (Beğendik, 2003).

1985 yılında Costerton'un yaptığı kapsamlı çalışmalar sonucunda biyofilm büyümesi, planktonik bakterilere kıyasla antimikrobiyallere gösterdiği direnç ve biyofilm oluşturan bakterilerin fizyolojisi ve biyokimyası üzerine çalışmıştır.

1980'li yıllardan sonra biyofilm çalışmaları artmıştır. 1990'lı yıllarda konfokal lazer tarama mikroskopunun kullanılmasıyla biyofilm çalışmaları hız kazanmıştır. 1990 yılında ABD Montana Eyalet Üniversitesinde ilk biyofilm araştırma merkezi kurulmuştur (Römling vd., 2014).

Biyofilm farklı araştırmacılar tarafından birçok farklı şekilde tanımlanmıştır. En basit tabiriyle tanımlamak gerekirse mikroorganizmaların kendi ürettikleri ekso polisakkarit yapıları gömülü bir şekilde canlı veya cansız bir yüzeye ya da birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre popülasyonu olarak tanımlanabilir. (Willke Topçu, 2018; Temel ve Eraç, 2018). Biyofilm gelişmiş bir mikroorganizmadan daha çok, sanki bir mikroorganizma şehri gibi karmaşık ve farklılaşmış bir yapıdır (Watnick ve Kolter, 2000).

Planktonik yapıdaki bakteriler konakçının immun yanıtına karşı daha dayanıklı olabilmek, çevreden gelebilecek besin eksikliği, ısı, pH değişikliği, antimikrobiyal ajanlar ve dezenfektan maddelere karşı daha dirençli olabilmek ve bir topluluk oluşturarak çevreye daha kolay uyum sağlamak ve ihtiyaçlarını daha kolay bir şekilde karşılamak için biyofilm oluşturmaktadırlar (Körmezli vd., 2022).

Doğada bakteriler daha çok biyofilm formunda bulunur (Li ve Tian, 2012). Bu yapı yalnızca bakteriler tarafından değil funguslar, virüsler, protozoonlar ve algler tarafından da oluşturulabilmektedir (Willke Topçu, 2018). Biyofilm yapısı içerisinde birden fazla tür ve cinse ait mikroorganizmayı barındırabildiği gibi tek bir mikroorganizma türü tarafından da oluşabilir ve fakat doğal şartlarda tek bir türden oluşan biyofilm yapısı nadirdir (Willke Topçu, 2018; Öztürk, 2018). Bu yapı içerisinde mikroorganizmalar kendi aralarında koloniler oluşturarak sanki çok hücreli bir canlı gibi davranmaktadırlar (Çiftçi, 2005).

Biyofilm içerisinde mikroorganizmalar birbirleriyle çeşitli kimyasal mekanizmalar kullanarak iletişim kurabilmektedir (Kam Hepdeniz ve Seçkin, 2017).

Mikroorganizmalar çevrede üretilen sinyal moleküllerini algılayarak etraftaki diğer mikroorganizmaların yoğunluğunu hissedebilir ve kendi aralarında Quorum Sensing (QS) ya da çoğunluğu algılama olarak da adlandırılan bir iletişim ağını kullanırlar (Kam Hepdeniz ve Seçkin, 2017, Willke Topçu, 2018). QS mekanizması ile mikroorganizmalar ürettiği sinyallerin yoğunluğunu ölçebilmekte ve çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların yoğunluğunu algılayabilmektedir. Bu sayede koloni gibi davranarak bir hücreden diğerine sinyal molekülleri ile haberleşebilmektedirler. Bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizma kendiliğinden sinyal üreten ve otoindükleyici moleküllerden oluşur ve bu moleküller üretildikleri hücrenin mekanizmasında düzenleyici etki göstermektedir (Gülgör ve Korukoğlu, 2014). QS esasında hücre yoğunluğuna bağlıdır ve yoğunluk arttıkça daha iyi bir iletişim sağlanabilmektedir (Kam Hepdeniz ve Seçkin, 2017).

Biyofilmler içerisinde su kanallarıyla da çok hücreli yapıları taklit ederek hücre kolonilerinin besin ve oksijen ihtiyacını karşılar (Vasudevan, 2014). Bu su kanalları gelişmiş canlılardaki dolaşım sistemi gibi kolonilere besin ve oksijen taşınmasını sağlar. Kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik madde (EPS) matriks içerisinde yaşayan mikroorganizmalar bu su kanalları ile ihtiyaçlarını karşılar ve dış etkenlerden izole korunaklı bir sistem içinde yaşamlarını sağlarlar.

Biyofilm yapısında başta su olmak üzere polisakkarit, protein, nükleik asitler (DNA, RNA) ve metal iyonlarını barındırmaktadır (Vasudevan, 2014).

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma sebebi uygun olmayan ortam şartlarında hayatta kalmak ve ortam şartlarına kolay uyum sağlayarak direnç geliştirmektir (Marcinkiewicz vd., 2013). Burada olumsuz ortam koşullarından korunma biyofilmin yapısındaki EPS matriksin görevidir. EPS matriks iyon değiştirici gibi davranarak farklı ajanların biyofilm içerisine girişini engeller (Kam Hepdeniz ve Seçkin, 2017).

Biyofilm mikroorganizmaları antimikrobiyal ajanlardan, dezenfektanlardan, fagositozdan, UV radyasyon, konak hücrenin immün yanıtından korumanın yanı sıra metabolik çeşitlilik, etkinlik artışı ve yeni genetik özellikler de sağlamaktadır (Kam Hepdeniz ve Seçkin, 2017, Yang ve Liu, 2011).

Planktonik yapılara kıyasla biyofilm yapısını yok etmek oldukça zordur ve birçok inatçı enfeksiyonun da kaynağıdır (Lewis, 2001). Biyofilm yapısı planktonik bakterilere

kıyasla antibiyotiklere 1000 kata kadar daha dirençlidir (Singh vd., 2017). Biyofilm yapısını sağladığı tüm bu avantajlar dirençli enfeksiyonlara sebep olmaktadır ve bu da biyofilmin ciddi sağlık sorunları arasında yer almasına sebep olmaktadır.

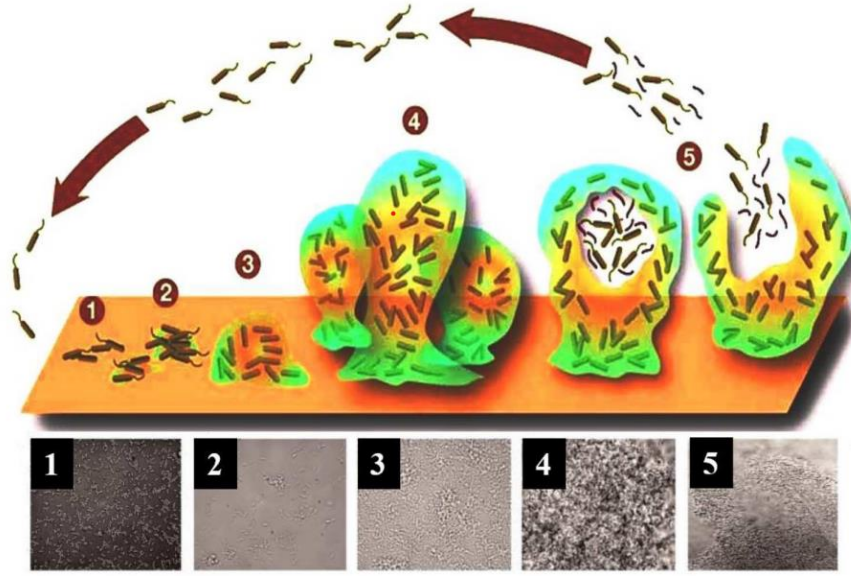
Esasında mikroorganizmalar tarafından canlılığın devamı için farklı ortamlarda hayatta kalma stratejisi olarak oluşturulan biyofilm yapısı insanlar için sağlık, medikal, endüstri, sanayi ve ekonomik alanda çeşitli sorunlara yol açmaktadır (Topçu, 2018). Biyofilmler derin yeraltı ve okyanuslar hariç tüm doğal ekosistemlerde, doğal ve endüstriyel su ortamlarında, dokularda, tıbbi biyomalzemelerde ve cihazlarda bulunur (Donlan ve Costerton, 2002, Yang ve Liu, 2011). Biyofilm oluşumu kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak kontrol altına alınabilmektedir fakat biyofilmler bu yöntemlere oldukça dirençlidir (Onbaşlı vd., 2017). Bu durum da kalıcı ve inatçı enfeksiyonların oluşmasına ve tedavinin zorlaşmasına neden olmaktadır.

Direnç oluşturan biyofilmleri eradikasyonu için birden fazla antibiyofilm yöntemini birlikte kullanmak gerekebilir ya da yüksek dozlarda antibakteriyel ajan kullanmak zorunda kalınabilmektedir. Tüm bunların öncesinde biyofilm oluşmaması için dezenfeksiyon, kazıma gibi fiziksel yöntemler kullanılmalıdır.

Biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi şu an oldukça zor ve karmaşık görünmektedir bu yüzden yeni antibiyofilm ajanlara ve stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.8. Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşumu için 3 temel bileşen varlığı şarttır bunlar; glikokaliks, mikroorganizma ve yüzeydir (Kartal, Ekinci ve Poyraz, 2021). Görsel 2.6'da gösterildiği gibi biyofilm oluşumu beş basamaktan oluşan dinamik bir süreçtir. Bu süreç mikroorganizmaların stres altında olmasıyla başlar fakat yüzeyin durumu da oldukça önemlidir. Yüzeyin düzgün ya da pürüzlü olması, türü (plastik, cam, metal vs.), yüzeyde organik ve inorganik maddelerin varlığı, ortamın özellikleri (pH, sıcaklık, oksijen, iyon vb.) biyofilm oluşumunu etkilemektedir.



Görsel 2.6. *Biyofilmin oluşum basamakları (Verderosa vd., 2019)*

2.8.1. Dönüşümlü tutunma

Biyofilm oluşumunun birinci basamağında stres altındaki planktonik mikroorganizmalar uygun bir yüzeye göç eder ve orada tutunur, böylece uygun şartlar altında biyofilm oluşumu başlar (Verderosa vd., 2019). Başlangıçta zayıf elektriksel Van der Waals bağlarıyla gerçekleşen bu tutunma daha sonra yerini kuvvetli geri dönüşümsüz bağlara bırakır (Körmezli vd., 2022). Zayıf bağlanmanın olduğu bu basamak dönüşümlü tutunma olarak adlandırılır.

Mikroorganizmanın bir yüzeye tutunmasından sonra Quorum sensing (QS, çoğunluğu algılama) adı verilen haberleşme sistemi aracılığıyla diğer mikroorganizmalar ile iletişime geçmesi sonucu birlikte biyofilm oluşturmak için bir farklılaşma gerçekleşir (Arar, 2015). Bu sistem ile yüzeye tutunan mikroorganizma yoğunluğu arttıkça sinyal yoğunluğu da artar ve mikroorganizmalar birbirleriyle haberleşir ve toplanmaları kolaylaşır (Arar, 2015).

2.8.2. Geri dönüşümsüz tutunma

Geri dönüşümsüz tutunma olarak adlandırılan ikinci basamakta mikroorganizmaların yüzeyle kurdukları zayıf bağlar yerini daha kuvvetli elektrostatik etkileşimlere bırakır, sonrasında EPS matriks adı verilen bir yapı oluşturarak kendilerini bu yapı içinde çevresel faktörlerden korumaya alırlar (Verderosa vd., 2019, Körmezli vd.,

2022). Elektrostatik etkileşimin dışında mikroorganizma flagella ve pilli gibi organlar ile de geri dönüşümsüz tutunmayı başlatabilir (Körmezli vd., 2022).

2.8.3. Koloni oluşumu

Mikroorganizmalar kendi ürettikleri bu EPS matriks yapısı içerisinde büyüyüp gelişerek aynı ve farklı türden çeşitli koloniler oluşturmaya başlamaktadırlar (Körmezli vd., 2022; Ünal ve Tayfur, 2017). Burada EPS matriks yapısı yeni planktonik bakterilerin biyofilme katılmasını da kolaylaştırmaktadır (Körmezli vd., 2022).

2.8.4. Olgun biyofilm oluşumu

Gelişip çoğalan mikrokoloniler kule benzeri büyük yapılar oluşturur (Arar, 2015). Bu mikrokoloniler QS sistemi ile iletişim kurar ve kendi aralarında sanki çok hücreli bir mikroorganizma gibi davranarak su kanalları benzeri yapılar ile besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılar ve metabolik artıkların uzaklaştırılmasını sağlarlar (Arar, 2015).

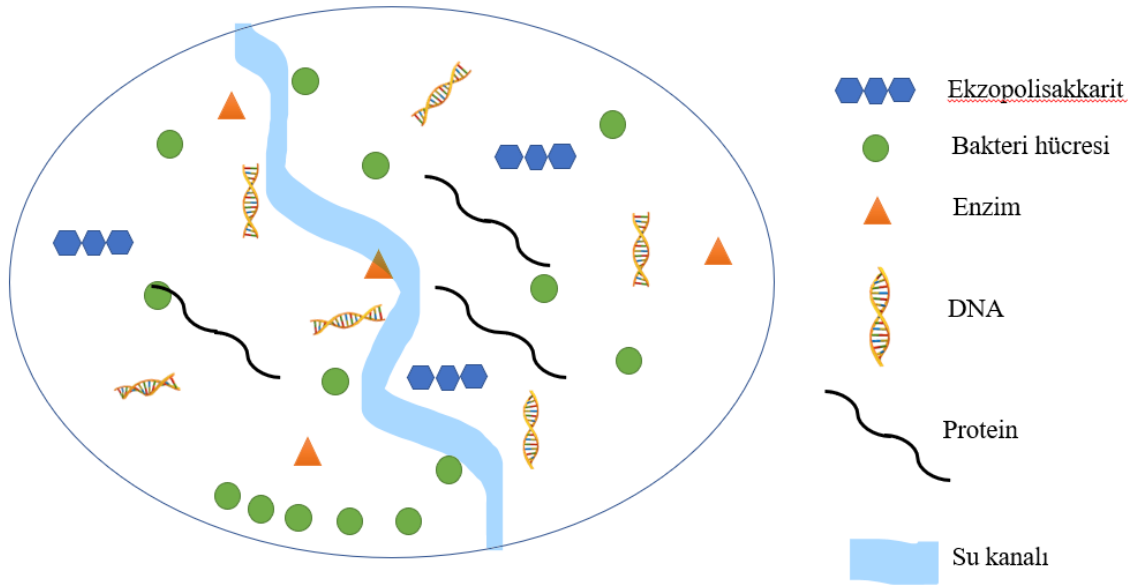
2.8.5. Kopma ve ayrılma

Daha sonra ise son aşamada çeşitli iç ve dış faktörler sebebiyle olgun biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar koparak ayrılır ve planktonik formuna geri dönerler. Bakteriler planktonik forma döndüklerinde ise yine ayrıldıkları biyofilm yapısının bütün direnç özelliklerini taşımaya devam etmektedir (Arar, 2015; Körmezli vd., 2022).

2.9. Biyofilmin yapısı

Biyofilmler kendi ürettikleri matriks yapı içerisinde yaşamlarını devam ettirebilen tek veya farklı türlerde mikroorganizmalardan oluşur, bu matriksin yapısı ve yoğunluğu biyofilm içerisindeki mikroorganizmanın çeşitliliği ile değişmektedir (Vasuden, 2014). Her biyofilmin yapısı aynı değildir mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının özelliğine, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm yapısının ana bileşeni %97 oranıyla sudur, bunun dışında eksopolisakkarit (EPS) (%1-2), protein ve glikoprotein (<%1-2), DNA (<%1), RNA (<%1), lipit, fosfolipit ve iyonlardan oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Çalı, 2021; Vasudevan, 2014). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve yine onları çevreleyen ekstrapolimerik matriks büyük oranda su içermektedir (Vasuden, 2014; Körmezli vd., 2022).

Biyofilmler içerisinde tek bir türden mikroorganizma bulundurabildiği gibi aynı zamanda farklı türlerden mikroorganizmaları da bulundurabilmektedir (Körmezli, 2022). Fakat tek bir tür içeren biyofilmler doğal şartlarda nadir görülmektedir (Öztürk, 2018). Farklı türden mikroorganizmalardan oluşan biyofilmler içerisinde aynı tür bakteriler küçük koloniler oluşturmaktadır (Körmezli, 2022).



Şekil 2.1. Biyofilm yapısının şematik gösterimi

Biyofilm yapısı mikroskop altında incelendiğinde matriks su kanallarıyla kaplı bir yapıya sahiptir, su kanalları biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların besin, oksijen ve su gibi temel ihtiyaçlarını karşılamaktadır (Arar, 2015; Rabin vd., 2015). Ayrıca bu su kanalları mikroorganizmaların bir bölgeden diğerine akışına da izin vermektedir ve mikrobiyal toplulukların hayatta kalması için doğal bir ortam sağlayan hidratlı durumu korumaktadır (Vasuden, 2014).

Biyofilmin bir diğer önemli bileşeni olan ekzopolisakkaritler mikrobiyal hücreler tarafından sentezlenir. Ekzopolisakkarit biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların gömülü olduğu mikrobiyal kökenli bir biyopolimerdir. Biyofilmi mikroplar kentine benzetirsek EPS de biyofilm hücrelerinin evini temsil etmektedir.

Hücre dışı DNA (e-DNA) ise biyofilm yapısını konakçı bağışıklık sisteminden ve antimikrobiyallerden korur (Kartal, Ekinci, Poyraz, 2021). Hücre dışı DNA 2002 yılında biyofilm matriks bileşeni olarak tanımlanmıştır (Römling vd., 2014).

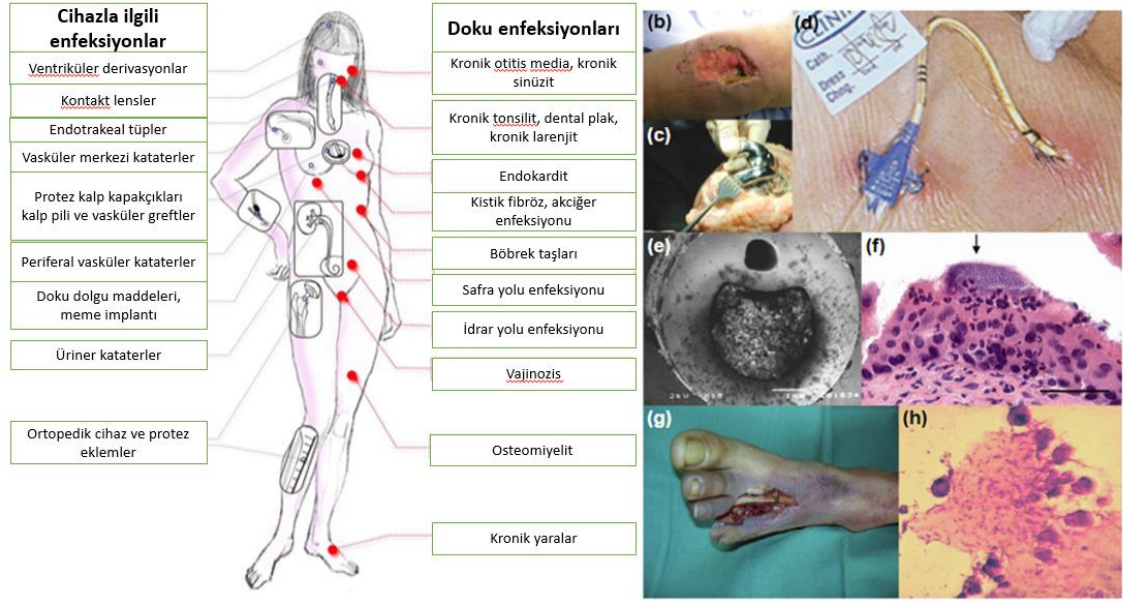
2.10. Biyofilm yapısında iletişim Quorum sensing (QS)

Biyofilm yapısındaki mikroorganizmalar rastgele bir birliktelik göstermezler kendi aralarında bir haberleşme ağı kullanmaktadırlar (Gün ve Ekinci, 2009). Quorum sensing (QS) veya hücreler arası iletişim, değişen ortam koşullarına uyumu (besin, oksijen ve su gibi), hücre yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesini ve planktonik formdan biyofilm forma geçişini sağlayan bir mekanizmadır. QS mekanizması ile çevredeki sinyal moleküllerinin yoğunluğu ile mikroorganizmaların miktarı ölçülebilmektedir ve bu şekilde mikroorganizmalar arasında iletişim sağlanmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009). Hücreden hücreye iletilen sinyaller ile biyofilm oluşumu kontrol edilmekte ve mikroorganizmaların gen kontrolü sağlanmaktadır (Ünal ve Tayfur, 2017). Bu iletişim ağı sayesinde mikroorganizmaları yaşamı planktonik forma kıyasla kolaylaşmaktadır. Mikroorganizmaların besine ulaşması kolaylaşmakta ve konak immun yanıtına direnç artmaktadır (Ünal ve Tayfur, 2017).

Yeni antibiyofilm stratejiler arasında QS yapısını bozan ajanlarda yer almaktadır (Ceyhan, 2008).

2.11. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar

Biyofilmler başlıca tıbbi implant kaynaklı olabilmekte dental yüzeylerde sıkça görülebilmektedir. Özellikle kistik fibrözis, kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonu, ven ilişkili pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonları, mukozal enfeksiyonlar, diyabetik ayak ülserleri, endokardit, kronik otitis media, kontakt lens ilişkili enfeksiyonlar örnek gösterilebilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar (Römling, 2014)

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde ve önlenmesinde ilk aşama biyofilm oluşumundan önce gerekli tedbirlerin alınmasıdır. Örneğin dönüşümlü tutunma aşamasında temizlik, dezenfeksiyonun sağlanması, geri dönüşümsüz tutunma aşamasında cansız yüzeyler için fırçalama kazıma gibi antibiyofilm yöntemleri kullanılabilir (Gün ve Ekinci, 2009). Gümüş iyonları ya da antibiyotiklerle kaplı implantlar tercih edilmektedir (Şimşek Yavuz, 2018).

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda cerrahi girişimin her zaman mümkün olmaması antibiyotiklerin yetersiz kalması yeni arayışlara kapı açmaktadır bu durumda QS inhibitörleri, biyofilm yapısını bozan ajanlar, bakteri adezyon inhibitörleri de antibiyofilm yöntemleri olarak kullanılmaktadır (Şimşek Yavuz, 2018).

Güncel olarak biyofilmlerin tedavisinde kullanılan özel bir ilaç bulunmamaktadır ve modern tıbbın artan antibiyotik direnci ile biyofilmlerin üstesinden gelememesi bilim insanlarını yeni arayışlar içerisine sokmaktadır (Onbaşı vd., 2017; Rabin vd., 2015).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitkisel Materyal

Salvia wiedemannii Boiss.'nin kurutulmuş toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bitkisel materyal Mayıs 2021'de Çifteler-Han yolu Eskişehir mevkiinden toplanmıştır. Toplandığı bölgenin lokalitesi 39°14'28" K 39°53'37" D 1110 m'dir. Bitkinin toplanması ve teşhisi Prof. Dr. Gökalep İşcan ve Prof. Dr. Yavuz Bülent Köse tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitki iki hafta boyunca Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Laboratuvarında havadar ortamda, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş drog Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda ESSE No:15817 numarasıyla kayda alınmıştır. Türün bölgedeki fotoğrafı ve herbaryum kaydı görsel 3.1'de sunulmuştur.



Görsel 3.1. Bitkinin toplandığı bölgedeki fotoğrafı ve herbaryum örneği

3.2. Kullanılan kimyasallar ve standart maddeler

Tüm çalışmalar boyunca kullanılan kimyasallar ve standart maddeler aşağıda Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. *Kullanılan kimyasallar ve standart maddeler*

Çözücü/Kimyasal madde/Besiyeri	Marka ve saflık
<i>n</i> -Hekzan	Aldrich (≥ 95)
Etil alkol	Merck
Etil asetat	Merck
TSB	Acumedia
Ampisilin-Na tuzu	Sigma-Aldrich
Ketokonazol	Supelco
Amfoterisin-B	Supelco
Kristal viyole	Carlo Erba
Resazurin	Sigma Life science
Muller Hinton Agar (MHA)	Sigma-Aldrich
Patates Dekstroz Agar (PDA)	Sigma-Aldrich
Mueller Hinton Broth (MHB)	Sigma-Aldrich
%0,85 NaCl çözeltisi	Sigma-Aldrich
Dimetil Sulfoksit (DMSO)	Merck

3.3. Kullanılan cihaz ve apareyler

Tüm çalışmalar boyunca kullanılan cihaz ve apareyler aşağıda tablo 3.2’de verilmiştir.

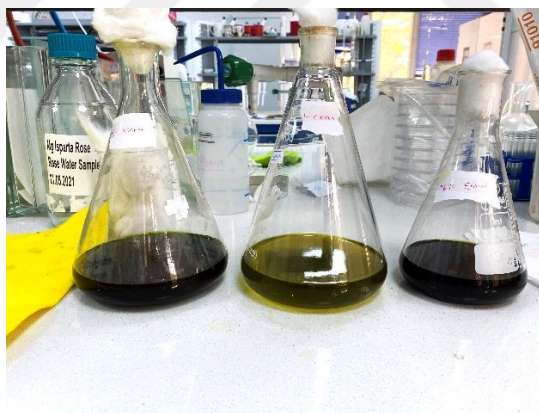
Tablo 3.2. *Kullanılan cihaz ve apareyler*

Kullanılan cihaz ve apareyler	Marka
Ultrasonik banyo	Bandelin SONOREX
Elisa okuyucu	SYNERGY HTX
Etüv	Heraeus T6
Clevenger apareyi	İldam
Vortex	Ika
Otoklav	HIRAYAMA HV-50L
Steril kabin	Nükleon

Rotavapor	Heidolph Instrument, Laborota 4010-Digital
McFarland Densitometre	Biosan
Gaz kromatografisi	Agilent 6890N GC
Gaz kromatografisi/ Kütle spektrometresi	Agilent 5975 GC/MSD
Multikanal pipetör	Eppendorf
Liyofilizatör	Labconco
Çalkalayıcı	Orbital

3.4. Ekstraksiyon

S. wiedemannii'nin toprak üstü kısımları ayrılıp çelik baharat öğütücüde (Fakir) toz edildikten sonra 30'ar gr tartılarak 3 farklı erlenmayerde 10 katı *n*-hekzan, etil asetat, %70'lik etanol ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Erlenmayerler ağızları kapalı bir şekilde 24 saat boyunca oda sıcaklığında 150 rpm de çalkalayıcıda ekstre edilmiştir. 24 saatin sonunda ekstreler pamuk yardımıyla süzülüp kalan drogların üzerine aynı miktarda çözücü ilave edilerek 150 rpm oda sıcaklığında tekrardan 24 saat bekletilmiştir. Bu 24 saat sonunda elde edilen ekstre ilk günkü süzüntünün üzerine ilave edilmiştir (Görsel 3.2).



Görsel 3.2. *S. wiedemannii*'nin etil asetat, *n*-hekzan, %70 etanol ekstreleri

Elde edilen süzüntülerden EtOAc (SEA) ve *n*-hekzan (SH) ekstreleri filtre kâğıdı (Whatman) yardımıyla ayrı ayrı rota balonlarına süzülerek rotavaporda yoğunlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstreler cam flakonlara alınarak +2-8 °C' de saklanmıştır.

%70 EtOH (SE) ekstresi ise önce rotavaporda kısmen yoğunlaştırıldıktan sonra geniş ağızlı kaplara aktararak dondurulmuş, liyofilizasyon (AÜ, BİBAM'da

gerçekleştirilmiştir) işlemi ile su uzaklaştırılmıştır. Liyofilizasyon işleminin ardından cam flakona alınarak +2-8 °C’de saklanmıştır.

%5’lik infüzyon (Sİ) ise 5 gr toz edilmiş drog üzerine 100 mL 80 °C su ilave edilerek 30 dk bekletilip süzölmüş, dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir.

3.5. Uçucu Yağ Eldesi

50 gr toz edilmiş drog yaklaşık 700-800 mL distile su ile Clevenger apareyine konularak 2 saat boyunca distile edilmiştir (Görsel 3.3). Elde edilen uçucu yağ (SUY) susuz sodyum sülfattan geçirilerek koyu renkli cam flakonda +2-8 °C’de saklanmıştır.



Görsel 3.3. Uçucu yağ eldesi ve Clevenger apareyi

3.6. Gaz kromatografisi (GK) - Kütle spektrometresi (KS)

Uçucu yağdan *n*-hekzan ile hazırlanan numunenin (40 mg/mL) GK ve GK/KS sistemi ile eş zamanlı olarak analizleri gerçekleştirilmiştir. GK sisteminde AİD (Alev İyonlaşma Dedektörü) ile tespit edilen bileşiklerin bağıl yüzdeleri belirlenmiştir. GK/KS sistemi ile bileşenlerin kütle spektrumları alınmış ve tanımlanmıştır. Agilent 5975 GK/KSD sistemi, HP-Innowax (60 m × 0.25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C’dir. 70 eV elektron enerjisi ile 35-450 m/z kütle ağırlığındaki maddelerin

analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C’de 10 dk, 4°C/dk artışla 220°C’ye, 220°C’de 10 dk, 1°C/dk artışla 240°C’ye yükselen toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” ve Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 3.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmıştır (Demirci vd., 2015, s. 40).

3.7. Gaz kromatografisi (GK)/Alev iyonlaşma dedektörü (AİD)

Uçucu yağın rölatif yüzdeleri GK/AİD ile belirlenmiştir. Bu amaçla Agilent 6890N GK sistemi, HP Innowax (60 m × 0.25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C’dir ve 300°C sıcaklıkta AİD tip detektör kullanılmıştır (Demirci vd., 2015, s. 40).

3.8. Antimikrobiyal Çalışmalar

3.8.1. Kullanılan besiyerleri

Mueller Hinton Agar (MHA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA), Mueller Hinton Broth (MHB), Triptik Soy Broth (TSB) hazır olarak temin edilmiş ve etiketlerinde yazan şekilde uygun miktarda distile su eklenerek hazırlanmıştır. Daha sonra otoklavda steril edilerek +2-8 °C ‘de muhafaza edilmiştir.

3.8.2. Kullanılan mikroorganizmalar ve inkübasyon

Escherichia coli NRRL B-3008, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* NRRL-B2544, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9633, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida utilis* NRRL Y-900, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258 suşları -85°C de stoktan çıkartılarak canlandırılmıştır. Bakteri suşlarını geliştirmek için MHA, *Candida* suşlarını geliştirmek için PDA besiyerleri kullanılmıştır.

3.8.3. Agar kuyu yöntemi

McFarland No:0.5’e göre yoğunluğu ayarlanmış *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* suşları MHA’ya, *C. albicans*, *C. tropicalis* suşları ise PDA’ya eküvönlu çubuk ile inoküle edilmiştir. Daha sonra petrilere (18 cm) biri ortada olmak üzere 6 mm çapında yedi eş kuyucuk açılmış ve kuyucuklara sırasıyla; 25 µL 10 mg/mL SUY, 50 µL 64 mg/mL SH, 50 mL 64 mg/mL SEA, 50 µL 28 mg/mL SE, 50 µL 64 mg/mL Sİ, saf DMSO

(Dimetil sülfoksit), 50 µL 160 µg/mL Kloramfenikol (Etanolde çözülmüş) pipetlenmiştir. Fungusları içeren petrilere de aynı kuyucuklar açılmış yukarıda belirtilen şekilde numuneler yüklenmiştir. Ancak standart olarak 50 µL 160 µg/mL ketokonazol (DMSO'da çözülmüş) kullanılmıştır. 37 °C 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklar etrafındaki inhibisyon zonları incelenmiştir.

3.8.4. Mikrodilüsyon yöntemi

Tüm eksterelerin ve uçucu yağın tüm bakteri ve funguslar üzerinde MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu) ve MBK (Minimum bakterisidal konsantrasyon) değeri CLSI (NCCLS) M7-A7 ve M27-A2 metodu kullanılarak saptanmıştır. Yöntem 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8.4.1. Antikandidal etki

Uçucu yağ ve ekstreler seri şekilde DMSO içerisinde çözülmüş, testler kısmen modifiye edilmiş “Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün yayımladığı CLSI (NCCLS) M27-A2 protokollü uyarınca yapılmıştır. M27-A2 metodu patojen mayalara karşı test örneklerinin antifungal etkilerini ortaya koymaktadır ve standart antifungaller ile karşılaştırmalı test edilmiştir.

Gecelik *Candida* kültürlerinden 3-4 koloni seçilerek, konsantrasyonu (10^6 KOB/ml) steril salin solüsyonu (8.5 g/L NaCl; 0.85% salin) içinde McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre bulanıklık ölçme cihazında ayarlanmıştır. Protokole uygun biçimde seyreltilen mikroorganizmalar RPMI besiyeri içinde seyreltilmiş uçucu yağ ve ekstreler ile 96 kuyucuklu plakada etkileştirilmiştir. Mikroorganizma eklenen sütun pozitif gelişim kontrolü, sadece RPMI bulunan son sütun sterilite kontrolü olarak kullanılmıştır. 35-37°C de 24 saat inkübasyon sonunda üremenin olmadığı ilk kuyucuk MİK olarak belirlenmiştir. Ketokonazol ve Amfoterisin-B standart antifungal ajan olarak kullanılmıştır. Okumada kolaylık sağlaması için resazurin çözeltisi ilave edilmiş, 3 saat inkübasyon sonunda renk değişimleri incelenerek, bulanıklığa göre elde edilen sonuçlar teyit edilmiş, gerekirse düzeltilmiştir.

3.8.4.2. Antibakteriyel etki

Uçucu yağ ve ekstraktların etkileri kısmen modifiye edilmiş “Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü”nün yayımladığı CLSI (NCCLS) M7-A7 protokolü uyarınca taranmıştır. M7-A7 protokolü aerobik olarak gelişen bakterilerin duyarlılıklarını ölçmede kullanılır. Test protokolünde kullanılan besi ortamı burada MHA ve MHB’dir. Kloramfenikol ve ampisilin standart antibakteriyel olarak seçilmiştir. MİK değerinin değerlendirilmesi antikandidal yöntemindeki gibi yapılmıştır. MİK değeri ve biyofilm oluşturma kabiliyeti göz önünde tutularak, antibiyofilm çalışmalarında kullanılacak mikroorganizmaya karar verilmiştir.

3.8.5. Antibiyofilm Aktivite

Staphylococcus aureus ATCC 6538 ile yapılan ön çalışmalar bu suşun biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. Antibiyofilm çalışmaların tamamı bu suş ve ürettiği film üzerinde gerçekleştirilmiştir. Antibiyofilm çalışması, biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve oluşmuş biyofilmin yok edilmesi (eradikasyonu) olmak üzere 2 farklı biçimde yapılmıştır. Her iki deney protokolü kısmen modifiye edilerek Sandberg vd. (2008) ile Tutar vd. (2016) tarafından uygulanan biçimde yapılmıştır.

3.8.5.1. Minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu

Antibakteriyel etki deneyine benzer protokolle gerçekleştirilen deneyde 2 adet 96 kuyucuklu düz tabanlı petri kabı kullanılmıştır. Deneyde MHB yerine biyofilm üretimini teşvik için TSB kullanılmıştır.

Bakteri süspansiyonu steril SF (%0.85 NaCl, steril salin) içinde Mc Farland No: 0.5’e göre ayarlandıktan sonra, önceki protokolden farklı olarak çift kat TSB’ye aktarılmıştır. $3,7 \times 10^6$ KOB/mL olarak elde edilen süspansiyondan, 2 ayrı petride aynı şablonda çift katlı TSB içinde dilüe edilmiş numunelerin ve pozitif kontrol sütunu üzerine 100’er µL pipetlenmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, pozitif ve negatif kontrollerle birlikte bulanıklık kontrol edilmiş, ayrıca resazurin ile boyanarak canlılık kontrolü ve inhibisyon dozları belirlenmiştir (MİK). Diğer eş biçimde hazırlanmış petri kabında inkübasyon sonunda planktonik kısım uzaklaştırılmış ve steril SF ile oluşmuş biyofilmlerin uzaklaşmaması için dikkatlice x3 kez yıkanmıştır. 30 dk kurumaya bırakılan plak daha sonra biyofilm kontrolü için kristal viyole ile boyanmıştır. Bu amaçla

kuyucuklara 200 µL kristal viyole pipetlenmiş, 30 dk beklenmiştir. Bu süre sonunda boya uzaklaştırılmış, steril SF ile yıkanmış dikkatle x3 defa yıkanmış ve kurutulmuştur. Kuyucuklara 200 µL etanol ilave edilerek boyanın tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Plak 600nm de multiplaka UV-VIS okuyucuda okunmuştur.

3.8.5.2. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu

Bu yöntemde önceden oluşturulmuş biyofilm tabakasının eradikasyonu araştırılmıştır (Tutar vd., 2016). 96 kuyucuklu steril ve düz tabanlı (flat bottom) mikrotitrasyon plakaları kullanılmıştır. Triptik Soy Agar (TSA)'da gecelik kültüre alınan *S. aureus* ATCC 6538 suşu steril salin çözeltisi içinde Mc Farland No: 0.5'e göre ayarlandıktan sonra ($1,5 \times 10^8$ KOB/mL), 19,5 mL çift kuvvet TSB içeren deney tüpüne 0,5 mL aktarılaraq (1/40 seyreltme), son konsantrasyonu $3,7 \times 10^6$ KOB/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu tüpten iki farklı 96 kuyucuklu mikrolakaya her bir kuyucuğa 200 µL olacak şekilde aktarılmıştır. Birer sütun sterilite kontrolü olarak bırakılmıştır. Plakalar 37°C 18 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda planktonik kısımlar dikkatlice uzaklaştırılmış, kuyucuk yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakası rahatsız edilmeden %0.85 steril NaCl solüsyonu ile x3 defa yıkanmıştır. Planktonik hücrelerin dikkatlice yıkanarak uzaklaştırıldığı plağa 100'er µL tek kuvvet steril TSB pipetlenmiştir. Üçüncü bir steril mikrolakada 3'er tekrarlı olacak şekilde yine TSB içerisinde dilüe edilen örnekler, DMSO ve standart ajan Ampisilin çözeltisi, yine bir multikanal pipet yardımıyla 100'er µL tek kuvvet steril TSB pipetlenmiş plakaya aktarılmıştır (Şekil 3.1).

	SUY	SUY	SUY	SE	SE	SE	AMP	AMP	AMP	DMSO	(+)	(-)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16 mg			8 mg			320 µg			%50		
B	8			4			160					
C	4			2			80					
D	2			1			40					
E	1			0,5			20					
F	0,5			0,25			10					
G	0,25			0,125			5					
H	0,125			0,06			2,5					

Şekil 3.1. Minimum biyofilm inhibisyon petrilerinin planı

Plakalar 37°C 18 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bir sütun negatif kontrol, bir sütun pozitif kontrol olarak ayrılmıştır. Bu test ile önceden oluşturulmuş biyofilm tabakası üzerinde, test edilen örneklerin farklı konsantrasyonundaki etkileri incelenmiştir. Bunun için çift plaka çalışılmış olup, bir plaka kristal viyole için diğeri resazurin ile boyama için ayrılmıştır. Kristal viyole (KV) ile kuyucuk iç yüzeyindeki biyofilmin boyanarak varlığının tespiti, resazurin ile metabolik aktivitenin varlığı belirlenmiştir. Biyofilm ortadan kalkmamış olsa bile, içindeki mikroorganizmaların canlılığının durumu resazurin pipetlenmesi ile ortaya konmuştur. Bu amaçla plaklar yukarıda anlatıldığı gibi steril NaCl solüsyonu ile yıkanmış, ardından 190 µl kristal viyole çözeltisi pipetlenmiştir. 37°C’de 30 dk beklendikten sonra, KV boyası x3 defa yine steril NaCl solüsyonu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Kurumaya bırakılan plaklara, 200 µl EtOH ilave edilerek KV çözülmüş ve 500 nm de absorbansı okunmuştur. Diğer deney plağı da aynı şekilde

yıkandıktan sonra, 180 µL steril TSB ve 20 µl resazurin solüsyonu pipetlenmiştir. 2 saat, 37°C’de inkübe edilmiştir. 600 nm de absorbansı okunmuştur.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Uçucu Yağ Bileşimi

26 Mayıs 2021’de Çifteler-Han yolu Eskişehir mevkiinden (39°14'28" K 39°53'37" D 1110 m) toplanan ve teşhis edilen *S. wiedemannii* Boiss. kurutulmuş ve kaba toz edilmiş toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağı elde edilmiştir. 50 gr kuru drogdan 0,4 mL uçucu yağ elde edilmiştir. Farklı polaritedeki çözücüler ile elde edilen ekstreler ve verimleri Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1. *S. wiedemannii* ekstrelerinin ve uçucu yağının yüzde verimi

<i>S. wiedemannii</i> Boiss. (Lamiaceae)	Yüzde verim
Hexan ekstesi (SH)	% 3,33
Etil asetat ekstresi (EtOAc) (SEA)	% 6,66
%70 Etanol Ekstresi (EtOH) (SE)	% 21,60
Su ekstresi (Sİ)	% 20
Uçucu yağ (SUY)	% 0,8

S. wiedemannii Boiss.’nin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GK/KS ve GK/AİD sistemleri kullanılarak bileşimi ortaya konmuştur (Tablo 4.2). Yağın %96’sı aydınlatılmış, 29 bileşen tespit edilmiş ve ana bileşenler sırasıyla α -pinen (%30.9), 1,8-sineol (%17.7) ve β -pinen (%17.2) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2. *S. wiedemannii* uçucu yağının bileşimi

RRI	Bileşen	%
1032	α -Pinen	30.9
1076	Kamfen	1.6
1118	β -Pinen	17.2
1132	Sabinen	2.4
1174	Mirsen	1.5
1188	α -Terpinen	1.4
1213	1,8-Sineol	17.7
1255	γ -Terpinen	6.7
1280	<i>p</i> -Simen	3.8
1452	1-Okten-3-ol	0.1
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.5
1532	Kamfor	2.0

1535	β -Burbonen	0.2
1553	Linalol	0.4
1586	Pinokarvon	Tr
1611	Terpinen-4-ol	0.5
1682	δ -Terpinol	0.1
1683	<i>trans</i> -Verbenol	0.2
1704	γ -Murolen	0.5
1706	α -Terpinol	0.1
1716	Borneol	4.0
1726	Germakren D	1.7
1807	α -Kadinen	0.1
1854	Germakren B	0.6
2080	1,10-diepi-Kübenol	0.3
2131	Hekzahidrofarneol aseton	Tr
2187	T-Kadinol	1.3
2257	β -Ödesmol	0.2
2278	Torilenol	0.1
Toplam		96.1

RRI: Relative retention indices (Bağıl alıkonma indeksi), Tr- Trace (İz miktarda)

Demirci ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada Eskişehir-Çatacık bölgesinden toplanan *S. wiedemannii*'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın bileşimi GK/KS'de incelenmiş α -pinenin bağıl yüzdesi %32,8, β -pinenin bağıl yüzdesi ise 17,7 bulunmuştur (Demirci vd., 2002).

Kaya ve arkadaşlarının 2009 yılında gerçekleştirdiği çalışmada ise bitkinin uçucu yağı GK-AID analiz edilmiş ve totalde uçucu yağın %96'sını oluşturan 35 bileşik tanımlanmış ve 1,8-sineol (%38,4), β -pinen (%24,5) ve α -pinen (%13,6) ana bileşikler olarak rapor edilmiştir (Kaya, Başer ve Demirci, 2009).

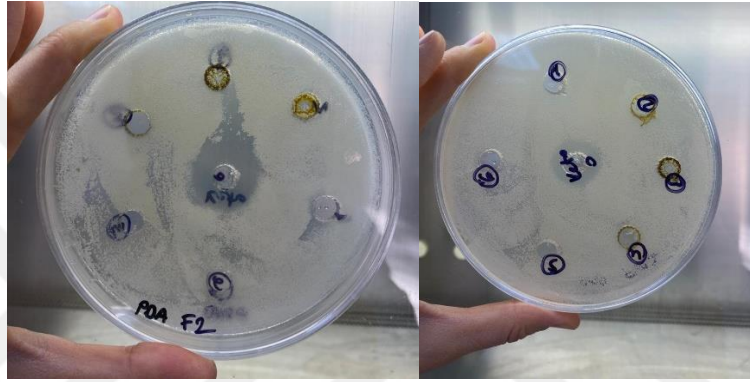
Kunduhoglu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada totalde uçucu yağın %89,9'unu oluşturan 13 bileşik tanımlanmış ve ana bileşenler sırasıyla α -pinen (%36,2), 1,8-sineol (%14,2), β -pinen (%13,3) olarak tespit edilmiştir (Kunduhoglu vd., 2011).

Çalışmamız doğrultusunda elde edilen sonuçlar literatürde *S. wiedemannii* uçucu yağı ile ilgili yapılan diğer çalışmaların sonucu ile paralel bulunmuştur.

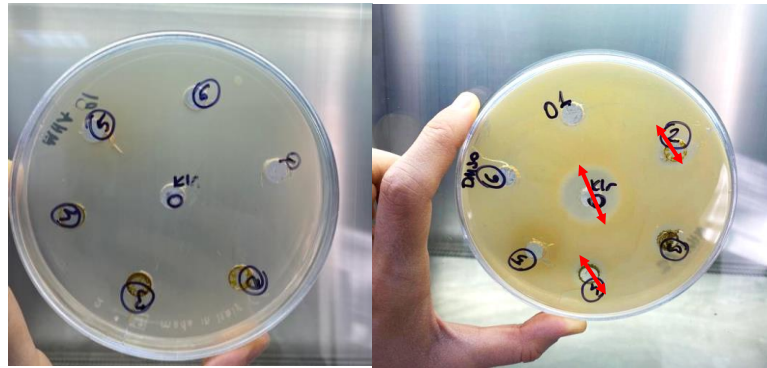
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

4.2.1. Agar kuyu yönteminin sonuçları

Agar kuyu yönteminde çalışılan Gram (-) ve Gram (+) iki bakteri (*E. coli* ve *S. aureus*) (Görsel 4.2) ve iki *Candida* (*C. albicans* ve *C. tropicalis*) (Görsel 4.1) suşu 160 µg/ml konsantrasyonda kloramfenikol ve ketokonazol ile karşılaştırılmıştır. *S. aureus* üzerinde özellikle *n*-hekzan ve %70 etanol ekstresinde inhibisyon zonu tespit edilmiştir. *E. coli*, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'in bulunduğu petride belirgin bir zon gözlemlenmemiştir.



Görsel 4.1. *C. albicans* ve *C. tropicalis* agar difüzyon sonucu: 1. kuyucuk uçucu yağ, 2. hekzan ekstresi, 3. etilasetat, 4. %70 etanol, 5. %5 infüzyon, 6. DMSO



Görsel 4.2. *E. coli* ve *S. aureus* petrilerinin agar difüzyon sonucu; 1. kuyucuk uçucu yağ, 2. hekzan ekstresi, 3. etilasetat, 4. %70 etanol, 5. %5 infüzyon, 6. DMSO

4.2.2. Mikrodilüsyon yönteminin sonuçları

S. wiedemannii'nin uçucu yağ ve ekstralarının seçilmiş bakteri ve *Candidalara* karşı olan inhibitör etkileri sıvı dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (Tablo 4.3). Yapılan mikro-sıvı dilüsyon testleri (Görsel 4.3) ile denenen tüm örneklerin standart ajanlara oranla oldukça zayıf etkiler gösterdiği, 8000 ile 125 µg/ml dozlarda etkili olduğu görülmüştür. %70 etanol ekstresinin, *Staphylococcus aureus* üzerinde 125 µg/mL dozda (MİK) en yüksek inhibitör etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (Görsel 4.3). Plaktaki MİK değerinin üzerindeki her kuyucuktan alınan örnekler MHA ortamına ekilerek gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda %70 EtOH ekstresi ve uçucu yağ için minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) sırasıyla 8000 ve 2000 µg/mL olarak bulunmuştur. Bazı mikroorganizmalara karşı olan etkinin denenen en yüksek doz olan 8000 µg/ml'den de büyük olduğu görülmüştür. Özellikle bir su ekstresi olan infüzyonun en zayıf etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca Gram negatif bakterilerin daha dirençli oldukları görülmektedir. Antikandidal çalışma sonucunda ise tüm örneklerin standartlara göre zayıf etkiye sahip olduğu görülse de *Candida* suşlarına karşı bakterilerden daha aktif oldukları belirlenmiştir. 31,25-4000 µg/mL dozlarda inhibitör etkiler görülmüştür. 31,25 µg/mL MİK değeri Etil asetat ekstresinin ile *C. utilis*'i inhibe ettiği gözlenmiştir.



Görsel 4.3. Antibakteriyel etki testi plaklarından örnekler

Tablo 4.3. Ekstrelerin ve uçucu yağın *Candida* ve bakterilere karşı MİK ($\mu\text{g/mL}$) değerleri

<i>Candida</i> türleri	SH	SEA	SE	Sİ	SUY	St1	St2
<i>C. utilis</i> NRRL Y-900	250	31,25	500	125	2000	1	0,5
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	500	4000	4000	1000	1000	1	0,5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1000	2000	1000	500	1000	2	0,25
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	1000	2000	2000	500	1000	2	0,125
<i>C. krusei</i> ATCC 6528	250	1000	1000	500	500	1	1
Bakteriler						St3	St4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	250	250	125	8000	1000	2	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	500	2000	>8000	8000	16	>64
<i>S. marcescens</i> NRRL B-2544	1000	1000	4000	>8000	4000	4	>64
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 9633	1000	1000	2000	>8000	4000	2	>16

SH: SEA: SE: Sİ: SUY: St1: Amfoterisin B, St2: Ketokonazol, St3: Kloramfenikol, St4: Ampisilin

Bu bitki ile yapılmış tek antimikrobiyal aktivite çalışması olan Kunduhoğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada uçucu yağın antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiş ve *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı MİK değeri 12,5 $\mu\text{L/mL}$, *E. faecium* NRRL 2354 suşuna karşı MİK değeri 12,5 $\mu\text{L/mL}$, *C. albicans* NRRL 12983 suşuna karşı MİK değeri 50 $\mu\text{L/mL}$, *C. glabrata* NRRL 1431 25 $\mu\text{L/mL}$, *S. cerevisiae* NRRL 12796 12,5 $\mu\text{L/mL}$ bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ile kısmen benzerlik görülmüştür.

Uçucu yağ hedef patojenlerimize karşı orta şiddette inhibitör etkiler göstermiştir. Çalışmamızda uçucu yağın ana bileşenleri olarak tespit edilen α -pinen, β -pinen ve 1,8-sineol'ün güncel literatürdeki bazı biyolojik etki çalışmaları Tablo 4.4'de verilmiştir. Her üç ana bileşenin de yapılan çeşitli çalışmalarda antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 4.4. Uçucu yağın ana bileşenlerinin biyolojik etkileri

Ana Bileşen	Etki	Kaynak
α - pinen	Antibakteriyel, antikandida	da Silva vd., 2012, İşcan, G., 2017
	Antibiyofilm	de Macedo vd., 2018
	Fitotoksik	Cowhan vd., 2013
	Antidepresan benzeri etki	Guzman vd., 2015
	Sitotoksik	Machado vd., 2022
	Gastroprotektif	Salehi vd., 2019

	Antikonvulsan	Felipe vd., 2019
β -pinen	Antibakteriyel, antikandida	Liao vd., 2016
	Antitumor	Wang vd., 2019
	Gastroprotektif	Juda vd., 2011
	Nöroprotektif	Felipe vd., 2019
	Antiproliferatif (insan eritrolösemik K562)	Lampronti vd., 2006
1,8 sineol	Antienflamatuar, antioksidan	Juergens, 2014
	Antiviral	Astani, Reichling ve Schnitzler, 2010
	Antikanser	Zari vd., 2021
	Antifungal	Pinto vd., 2009
	Antibakteriyel, antibiyofilm	Hu vd., 2018
	Bronkodilatör	Juergens vd., 2020

%70 etanol ekstresi planktonik formdaki hedef patojenlerimize karşı bu çalışmadaki en etkili bileşen olarak bulunmuştur. Bitkinin etanol ekstresi bileşimindeki fenolik bileşikler; kinik asit, fumarik asit, prokateşik asit, klorojenik asit, prokateşik aldehit, kafeik asit, salisilik asit, sinarosid, izokersetin, hesperidin, rosmarinik asit, kosmosin, astragalin, kersetin, naringenin, luteolin, apigenin, akasetin olarak bulunmuştur (Yılmaz vd., 2023). Metanol ekstresinde ise suginal, salvigenin, β -sitosterol, α - amirin, 3- asetil lupeol olarak bulunmuştur (Yılmaz vd., 2023). Etanol ekstresinin başlıca bileşenleri olan rosmarinik asit, sinarosid, izokersetinin güncel literatürdeki bazı etki çalışmaları tablo 4.5’de verilmiştir. Literatür taraması sonucunda bu üç bileşenin de antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.5. Önceki çalışmalara göre etanol ekstresinin ana bileşenleri

Ana bileşen	Etki	Kaynak
Rosmarinik asit	Antibakteriyel ve Antifungal	Petersen ve Simmonds, 2003
	Antienflamatuar	Amoah vd., 2016
	Antitumor	Amoah vd., 2016
	Nöroprotektif	Amoah vd., 2016
Sinarosid	Antibakteriyel ve Antifungal	Bouyahya vd., 2023
	Antikanser	Bouyahya vd., 2023
	Antidiabetik	Bouyahya vd., 2023
İzokersetin	Antiviral	Kim, Narayanan, Chang, 2010
	Antidiabetik	Valentová vd., 2014
	Antikanser	Valentová vd., 2014

4.2.3. Minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Uçucu yağ ve %70 etanol ekstresi 3 tekrarlı olarak *S. aureus* biyofilmi üzerindeki inhibisyon ve eradikasyon etkileri çalışılmıştır standart ajan olarak ampisilin seçilmiştir. Biyofilm üretimini teşvik etmek için kullanılan iki kat TSB, biyofilmin canlılık kontrolü için kullanılan resazurin solüsyonunun rengini kırmızı gözlemlenmesine sebep olmuştur. Normalde canlılığın olmadığı ortamda mavi, üreme olduğunda pembe-mor olan besi ortamı rengi farklılık göstermiştir (Görsel 4.4, 2. petri).

İnkübasyon sonunda KV ve resazurin ile yapılan boyama sonucunda uçucu yağın (1, 2 ve 3. sütunlar) minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu (MBİK) 500 µg/ml, %70 etanol ekstresinin (4, 5 ve 6. sütunlar) MBİK ise 125 µg/ml olarak belirlenmiştir (Görsel 4.4). Etanol ekstresinin *S. aureus*'a karşı önceden belirlenen MİK değeri 125 µg/ml olup, aynı dozda biyofilm oluşumu da inhibe edilmiştir. Ancak uçucu yağ CLSI protokolüne göre MİK değeri 1000 µg/ml olarak belirlense de biyofilm oluşumu inhibisyonu 500 µg/ml dozda gerçekleşmiştir. Standart antimikrobiyal olarak kullanılan ampisilin MBİK 2,5 µg/ml'den daha küçük bir doz olduğu bulunmuş net değeri belirlenememiştir. Antibiyofilm çalışma sonucunda ise ekstre ve uçucu yağın ampisiline göre biyofilm inhibisyonunda oldukça zayıf etkiye sahip olduğu görülmüştür.

İki farklı mikroparka kullanılarak hem kristal viyole hem de resazurin boyama gerçekleştirilmiştir. KV ve resazurin deney sonuçlarını aynı bulunması üremenin ve metabolik aktivite inhibisyonunun aynı dozlarda gerçekleştiğini göstermektedir.



Görsel 4.4. 1. petri MBİK-Kristal viyole, 2. petri MBİK-Resazurin

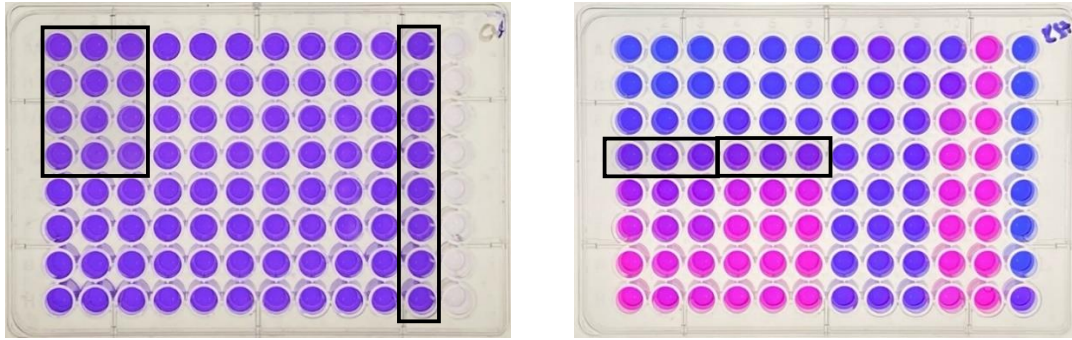
4.2.4. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon sonuçları

S. wiedemannii'nin uçucu yağ ve etanol ekstresi mikroparka üzerinde 3 tekrarlı olarak çalışılmış, standart antimikrobiyal ajan olarak ampicilin-Na seçilmiştir. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) var olan biyofilmin ortamdaki tamamen uzaklaştırıldığı konsantrasyondur. Bir 96 kuyucuklu plak oluşan biyofilmin sağlanmasını yapmak için kontrol olarak kullanılmış ve KV ile boyanmıştır.

Bir diğer plakta oluşmuş biyofilm üzerine tüm örneklerin besi ortamındaki dilüsyonları aseptik şartlarda pipetlenerek gecelik inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda sıvı kısım uzaklaştırılarak dikkatle x3 defa steril SF ile yıkanmış ve biyofilmin varlığı KV ile boyanarak kontrol edilmiştir. Yapılan boyama sonunda tüm plak KV ile boyanmış görünse de (Görsel 4.5, 1.petri) multiplaka okuyucu ile absorbanları ölçüldüğünde oluşmuş biyofilmde ilk dört dilüsyonda (1.6-0.2 mg/ml) eşit şekilde uçucu yağın ortalama %20 oranında biyofilm eradikasyonu gösterdiği belirlenmiştir (ABS UY: 1,4612; ABS (+) 1,811; ABS (-): 0.09). Etanol ekstresinde ve standart ajan ampicilinde oluşmuş biyofilme karşı herhangi bir etki görülmemiştir.

Biyofilm içinde canlı hücre varlığının kontrolü için resazurin ile boyama yapılmış metabolik aktivite durumu multiplaka okuyucu ile incelenmiştir (Tablo 4.6). *S. aureus*'a karşı uçucu yağın 16.000-2000 µg/mL aralığında, etanol ekstresi için ise 8000-1000

$\mu\text{g/mL}$ aralığında biyofilm içine maddelerin penetre olarak mikroorganizmaların yaşayan formlarını %88-%50 aralığında değişen oranlarda inhibe ettiği belirlenmiştir (Görsel 4.5).



Görsel 4.5. 1. petri MBEK-KV, 2. Petri MBEK-Resazurin

Tablo 4.6. Örneklerin absorbans tablosu (resazurin, 600 nm)

Doz ($\mu\text{g/mL}$)	UY	ABS	E	ABS	AMP	Absorbans
MİK	1000	1,75 $\pm$ 0,010	125	0,574 $\pm$ 0,06	32	1,431 $\pm$ 0,07
MBK	2000	1,376 $\pm$ 0,05	8000	1,772 $\pm$ 0,066	16	1,478 $\pm$ 0,03
MBİK	500	1,028 $\pm$ 0,04	125	0,574 $\pm$ 0,06	8	1,552 $\pm$ 0,03
MBEK*	2000	1,376 $\pm$ 0,05	1000	1,294 $\pm$ 0,04	4	1,565 $\pm$ 0,04
1/2 MİK	500	1,028 $\pm$ 0,04	62,5	0,708 $\pm$ 0,02	2	1,615 $\pm$ 0,02
1/4 MİK	250	0,822 $\pm$ 0,09	31,25	-	1	1,638 $\pm$ 0,03
1/8 MİK	125	0,7 $\pm$ 0,03	15,62	-	0,5	1,641 $\pm$ 0,02
1/16 MİK	-	-	-	-	0,25	1,629 $\pm$ 0,04

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon, MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon, MBİK: Minimum biyofilm inhibisyon konsantrasyonu, MBEK: Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu; RSZ: Resazurin; E: Etanol ekstresi, UY: Uçucu yağ, AMP: Ampisilin, Metabolik aktivasyonda min %50 inhibisyon; -: yapılamadı

MBEK çalışmasında kullanılan resazurin mikropalakası 600 nm’de multiplaka okuyucuda okunarak absorbans değerleri kaydedilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak her dozadaki metabolik aktivasyon % inhibisyonu belirlenmiştir (Abd Algaffar vd., 2021). Tablo 4.7’de uçucu yağ ve %70 etanol ekstresinin % metabolik aktivite inhibisyonu değerleri verilmiştir. Şekil 4.1’ de % inhibisyon grafiği sunulmuştur. Aynı zamanda standart ajan olan ampisilinin % inhibisyon grafiği de şekil 4.2’de sunulmuştur.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{[OD_{600NK} - OD_{600T}]}{[OD_{600NK} - OD_{600GK}]} \times 100$$

OD₆₀₀NK- Negatif kontrol absorbansı

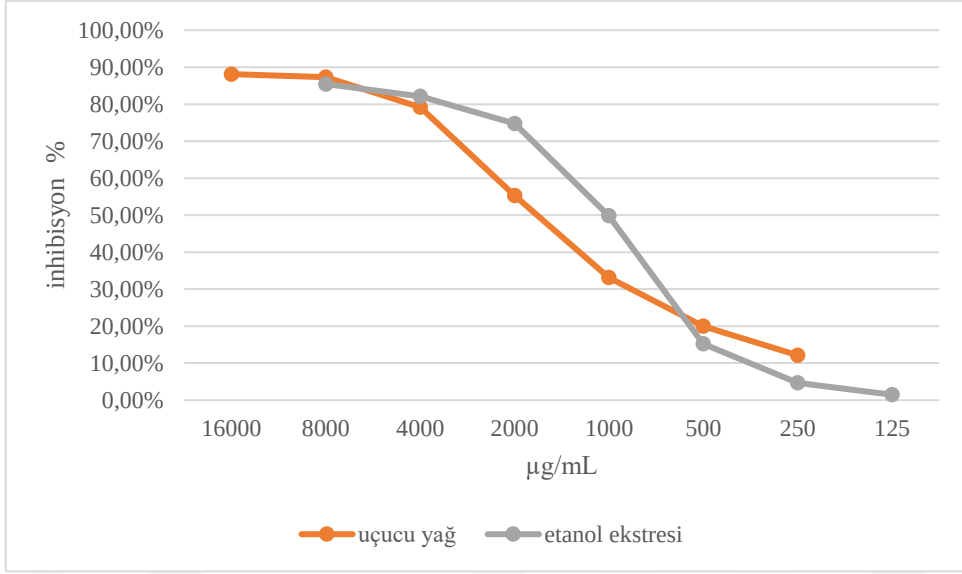
OD₆₀₀T- Numune absorbansı

OD₆₀₀GK- Üreme kontrolü absorbansı

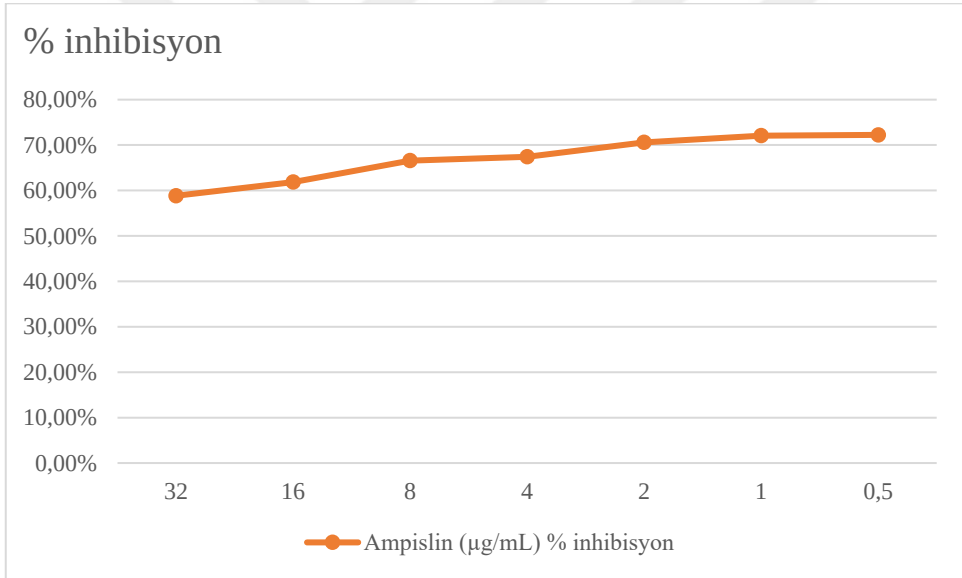
S. aureus'a karşı *S. wiedemannii* uçucu yağı 1000 µg/mL değerinde (MİK) planktonik hücre formunu inhibe ederken, 500 µg/mL'de biyofilm oluşumunu engellemiş, 2000 µg/mL'de ise oluşmuş biyofilmdeki metabolik aktiviteyi %55,33 oranında inhibe etmiştir. Etanol ekstresinin ise MİK ve MBİK değeri 125µg/mL olup, 1000 µg/mL'de değerinde %50 metabolik inhibisyon göstermektedir.

Tablo 4.7. Örneklerin *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu

SUY	% inh.	SE	% inh.	AMP	% inh.
16000	%88,130	8000	%85,449	32	%58,838
8000	%87,30	4000	%82,165	16	%61,837
4000	%79,195	2000	%74,728	8	%66,560
2000	%55,328	1000	%50	4	%67,389
1000	%33,120	500	%15,252	2	%70,580
500	%19,974	250	%4,658	1	%72,048
250	%12,125	125	%1,467	0,5	%72,239



Şekil 4.1. Uçucu yağ ve etanol ekstresinin % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu



Şekil 4.2. Ampisilin % biyofilm metabolik aktivite inhibisyonu

5. TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında İç Anadolu bölgesine endemik olan *S. wiedemannii*'nin kurutulmuş toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve çeşitli ekstralarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkisi incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ ve ekstraların bakteri ve funguslar üzerindeki etkisi öncelikle ön tarama şeklinde agar disk difüzyon testi ile saptanıp MİK değerleri CLSI M7-A7 ve M27-A2 metodu kullanılarak belirlenmiştir. MBİK ve MBEK değerleri de yayımlanmış protokoller kısmen modifiye edilerek ilk kez ortaya konmuştur (Sandberg vd., 2008, Sandberg vd., 2009).

Uçucu yağın, *n*-hekzan, %70 etanol, etil asetat ve su ekstralarının % verimi hesaplanmıştır. En yüksek % verim hesaplanan iki ekstre sırasıyla %70 etanol ekstresi %21,60 ve su ekstresi %20 olarak bulunmuştur. Ayrıca uçucu yağın bileşenleri GK-KS/GK-AID ile analiz edilmiştir. Kaya ve diğerlerinin 2009 yılında gerçekleştirdiği çalışmada bitkinin uçucu yağı GK-AID analiz edilmiş ve totalde uçucu yağın %96'sını oluşturan 35 bileşik tanımlanmış ve 1,8-sineol (%38,4), β -pinen (%24,5) ve α -pinen (%13,6) ana bileşiklerdir (Kaya, Başer, Demirci, 2009). Kunduhoğlu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada totalde uçucu yağın %89,9'unu oluşturan 13 bileşik tanımlanmış ve ana bileşenler sırasıyla α -pinen (%36,2), 1,8-sineol (%14,2), β -pinen (%13,3) olarak tespit edilmiştir (Kunduhoğlu vd., 2011).

Tez çalışmamızda ise benzer yöntemle yapılan analiz sonucunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Totalde uçucu yağın %96,1'ini oluşturan 29 bileşik saptanmış ve en yüksek yüzdeye sahip ana bileşenler sırasıyla α -pinen (%30,9), 1,8-sineol (%17,7), β -pinen (%17,2) olarak tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal çalışmada Gram negatif bakteriler bitkiden elde edilen uçucu yağ ve ekstralara karşı daha dirençli bulunmuştur.

S. aureus ATCC 6538 %70 EtOH ekstresi ve uçucu yağ için minimum bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) sırasıyla 8000 ve 2000 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. *S. aureus* ATCC 6538 üzerinde en etkili örnek %70 etanol ekstresi olarak bulunmuştur (MİK 125 $\mu\text{g/mL}$). Etil asetat ekstresi ise *C. utilis* NRRL Y-900'e karşı MİK değeri 31,25 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Standart ajanlarla kıyaslandığında her iki sonuç da oldukça zayıf görülmektedir. Biyofilm deneyleri *S. aureus* ile devam etmiştir.

Literatür taraması sonucu bu bitki ile yapılan herhangi bir MİK ve MBEK çalışmasına rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda uçucu yağın *S. aureus*'a karşı planktonik hücreleri inhibe ettiği dozlarda, petri tabanında önceden oluşturulmuş biyofilme ve içindeki canlı hücrelere aynı etkiyi göstermediği anlaşılmaktadır. Ancak uçucu yağ mikroorganizmanın gelişmesini engellemeden MİK den daha düşük dozda biyofilm üretme kapasitesini engellemiştir. Bu durum bize ½ MİK dozunda uygulanan uçucu yağın biyofilm oluşumunu engelleyerek, gerekirse bir antibiyotik ile kombine verildiğinde antibakteriyal ajanın etkinliğini bu sinerjik etki ile büyük ölçüde arttırabileceğini ortaya koymaktadır. Bu sonuç bize uçucu yağ ve antibiyotik kombinasyon çalışmalarının önemini ortaya koymuştur.

Uçucu yağın oluşmuş biyofilmi ortadan kaldırma dozu olan “minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu” ise denenen dozlarda oldukça düşüktür. Kristal viyole ile yapılan boyama ve 550nm de yapılan okuma sonucunda uçucu yağın 16.000, 8000, 4000 ve 2000 µg/mL dozlarda oluşmuş biyofilmde %20 eradikasyon sağladığı görülmüştür. Etanol ekstresinde hiçbir eradikasyona rastlanmamıştır.

Ancak dikkat çekici olarak, inhibe olmayan biyofilmin bünyesinde barındırdığı canlı bakteri hücrelerinin uçucu yağ için 2000 µg/mL’de dozda %55, etanol ekstresi için ise 1000 µg/mL’de %50’dir. Bu dozlar planktonik hücrelerin inhibisyonuna dayanan sıvı-mikrodilüsyon deneyi ile hesaplanan MİK değerlerinden (sırasıyla 1000 ve 125 µg/mL) daha büyüktür. Bu sonuç bize standart protokollerle hesaplanan MİK değerlerinin tamamen planktonik formdaki hücrelerin inhibisyonunda dayandığını, biyofilm içerisinde canlılığını sürdüren hücrelere etki etmediğini göstermiştir.

Ampisilinin de yapılan denemelerde biyofilm eradikasyonu aktivitesinin olmadığı, ancak oluşmuş biyofilmde denenen tüm dozlarda %58-72 aralığında metabolik aktivite inhibisyonu göstermiştir. Bu durum bize standart bir antibakteriyal olan ampisilinin biyofilme etkisinin olmadığı ve yaşayan mikrroorganizmaları da tamamen inhibe edemediğini göstermiştir.

Tez çalışmamız ile saptanan bir durum da; biyofilm içindeki hücrelerin canlılığını sürdürmeye devam etmesi, eradikasyon testinde sadece kristal viyolenin kullanılmasının yeterli olmadığını göstermektedir. Kristal viyole biyofilm matriksindeki maddeleri ve içindeki hücrelerin duvar yapılarını boyamakta ancak metabolik olarak aktiviteleri

konusunda bize bilgi vermemektedir. Uygun koşullar sağlandığında mikroorganizmanın çoğalması kaçınılmazdır. Test ettiğimiz ekstrenin, biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmaların canlılığını ortaya koymak için mutlaka resazurin ile boyanması gerektiği ve absorbansının okunmasının gerekliliği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalara kısıtlı literatür verileriyle kıyaslandığında kısmen benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Yapılan antimikrobiyal çalışmalar sonucunda bitkinin en etkili bulunan uçucu yağ ve etanol ekstresi standart olarak seçilen ampisiline kıyasla planktonik hücrelere karşı oldukça düşük etkide olsa da denenen dozlarda biyofilm içindeki canlılara olan etkinliği ve uçucu yağların antibiyotiklerle kombine olarak verildiğinde biyofilm oluşumunu engelleyerek, antibiyotiğin etkinliğini arttıracak sonucuna varılmıştır.

Doğal maddelerin klasik MİK belirleme deneyleri yanında günümüz inatçı enfeksiyonlarının en önemli sebebi olan biyofilmin inhibisyonu ve eradikasyonu çalışmalarının antimikrobiyal aktivitesi bilinen uçucu yağlar ile denenerek, çeşitli antibiyotikler ile kombinasyonlarının yapılması, patojen mikroorganizmalarla mücadelede doğal kaynakların gerçek etkilerinin ortaya konmasında büyük öneme sahip olduğu görülmüştür.

KAYNAKÇA

- Abak, F. (2018). *Şanlıurfa İli Lamiaceae (Ballıbabagiller) Familyasının Florası Bazı Taksonların Fitokimyasal ve Etnobotanik Özellikleri*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Rize: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Abd Algaffar, S.O., Verbon, A., van de Sande, W.W.J., Khalid, S. A. (2021). Development and Validation of an *In Vitro* Resazurin-Based Susceptibility Assay against *Madurella mycetomatis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 65 (3), e01338-20.
- Akıncı, N. (2018). *Bazı Salvia Türlerinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aktaş, Ş. ve Ertuğrul, M.B. (2018). Diyabetik Ayak ve Kronik Yaralarda Biyofilm. Sakarya S, editör. Biyofilm Enfeksiyonları.. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, (1) p.26-32.
- Amoah, S. K., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., Biavatti, M. W., (2016). Rosmarinic Acid-Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta medica*. 82(5), 388–406.
- Arar, D., (2015). *Bakteriyel Biyofilm Oluşumu*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ashitha, A., Midhun, S. J., Sunil, M. A., Nithin, T. U., Radhakrishnan, E. K., Mathew, J. (2019). Bacterial endophytes from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., with antibacterial efficacy against human pathogens. *Microbial pathogenesis*, 135, 103624.
- Astani, A., Reichling, J. and Schnitzler, P. (2010). Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy research*, 24(5), 673–679.
- Aytar, M., Oryaşın, E., Başbülbul, G., Bozdoğan, B. (2019). Agar Well Difüzyon Yönteminde Standardizasyon Çalışması, Bartın University. *International Journal of Natural and Applied Sciences. JONAS*, 2 (2): 138-145.

- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Başer, K.H.C., Kırimer, N. (2018). Essential oils of Anatolian Lamiaceae- An update, *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, 5(4), 1-28.
- Beğendik, F. (2003). İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolojide Biyofilm. *Flora*, 8(4), 271-277.
- Bouyahya, A., Taha, D., Benali, T., Zengin, G., El Omari, N., El Hachlafi, N., Khalid, A., Abdalla, A. N., Ardianto, C., Tan, C. S., Ming, L. C., Sahib, N. (2023). Natural sources, biological effects, and pharmacological properties of cynaroside. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 161, 114337.
- Celep, F., Dirmenci, F. (2017). Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey, *Nat. Volatiles & Essent. Oils*, 4(4), 14-27.
- Ceyhan, N. (2008). Klinikte Biyofilmlerin Önlenmesi İçin Antibiyofilm Stratejileri. *Turkish Journal of Infection*, 22 (4), 227-240.
- Chowhan, N., Singh, H. P., Batish, D. R., Kaur, S., Ahuja, N. ve Kohli, R. K. (2013). β -Pinene inhibited germination and early growth involves membrane peroxidation. *Protoplasma*, 250 (3), 691-700.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 2nd ed.; CLSI Document M7-A7; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2006; ISBN 1-56238-587-9.
- Çadircı, E., Süleyman, H., Gürbüz, P., Uz, A.K., Güvenalp, Z., Demirezer, L.Ö. (2012). Anti-inflammatory effects of different extracts from three *Salvia* species. *Turkish Journal of Biology*, 36 (1), 59-64.
- Çatak, E. ve Atalay, A. (2022). Lamiaceae (Labiatae) (Ballıbabagiller) Familyası'nın Ekonomik ve Tıbbi Değerleri. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences*, 9 (20), 150-157.
- Çiftçi, Z. (2005). *Kronik tonsilitte biyofilmin rolü*, Uzmanlık Tezi, İstanbul, Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi KKB Kliniği. 1-69.

- Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.
- de Macêdo Andrade, A. C., Rosalen, P. L., Freires, I. A., Scotti, L., Scotti, M. T., Aquino, S. G., de Castro, R. D. (2018). Antifungal Activity, Mode of Action, Docking Prediction and Anti-biofilm Effects of (+)- β -pinene Enantiomers against *Candida* spp. *Current topics in Medicinal Chemistry*, 18 (29), 2481–2490.
- Demirci, B., Tabanca, N., Başer K.H.C. (2002). Enantiomeric distribution of some monoterpenes in the essential oils of some *Salvia* species. *Flavour Fragr. J.*, 17, 54-58.
- Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2015). Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 2 (2), 39-44.
- Demirtürk, N. ve Demiral, T. (2004). Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 17-21.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., Dua, T.K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5 (2), 75-84.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 8: 881-890.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.*, 15(2): 167-193.
- Enache, M. ve Neagoie A. (2020). Microscopic characteristics of some Lamiaceae species - a selection of light microscopy images. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 24(2) 11-220.
- Eröz, İ., (2001). *Eskişehir Çevresinde Yetişen Tıbbi Salvia L. Türleri Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Felipe, C. F. B., Albuquerque, A. M. S., de Pontes, J. L. X., de Melo, J. Í. V., Rodrigues, T. C. M. L., de Sousa, A. M. P., Monteiro, Á. B., Ribeiro, A. E. D. S., Lopes, J.

- P., de Menezes, I. R. A., & de Almeida, R. N. (2019). Comparative study of alpha- and beta-pinene effect on PTZ-induced convulsions in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 33(2), 181–190.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R., & Reyes-Chilpa, R. (2015). Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life sciences*, 128, 24-29.
- Gülgör, G., Korukoğlu, M., (2014). Mikroorganizmalar Arasında Çoğunluk Algılanması (Quorum Sensing), *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 83-92.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., (2009). Biyofilm; Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda*, 34 (3), 165-173.
- Gün Şeref, S., Çingibel, İ., Öz, E., Çetin, H., (2011). Bazı Salvia L. (Labiatae) Bitki Ekstraktlarının, Sivrisinek Culex pipiens L. (Diptera: Culicidae)'e Karşı Larva Öldürücü Aktivitesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17((A)), 61-65.
- Gyawali, R. İbrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents, *Food Control*, 46, 412-429.
- Hu, Q., Zhou, M., ve Wei, S. (2018). Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis Field. *Journal of food science*, 83(6), 1476–1483.
- Irtegun Kandemir, S., Fidan, H.S., Yener, I., Mete, N., Ertaş, A., Topcu, G., Kolak, U. (2022). Investigation of cytotoxic and apoptotic effects of 63 compounds obtained from Salvia species: Promising anticancer agents. *Journal of Food Biochemistry*, 46(9), e14226.
- İşcan, G. (2017). Antibacterial and anticandidal activities of common essential oil constituents. *Rec. Nat. Prod.*, 11:4 374-388.
- Jorgensen, J. H. ve Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(11), 1749–1755.

- Juca, D.M., da Silva, M.T., Junior, R.C., Jr., de Lima, F.J., Okoba, W., Lahlou, S., de Oliveira, R.B., dos Santos, A.A., Magalhaes, P.J., (2011). The essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its constituents, alpha- and beta-pinene, show accelerative properties on rat gastrointestinal transit. *Planta Med.*, , 77, 57–59.
- Juergens, U.R., (2014). Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Research*, 64(12), 638–646.
- Juergens, L. J., Worth, H., ve Juergens, U. R. (2020). New Perspectives for Mucolytic, Anti-inflammatory and Adjunctive Therapy with 1,8-Cineole in COPD and Asthma: Review on the New Therapeutic Approach. *Advances in Therapy*, 37 (5), 1737–1753.
- Kam Hepdeniz, Ö., Seçkin, Ö., (2017). Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm, *SdÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.*, 8 (3), 47-55.
- Kaya, A. (2011). Morphological, Anatomical and Trichomes Properties of *Salvia Wiedemannii* Boiss. Endemic to Turkey, *Turk J. Pharm. Sci.*, 8 (3), 227-238.
- Kaya, A., Başer, K.H.C., Demirci, B., (2009). Composition of essential oil of endemic *Salvia wiedemannii* in Turkey. *Chem. Nat. Compd.*, 45, 552- 553.
- Kim, Y., Narayanan, S. ve Chang, K. O. (2010). Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral research*, 88(2), 227-235.,
- Koyuncu, O., Yaylacı, Ö.K., Öztürk, D., Potoğlu Erkara, İ., Savaroğlu, F., Akçoçkun, Ö., Ardiç, M., (2010). Risk categories and ethnobotanical features of the Lamiaceae taxa growing naturally in Osmaniye (Bilecik/Turkey) and environs, *Biological Diversity and Conservation*, (3)3, 31-45.
- Köremezli, A., Kariptaş, E., Erdem, B. (2022). Bakteriyel Mikroorganizmalarda Bir Savunma Sistemi: “Biofilm”. *BSJ Health Sci.*, 5(1),153-161.
- Kunduhoğlu, B., Kürkçüoğlu, M., Duru, M.E.ve Başer K.H.C. (2011). Antimicrobial and anticholinesterase activities of the essential oils isolated from *Salvia dicrantha* Stapf., *Salvia verticillata* L. subsp *amasiaca* (Freyn and Bornm.) Bornm. and

- Salvia wiedemannii Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6484-6490.
- Küpeli Akkol, E., Göğer, F., Koşar, M., Başer, K.H.C., (2008). Phenolic composition and biological activities of Salvia halophila and Salvia virgata from Turkey. *Food Chem.*, 108:942–49.
- Lampronti, I., Saab, A.M., Gambari, R., (2006). Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int. J. Oncol.*, 29, 989–995.
- Lewis, K., (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *American Society for Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Li, Y.H., Tian, X., (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*, 12(3), 2519-2538.
- Liao, S., Shang, S., Shen, M., Rao, X., Si, H., Song, J., Song, Z., (2016). One-pot synthesis and antimicrobial evaluation of novel 3-cyanopyridine derivatives of (-)-beta-pinene. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 1512–1515.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese medicine*, 14, 11.
- Machado, T.Q., Felisberto, J.R.S., Guimarães, E.F., Queiroz, G.A., Fonseca, A.C.C. D., Ramos Y.J., Marques A.M., Moreira D.L., Robbs, B.K. (2022). Apoptotic effect of β -pinene on oral squamous cell carcinoma as one of the major compounds from essential oil of medicinal plant *Piper rivinoides* Kunth. *Natural product research*, 36(6), 1636-1640.
- Marcinkiewicz, J., Strus M., Pasich E. (2013). Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 123 (6), 309-313.
- Milletli Sezgin, F., Sevim, E., Sevim, A. (2019). Antibiotic susceptibility of enterococcal strains: comparison of clinical breakpoint interpretations for disk diffusion according to the CLSI and EUCAST. *Klinik Derg.*, 32 (1), 35-9.

- Napoli, E., Siracusa, L., Ruberto, G. (2020). New Tricks for Old Guys: Recent Developments in the Chemistry, Biochemistry, Applications and Exploitation of Selected Species from the Lamiaceae Family. *Chemistry & biodiversity*, 17(3), e1900677.
- NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
- NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 2nd ed.; NCCLS Document, M27-A2; NCCLS:Wayne, PA, USA, 2002; ISBN 1-56238-469-4.
- Onbaşlı, D., Yuvalı Çelik, G., Katırcıoğlu, G. (2020). İlaça Dirençli Mikroorganizmalara Karşı Yeni Bir Yaklaşım: Geleceğin Antibiyotikleri, Bitkisel Antimikrobiyal Peptidler. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 7(1), 51-57
- Onbaşlı, D., Yuvalı, Çelik, G., Ökçesiz, A. (2017). Mikrobiyal biyofilmlere karşı yeni antibiyofilm stratejileri ve nanoteknolojik yaklaşımlar. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26 (3), 262-266.
- Orhan, İ., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B. ve Choudhary, M. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish Salvia species. *Food chemistry*, 103, 1247-1254.
- Özkan, O., Aydın H., Bağcıgil, A. (2009). Salvia verticillata ve Phlomis pungens'in vitro antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(4), 587-590.
- Öztürk, Ş.B., (2018). Bakteri ve Biyofilm. Sakarya S, editör. Biyofilm Enfeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, 14-9.
- Petersen, M., Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.
- Pinto, E., Vale-Silva L., Cavaleiro C., Salgueiro L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology*, 58 (11), 1454–1462.

- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.*, 7(4), 493-512.
- Rivas da Silva, A.C., Lopes, P.M., Barros de Azevedo, M.M., Costa, D.C., Alviano, C.S., Alviano D.S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17 (6), 6305–6316.
- Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B.E. ve Åkerlund B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. *J. Intern Med.*, 276, 98-110.
- Sakarya S., (2018). Anti-biyofilm Stratejileri. Biyofilm Enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri*,1, 66-72.
- Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., L D Jayaweera, S., A Dias, D., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W. C. ve Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, 9 (11), 738.
- Sandberg, M., Määttänen, A., Peltonen, J., Vuorela, P. M. ve Fallarero, A. (2008). Automating a 96-well microtitre plate model for Staphylococcus aureus biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(3), 233–240.
- Sandberg, M. E., Schellmann, D., Brunhofer, G., Erker, T., Busygin, I., Leino, R., Vuorela, P. M., Fallarero, A. (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable Staphylococcus aureus biofilms in a screening assay. *Journal of Microbiological Methods*, 78 (1), 104–106.
- Sarmiento-Vizcaíno, A., Martín, J., Reyes, F., García, L. A., Blanco, G. (2021). Bioactive natural products in actinobacteria isolated in rainwater from storm clouds transported by western winds in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 3400.
- Sharifi-Rad, M., Özçelik, B., Altın, G., Daşkaya-Dikmen, C., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., ... Sharifi-Rad, J. (2018). Salvia spp. plants-from farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Trends in Food Science Technology*, 80, 242–263.

- Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R. (2017). Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J.*,11, 53-62.
- Söyletir, G., (2013). EUCAST ve CLSI Tercihleri: Türkiye’de Nereye Gitmeliyiz? *Ankem Derg.*, 27(2),19-20.
- Stoica, P., Chifiriuc, M.C., Rapa, M., Lazăr, V. (2017). Overview of biofilm-related problems in medical devices. *Infection and Control*, 3-23.
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-21.
- Şenol, F.S., (2009). *Türkiye’de Yetişen Bazı Salvia Türlerinin Asetilkolinesteraz İnhibitör Etkisi Üzerinde Araştırmalar*. Ankara. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı.
- Şenol, F.S., Orhan, İ., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yılmaz, G., Şener, B. (2010). Survey of 55 Turkish Salvia taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 120, 34–43.
- Şimşek Yavuz, S., (2018). Enfektif Endokarditler ve Biyofilm. Sakarya S, editör. Biyofilm Enfeksiyonları. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, 1,33-39.
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M. (2014). Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi: Eczacılık Fakültesi Yayınları, (4).
- Temel, A., Eraç, B. (2018). Biyofilmlerin Saptanması ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg.*, 48(1),1-13.
- Topçu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from Salvia species. *Journal of natural prod.*, 69(3), 482-487.
- Topçu, G., Yücer, R., Şenol, H. (2017). Bioactive Constituents of Anatolian Salvia Species. *Salvia Biotechnology. Springer, Cham.*, 31-132.
- Turdiboev, O.A., Shormonova, A.A., Sheludyokova, M.B., Akborov, F., Drew, B.T., Celep, F. (2022). Synopsis of Central Asian Salvia Species With Identification Key. *Phytotaxa*, 543 (1): 1-20.

- Tutar, U., Çelik, C., Karaman, İ., Ataş, M., Hepokur, C. (2016). Anti-biofilm and antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, May; 15 (5), 1039-1046.
- Ünal, D., Tayfur, M. (2017). Biyofilm. *Güncel Gastroenteroloji*, 21(2), 108-114.
- Ünal, M., Öztürk, O., Selçuk, M.Y. (2022). Aile hekimi gözü ile modern tıp tarihi. Aile Hekimliği Literatürü ve Akademik Süreç Yönetimi. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, 1:6-10.
- Üstün, O., Özçelik, B., Baykal, T. (2016). Bioactivities of ethanolic extract and its fractions of *Cistus laurifolius* L. (Cistaceae) and *Salvia wiedemannii* Boiss. (Lamiaceae) species. *Phcog Mag.*, 12, 82-85.
- Üstün O., Sezik E. (2011). Analgesic activity of *Salvia wiedemannii* Boiss. used in Turkish folk medicine. *Rec. Nat. Prod.*, 5(4):328
- Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulrichová, J., Křen, V. (2014). Isoquercitrin: pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267-282.
- Vasudevan, R., (2014). Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3), 1-16.
- Vatan, A., Saltoğlu, N. (2017). Biofilm and diabetic foot infections, *Klimik Derg.*, 30(3), 101-107.
- Verderosa, A.D., Totsika, M., Fairfull-Smith, K.E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.*, 7, 824
- Vila, R., Freixa, B., Cañigüeral, S. (2013). Antifungal compounds from plants. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*, 23-43.
- Walker, J. A., Sytsma, K. J. (2007). Staminal Evolution in the Genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic Evidence for Multiple Origins of the Staminal Lever. *Annals of Botany*, 100, 375-391.
- Watnick, P., Kolter, R. (2000) Biyofilm city of microbes. Minireview. *J Bacteriol*, 182, 2675-2679.

- Wang, Y., Wu, C., Zhang, Q., Shan, Y., Gu, W., Wang, S. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of novel β -pinene-based thiazole derivatives as potential anticancer agents via mitochondrial-mediated apoptosis pathway. *Bioorganic chemistry*, 84, 468–477.
- Willke Topçu, A., (2018) Biyofilm Nedir? Sakarya S, editör. Biyofilm Enfeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: *Türkiye Klinikleri*, 1-3.
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Hóiby, N., Molin, S., Song, Z.J. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *Int J Oral Sci.* Apr, 3(2), 74-81.
- Yılmaz, G., Eruygur, N., Bona, G. E., BONA, M., Akdeniz, M., Yılmaz, M. A., ... Ertaş, A. (2023). Phytochemical analysis, antioxidant, and enzyme inhibition activity of five *Salvia* taxa from Turkey. *South African Journal of Botany*, vol.152, 212-221.
- Yücel Şengün, İ., Öztürk, B. (2018). Bitkisel Kaynaklı Bazı Doğal Antimikrobiyaller. *Anadolu Üniv. Bil.Tek. Der. C – Yaşam Bil. ve Biyotek.* 7 (2), 256-276.
- Yousefzadi, M., Sonboli, A., Karimic, F., Ebrahimi, S. N., Asghari, B., Zeinalia, A. (2007). Antimicrobial activity of some *Salvia* species essential oils from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 62(7-8), 514–518.
- Zari, A. T., Zari, T. A., Hakeem, K. R. (2021). Anticancer Properties of Eugenol: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23), 7407.
- http-1:** <http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=karsilastir>
(Erişim tarihi: 13.11.2022)
- http-2:** <https://kocaelibitkileri.com/lamiaceae-ballibabagiller/>
(Erişim 25.02.2022)
- http-3:** <https://www.erdemyesilada.com/tr/article/desc/54037/adacayi-beyni-guclendiriyor.html> (Erişim tarihi 18.03.2023)
- http-4:** <https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf>
(Erişim tarihi 22.03.2023)

http-5:

https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_2.pdf
(Erişim tarihi 23.03.2023)

http-6: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-moving-who-guidance-on-antibiotics-into-the-heart-of-clinical-practice> (Erişim tarihi 23.03.2023)

http-7: <https://www.titck.gov.tr/haber/7-akilci-antibiyotik-kullanimi-ve-farkindaliksempozyumu-26112022131314> (Erişim tarihi 25.03.2023)

http-8: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
(Erişim tarihi 25.03.2023)

http-9: Principles of Antimicrobial Chemotherapy | Basicmedical Key
(Erişim tarihi: 30.03.2023)

http-10:

<https://www.open.edu/openlearncreate/mod/oucontent/view.php?id=172394§ion=2.2.1> (Erişim tarihi 15.05.2023)