



***Thymus serpyllum* ve *Pinus nigra* Aetherolea**

Kombinasyonlarının Biyolojik Aktiviteleri

Yüksek Lisans Tezi

Sümeyye Elif KAHYA

Eskişehir 2024

Thymus serpyllum ve *Pinus nigra* Aetherolea Kombinasyonlarının Biyolojik Aktiviteleri

Sümeyye Elif KAHYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Esra KARADAĞ)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2024

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen TYL-2024-2386. no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sümeyye Elif KAHYA'nın "*Thymus serpyllum* ve *Pinus nigra* Aetherolea Kombinasyonlarının Biyolojik Aktiviteleri" başlıklı tezi 16/07/2024 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. Fatih DEMİRCİ	
Üye	: Prof. Dr. Evrim AKYIL	
Üye	: Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ	

.....
Prof. Dr. Saime ÖNCE
Enstitü Müdürü

ÖZET

Thymus serpyllum ve *Pinus nigra* Aetherolea Kombinasyonlarının Biyolojik Aktiviteleri

Sümeyye Elif KAHYA

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2024

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Esra KARADAĞ)

Uçucu yağlar tek başına ve karışımlar halinde aromaterapi uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ticari *Thymus serpyllum* ve *Pinus nigra* uçucu yağlarının tek ve kombinasyonlarının etkinlikleri sistematik olarak incelenmiştir.

İlk olarak uçucu yağların kimyasal profillerinin teyidi için GK-AID ve GK/KS analizleri yapılmıştır. *T. serpyllum* ana bileşenleri geraniol (%19,3) ve *p*-simen (%12,9), *P. nigra* uçucu yağının ana bileşenleriyse α -pinen (%73,8) ve *trans*-verbenol (%4,4) olarak belirlenmiştir. Sonrasında uçucu yağlarının *in vitro* antimikrobiyal etkinlikleri ve kombinasyonlarla karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Çalışmalar *Bacillus cereus* NRRLB-3711, *Bacillus subtilis* NRRLB-4378, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* NRLLB-3008, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Moraxella catarrhalis* ATCC 23245, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA44, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mitis* NCIMB 13770, *Streptococcus mutans* ATCC 2512 mikroorganizmaları kullanılarak MİK değerleri 250-1000 μ g/mL aralığında belirlenmiştir. *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının birbirleriyle ve her bir uçucu yağın siproflaksasin, amoksisilin ve tetrasiklin kombinasyonları dama tahtası yöntemi değerlendirilmiştir. *T. serpyllum*-*P. nigra* kombinasyonu *E. faecalis* (FİKİ: 0,1875) ve *S. epidermidis* (FİKİ: 0,375) karşı sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. *P. nigra* ve amoksisilin kombinasyonu ise *S. mitis* (FİKİ:0,187) suşuna karşı sinerjik etki belirlenmiştir. Ayrıca iki uçucu yağın ana bileşenleri olarak tespit edilen geraniol ve α -pinen kombinasyonlarının aktiviteleri değerlendirilmiştir, çalışmada kullanılan tüm mikroorganizmalara karşı bağımsız etki hesaplamıştır. Uçucu yağ ve antibiyotik kombinasyonlarında sinerjik etkiye sahip konsantrasyonların, HEK293 hücre hattında MTT yöntemiyle toksisite olmadığı tespit edilmiştir. Yapılmış olan biyoaktivite çalışmaları sonucunda *T. serpyllum*-*P. nigra* ve *P. nigra*-Amoksisilin kombinasyonlarının düşük konsantrasyonlarda potansiyel antimikrobiyal madde olarak değerlendirilebileceği ilk kez bu tez çalışması kapsamında ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Thymus serpyllum* L., *Pinus nigra* JF Arnold, antimikrobiyal aktivite, sinerji

ABSTRACT

Biological Activities of *Thymus serpyllum* and *Pinus nigra* Essential Oil Combinations

Sümeyye Elif KAHYA

Department of Pharmacognosy
Anadolu University, Graduate School, Temmuz 2024

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

(Co-Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Esra KARADAĞ)

In this study, phytochemical analysis of commercial *Thymus serpyllum* and *Pinus nigra* essential oils and the biological activities of their combinations were investigated. GC-MS analyzes were carried out to reveal the chemical profiles of essential oils. The main components of *T. serpyllum* essential oil were found as geraniol (19.3%) and p-cymene (12.9%), the main components of *P. nigra* essential oil were found as α -pinene (73.8%) and trans-verbenol (4.4%). Then, *in vitro* antimicrobial activities of *T. serpyllum* and *P. nigra* essential oils and the activities of their combinations were examined. Studies *Bacillus cereus* NRRLB-3711, *Bacillus subtilis* NRRLB-4378, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* NRLLB-3008, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Moraxella catarrhalis* ATCC 23245, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA44, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus mitis* NCIMB 13770, *Streptococcus mutans* ATCC 2512 microorganisms and MIC values were determined in the range of 250-1000 $\mu\text{g/mL}$. *T. serpyllum* and *P. nigra* essential oils were evaluated with each other and the combinations of each essential oil with ciprofloxacin, amoxicillin and tetracycline were evaluated by the checkerboard method. It was determined that *T. serpyllum*-*P. nigra* combination against *Enterococcus faecalis* (FICI:0.1875) and *Staphylococcus epidermidis* (FICI:0.375) combinations showed a synergistic effect. The combination of *P. nigra* and amoxicillin showed a synergistic effect against the *Streptococcus mitis* (FICI:0.187) strain. In addition, the activities of geraniol and α -pinene combinations, which were identified as the main components of the two essential oils, were evaluated, and independent effects were observed against all microorganisms used in the study. The cytotoxicity of concentrations that have a synergistic effect in essential oil and antibiotic combinations was examined by the MTT method on the HEK93 cell line and it was determined with no toxicity. As a result of all biological activity studies, it was revealed for the first time within the scope of this thesis that *T. serpyllum*-*P. nigra* and *P. nigra*-Amoxicillin combinations could be considered as potential antimicrobial agents at low concentrations.

Keywords: *Thymus serpyllum* L., *Pinus nigra* JF Arnold, antimicrobial activity, synergism

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana her zaman yol gösteren, değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ' ye,

Akademik hayatımın başlamasında büyük katkısı olan, deneysel çalışmalarım boyunca hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, herhangi bir sorunda her şekilde yanımda olan ikinci tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üye. Ayşe Esra KARADAĞ' a

Teknik ve idari bir sorunla karşılaştığım zamanlarda bilgi ve tecrübesi ile yanımda olan Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ' ye,

Aktivite çalışmalarımda teorik ve pratik çözüm önerileri ve tecrübeleriyle her zaman katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Gökalp İŞCAN' a,

Analiz ve deneysel çalışmalarımda katkıları bulunan Sayın Dr. Öğr. Üye. Gözde ÖZTÜRK, Arş. Gör. Bilge Nur MUTLU ve Uzm. Bio. Seda HACIOĞLU' na,

Bu süreçte hem akademik hem de psikolojik olarak her zaman desteklerini gördüğüm sevgili çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Şule Nur KARAVUŞ ve Arş. Gör. Ayşegül ÖZ'e,

Beni her zaman motive edip pozitif enerjileriyle bu sürecin hızla geçmesini sağlayan ev arkadaşım Gülfem YARAMIŞ, kardeşlerim Yaren Esra KAHYA ve Ezgi Minel KAHYA' ya

Hayatımın her aşamasında sonsuz desteklerini esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan canım annem ve babama teşekkürlerimi sunarım...

Sümeyye Elif KAHYA

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 programı”yla 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.

imza

Sümeyye Elif KAHYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Thymus</i> L. Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. <i>Thymus serpyllum</i> L.	3
2.1.2. <i>T. serpyllum</i> türünün etnobotanik kullanımı.....	5
2.1.3. Uçucu yağ fitokimyası.....	6
2.1.4. Uçucu yağ biyolojik aktiviteleri.....	8
2.1.4.1. Antimikrobiyal aktivite	8
2.1.4.2. Antioksidan aktivite	9
2.1.4.3. Antifungal aktivite	10
2.1.4.5. Antitümör ve sitotoksik etki.....	10
2.2. <i>Pinus</i> L. Genel Bilgiler	11
2.2.1. <i>Pinus nigra</i> JF Arnold.....	12

2.2.2. <i>Pinus nigra</i> etnobotanik kullanımı	13
2.2.3. Uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri	13
2.2.4. Biyolojik aktiviteleri	15
2.2.4.1. Antimikrobiyal aktivite	15
2.2.4.2. Antioksidan aktivite	16
2.2.4.3 Antifungal aktivite	16
2.3. Uçucu Yağların Kombinasyon Çalışmaları.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Kullanılan uçucu yağ ve standart maddeler	18
3.1.2. Antibakteriyel ilaç etken maddeleri	19
3.1.3 Kullanılan maddeler ve çözücüler	19
3.1.4 Kullanılan sarf malzemeleri	19
3.1.5 Kullanılan cihazlar ve aletler	20
3.1.6 Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar	20
3.1.7. Uçucu yağların analiz koşulları	20
3.2. <i>In vitro</i> Yöntemler	21
3.2.1. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları	21
3.2.2. Dama tahtası yöntemi	22
3.3.3. Biyootografi yöntemi.....	24
3.3.3.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) sistemi.....	24
3.3.3.2. Besi yerlerinin hazırlanması ve aşılınması	25
3.3.3.3. Aktivite belirlenmesi	25
3.3.4. MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]	25
4. BULGULAR VE YORUM.....	26
4.1. Uçucu yağların Fitokimyasal Analiz Sonuçları	26
4.2. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	29

4.3. Kombinasyonların Antimikrobiyal Aktiviteleri	30
4.4. Biyootografi Sonuçları.....	37
4.5. MTT Sonuçları.....	37
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKÇA.....	43
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Farklı ölkelerde yetişen kekik ana bileşenleri.....	7
Tablo 2.2. <i>P. nigra</i> uçucu yağının ölkeler bazında majör bileşenleri	14
Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.....	19
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan cihaz ve aletler.....	20
Tablo 3.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar.....	20
Tablo 4.1. <i>P. nigra</i> ve <i>T. serpyllum</i> uçucu yağ bileşenleri.....	26
Tablo 4.2. Uçucu yağların ve antibiyotiklerin MİK değerleri	29
Tablo 4.3. <i>T. serpyllum</i> - <i>P. nigra</i> uçucu yağ kombinasyonları.....	31
Tablo 4.4. <i>T. serpyllum</i> - antimikrobiyal ajan kombinasyonları	32
Tablo 4.5. <i>P. nigra</i> - antimikrobiyal ajan kombinasyonları.....	34
Tablo 4.6. Geraniol ve α -pinen kombinasyonları	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. <i>T. serpyllum</i> uçucu yağının tespit edilen kemotipleri.....	7
Şekil 2. 2. <i>Pinus nigra</i> 'da uçucu yağında bulunan bazı ana bileşiklerin yapıları	15



GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2. 1. <i>Thymus serpyllum</i> 'un doğal habitatı.....	4
Görsel 2. 2. <i>Thymus serpyllum</i> L.....	4
Görsel 2. 3. <i>P. nigra</i> 'nın doğal habitatı.....	12
Görsel 2. 4. <i>Pinus nigra</i> JF Arnold	13
Görsel 3. 1. Dama tahtası uygulama detayları	23
Görsel 4. 1. <i>T. serpyllum</i> - <i>P. nigra</i> ucucu yağ kombinasyonunun <i>E. faecalis</i> 'e karşı etkisi.....	32
Görsel 4. 2. <i>S. epidermidis</i> 'e karşı <i>T. serpyllum</i> - <i>P. nigra</i> kombinasyonu	32
Görsel 4. 3. <i>P. nigra</i> - amoksisilin kombinasyonu.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
CLSI	: Clinical and Laboratory Standart Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sıvı besiyeri)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FDA	: Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu)
FİK	: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu
FİKİ	: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksi
FRAP	: Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin)
GK/KS	: Gaz kromatografisi/ Kütle spektrofotometresi
HepG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
IC ₅₀	: Maksimum inhibitör konsantrasyonu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
LNCap	: İnsan prostat adenokarsinomu hücreleri
MHA	: Mueller Hinton Agar

MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NCI-H460	: Büyük hücreli akciğer kanseri hücre hattı
NCTC	: The National Collection of Type Cultures (Ulusal Kültür Koleksiyonu)
RRI	: Relative retention index (Rölatif alıkonma indeksi)
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktifi
TTC	: Tetrazolium tuzu
UV	: Ultraviole
FBS	: Fetal Bovine Serum
CO ₂	: Karbondioksit
HEK293	: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
h/h	: Hacim/hacim

1. GİRİŞ

Günümüzde antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, dünya çapında klinik ve ekonomik olarak yıkıcı etkilere neden olmaktadır (Murray vd., 2022). Bakteriyel direnç, halk sağlığını tehdit etmekte ve yüksek oranda mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Aynı zamanda bakteri direnci, dünya çapında oluşabilecek yeni bulaşıcı hastalıklarla mücadele yeteneğini de tehdit etmektedir (Ventola, 2015).

Sinerjik etkileşimlerin terapötik değerleri ve kullanımları antik çağlardan bu yana bilinmektedir. Ayurveda ve Geleneksel Çin Tıbbı tedavi sisteminde çoklu bitkisel karışımlardan oluşan formüller, çeşitli hastalıklarda kullanılmıştır. Çoklu ilaç direncini tedavi etmek için son dönemlerde uçucu yağların kendi aralarında kombinasyonları ve sentetik antibiyotiklerin uçucu yağlar ile kombinasyon çalışmalarına ilgi artmaktadır. Özellikle de enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kombinasyon tedavi uygulamaları üzerinde yoğunlaşmıştır (Langeveld vd., 2014). Sinerjik etki kavramı, kombinasyon halinde etkinliğinin artırılacağı, toksisiteyi azaltacağı, yan etkilerini azaltacağı, biyoyararlanımı arttırabileceği, düşük dozda antimikrobiyal direnci azaltacağı için önemli avantajlara sahiptir. Doğal ürün kombinasyonları içeren yeni antimikrobiyal kombinasyonlar, son yıllardaki araştırmaların önceliği haline gelmiştir (Cottarel ve Wierzbowski, 2007).

Yüzyıllardan beri geleneksel tıpta kullanılmakta olan uçucu yağlar, terpenler, alifatik aldehitler, alkoller ve ester karışımlarından oluşmaktadır. 3000'den fazla uçucu bileşen tanımlanmış olup her biri uçucu yağların içerisinde farklı oranlarda ve miktarlarda bulunmaktadır (Jugreet vd, 2020). Uçucu yağlar, antibakteriyel, antienflamatuvar, antispazmodik, analjezik, karminatif ve antiviral gibi birçok etkilerinin yanı sıra; yara tedavisinde, grip ve soğuk algınlığı gibi solunum yolları hastalıklarında kullanılmaktadır (Mancianti ve Ebani, 2020).

Uçucu yağların etki mekanizmaları, çeşitli fizyolojik yolları inhibe etmesi bakımından farklılık göstermektedir. Ayrıca yeni kombinasyonlar, geleneksel antibiyotiklere kıyasla çeşitli mekanizmalarla bakterinin daha etkin ve kısa sürede inhibisyonunu sağlamıştır (Boren vd., 2020).

Tıbbi bitkilerden geliştirilmiş ürünler ve preparatlar, uzun yıllardan beri tedavi amaçlı kullanılmıştır. Lamiaceae familyasına ait olan *Thymus* L. ve Pinaceae familyasına ait olan *Pinus* L. türleri, dünyada doğal yetiştirme alanlarının geniş çevrelere yayılmasından dolayı halk arasında mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde başarı ile kullanılmıştır (Jovanović vd, 2021; Papp vd., 2022).

Ticari önemi olan *Thymus serpyllum* L. ve *Pinus nigra* JF Arnold uçucu yağlarının literatürde antimikrobiyal etkileri bilinmesine rağmen, ilk defa bu tez çalışmasında kombinasyonları halinde, hedeflenen insan patojenleri üzerindeki potansiyel sinerjik etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda kullanılacak olan uçucu yağların majör bileşenlerinin seçilen antibiyotiklerle sistematik kombinasyonlarının *in vitro* biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olup antibiyotik direncinin önüne geçerek, güvenli ve etkili doğal kaynaklı potansiyel preparat oluşturması amaçlanmıştır. Mevcut tez projesi kapsamında ticari öneme sahip bitkisel droglardan ziyade uçucu yağ olarak bitkisel drog preparatı haricen kullanım potansiyelleri de dikkate alınarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Thymus* L. Genel Bilgiler

Thymus L. cinsi Lamiaceae familyasına ait olup dünya çapında 350'den fazla tür ve 36 tane alt türden oluşmaktadır. Ana vatanı Akdeniz bölgesi olmasına rağmen Avrupa, Güney Amerika ve Asya'da yayılımı gözlemlenmiştir. Hemen hemen dünyanın her yerinde tıbbi ve baharat amaçlı kullanılan aromatik bir bitkidir. Genel olarak *Thymus* cinsi parfümeri, gıda, kozmetik ve farmasötik ilaç alanında önemli bir yere sahiptir. Bu türler arasında *Thymus vulgaris* L. (yaygın kekik, Alman kekiği) en önemlilerinden biri olup eski çağlardan beri kullanılmaktadır. *Thymus zygis* L. (İspanyol kekiği), *Thymus serpyllum* L. (yabani kekik), *Thymus pulegioides* L. (limon kekiği) gibi türler de dünya çapında çeşitli ticari değeri bulunan diğer *Thymus* türleri arasındadır (Stahl-Biskup ve Sáez, 2002).

Antik çağda *Thymus* türlerinin tütsü olarak akciğer hastalıklarının hafifletilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca diğer uçucu yağlarda olduğu gibi *Thymus* uçucu yağları da mumyalama işleminde kullanılmıştır. *Thymus* türleri genel olarak %0,4 ila %3,4 arasında değişen yüzdelerde uçucu yağ içermektedir (Singletary, 2016). Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı olan *Thymus* türlerinden *T. serpyllum* kuru drogda en az 3,0 mL/kg uçucu yağ içerirken, *T. vulgaris* ve *T. zygis* kuru drogda en az 12 mL/kg uçucu yağ içermesi gerekmektedir. (Ph. Eur. 11).

Thymus uçucu yağları, fenol monoterpen türevleri (timol, karvakrol, 1,8-sineol, linalol, α -terpineol, geraniol, borneol vb.), monoterpenler (γ -terpinen ve *p*-simen vb.), seskiterpenler (karyofillen vb.) içermektedir. Özellikle *T. vulgaris* ve *T. zygis* uçucu yağları yüksek miktarda timol içermesinden dolayı ekonomik bir öneme sahiptir. *Thymus* cinsi çok fazla tür çeşitliliğine sahip olmasına rağmen timol ve karvakrol tüm türlerde değişken miktarlarda bulunmaktadır (Salehi vd., 2019). Genel olarak *Thymus* uçucu yağlarının içeriği ve miktarı, türe ve kemotipe bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Nabavi vd., 2015).

2.1.1. *Thymus serpyllum* L.

Thymus cinsine ait olan *T. serpyllum* türü diğer bilinen adı ile yabani kekik, Avrupa'nın kuzey ucundan orta kısımlarına uzanan, yüksek rakımlı bölgelerinde yetişen, özellikle Akdeniz bölgesinde bulunan çok yıllık çalıdır (Görsel 2.1) (Farooqi vd., 2005).



Görsel 2. 1. *Thymus serpyllum* 'un doğal habitati

Boyu 7 cm'ye kadar uzayabilen, mavi-yeşil yaprak öbeklerinden oluşan kokulu çalının çiçekleri küçük koyu pembe-mor veya nadiren beyaz renklidir. Yaprakları oval şekilli, yaklaşık 4-6 mm uzunluğunda ve 2-4 mm genişliğindedir. Uzun trikomlarla kaplı olup her iki tarafı pürüzsüz bir dokuya sahiptir. Pembe taçlı çiçekler, eski sapların tepesinden kümeler halinde büyür ve çiçek salkımları oluşturur. Çiçeklenme dönemi Temmuz-Eylül ayları arasındadır. (Görsel 2.2) (Jaric vd., 2015).



Görsel 2. 2. *Thymus serpyllum* L. genel görünüş (http-1)

Bu tür, çoğunlukla kuru ve kumlu topraklarda, iğne yapraklı ormanların kenarları veya açık aralıklı nehir kıyıları ve içerik bakımından fakir topraklı çayırarda yetişmektedir (Stahl-Biskup ve Saez, 2002). Kuraklığa ve kuvvetli rüzgarlara karşı tolerans geliştirmiştir ancak gölgelik alanlarda yeterli gün ışığına maruz kalmadığı takdirde sayılarında azalma gözlenmiştir (Salaria vd., 2023).

Avrupa Farmakopesi'nde kurutulmuş çiçekli toprak üstü kısımlarının monografi bulunmaktadır. Avrupa'nın modern ve geleneksel tıbbında aktif olarak kullanılan *T.*

serpyllum'un biyolojik aktivitesi, uçucu yağında ve ekstresinde bulunan flavonoit, fenolik asitler ve tanenler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Bączek vd., 2019).

Belirli bazı aromatik bitkiler gibi *T. serpyllum* da FDA'da güvenli şekilde kullanılan bitkiler arasında yer almaktadır. İlaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde birçok farklı formülasyonun içerisinde yer aldığından dolayı önemli bir doğal kaynaktır (Jovanović, 2021).

2.1.2. *T. serpyllum* türünün etnobotanik kullanımı

Thymus cinsinin farklı türleri eski Mısır'da mumyalama ve tıbbi amaçlı koku balsamlarında kullanıldığı görülmüştür. *Thymus* türlerinin toprak üstü kısımlarının infüzyonun, dekoksionun ve uçucu yağın tonik, karminatif, antispazmodik, antioksidan, antiviral, antienflamatuvar ve balgam söktürücü etkileri nedeniyle eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Salaria vd., 2021).

Geleneksel tedavilerde yabani kekiğin toprak üstü kısımları şurup, tentür, infüzyon ve dekoksionu gibi çeşitli preparasyonlarına rastlanmıştır (Jovanović vd., 2021). 15. yüzyıldaki farmakoloji kaynaklarına göre soğuk algınlığı ve larenjitte kaynaklanan baş ağrısının tedavisinde kullanıldığından bahsedilmiştir. 15. ve 16. yüzyıllar arasında Chailander medikal el yazması kodeksinde yabani kekiğin soğuk algınlığı, larenjit ve baş ağrıların tedavisinde kullanımından bahsedilmektedir. Rönesans döneminde *T. serpyllum* oral olarak malarya ve epilepsi tedavisinde kullanılmıştır (Adams vd, 2012). Bitkinin toprak üstü kısımları uzun yıllar boyunca antiseptik, diaforetik, diüretik, analjezik ve ekspektoran olarak tedavide yerini almıştır (Jaric vd., 2015).

Balkanlarda *T. serpyllum* sakinleştirici, kolesterol seviyesini düşürücü ve periferik dolaşım üzerinde iyileştirici ve bağışıklık sistemini uyarıcı olarak kullanılmıştır (Mustafa vd., 2015). Antispazmodik etkisinden kaynaklı olarak Hindistan'da adet bozuklukları ve adet ağrılarında sıkça kullanılmaktadır (Gairola vd., 2014).

Antimikrobiyal ve antitüssif bileşenler içermesinden kaynaklı olarak halk arasında genellikle soğuk algınlığı, farenjit ve öksürükte kullanılmıştır (Karaman vd., 2001). Dekoksionu bronşlardaki sekresyonu arttırarak bronşit ve astım tedavisinden geçmişten bu yana tedavide yer almaktadır (Stojanovic vd, 2011).

Fermentasyonu önleyerek sindirime yardımcı ve besinlerin absorpsiyonun artmasında önemli rol oynadığından karminatif olarak kullanılmıştır. Eski zamanlardan

beri yabani kekiğin yaprakları ve çiçeklerinin filizleri böbrek ve mesanede oluşan hastalıklarda, dismenore ve kolik tedavisinde kullanılmaktadır (Heber, 2004).

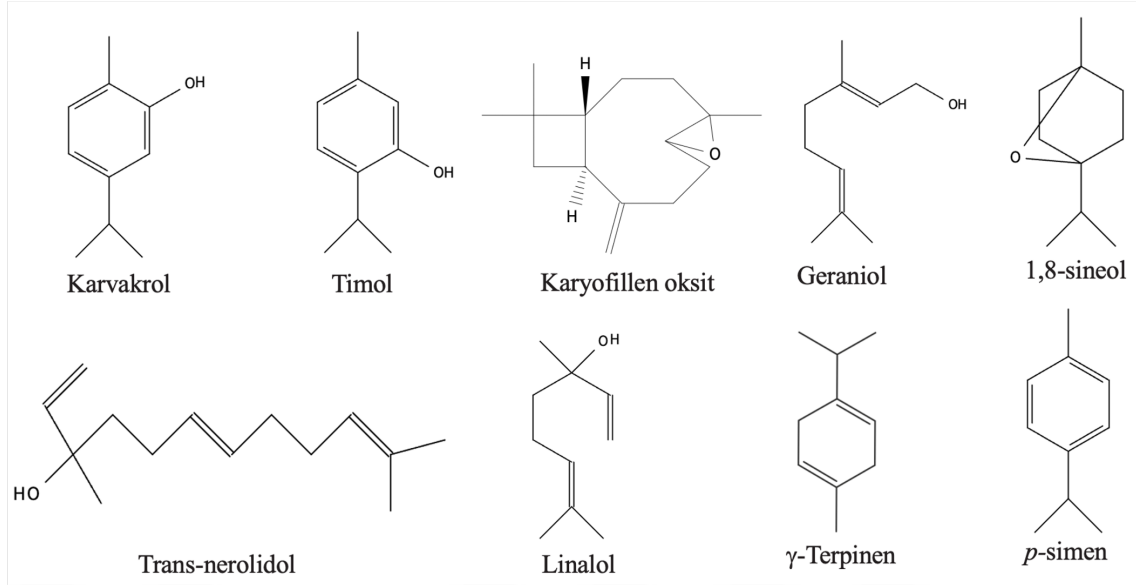
Haricen uygulamalarda egzama ve yaralarda kullanımı kayıtlı iken, ekstra terleme tedavilerinde alkollü ekstrelerinin eski zamanlarda kullanıldığı bildirilmiştir. Uçucu yağ ve alkol ekstreleri romatizma, siyatik ve burkulmalarda sıkça kullanılmaktadır. Aynı zamanda uçucu yağından kaynaklı olarak dezenfektan ve bağışıklık uyarıcı etkilere sahiptir (Aziz vd., 2008; Heber, 2004).

Yaygın olarak solunum yolları hastalıklarda kullanılmasının yanı sıra dekoksasyonu saç dökülmesini önlemede önemli etkilere sahiptir (Aziz vd., 2008). Bitkinin tüm kısımlarının dekoksasyonu astım tedavisinde ve mide rahatsızlıklarında kullanılmıştır. Yabani kekiğin antitüsif etkilerinden dolayı alkol ekstrelerinin standardize preparatlarının öksürük ve soğuk algınlığında kullanımının olduğu PDR Herbal Medicines’da belirtilmiştir (Fleming, 1998; Jaric vd., 2015).

2.1.3. Uçucu yağ fitokimyası

Uçucu yağ ve polifenolik bileşikler açısından zengin içeriğe sahip olan *T. serpyllum*’un fitokimyası üzerine birçok çalışma yürütülmüştür. 2003 yılından itibaren Avrupa Farmakopesi’nde kayıtlı olup standardize kuru drogun 3.0 mL/kg⁻¹ az olmamak üzere uçucu yağ içermesi gerekmektedir. *T. serpyllum* uçucu yağının ana bileşenleri timol ve karvakrol olarak Avrupa Farmakopesi’nde belirtilmiştir (Ph. Eur. 11). ESCOP monografına göre *T. serpyllum* uçucu yağının verimi %0,1-%0,6 olarak belirtilmiş ve majör bileşiğinin karvakrol olduğu ifade edilmiştir. Aynı zamanda majör bileşen olarak timol, linalol, linalil asetat, borneol, 1,8-sineol, germakren D, *p*-simen, *g*-terpinen, mirsen, β -karyofilen içerebileceği bildirilmiştir (ESCOP, 2014).

Fitokimyasal bileşenler ve konsantrasyonları, coğrafi konum, habitat, iklim koşulları, yetiştirme koşulları ve kökene bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Petrovic vd., 2014). *T. serpyllum*’un karvakrol, 1,8-sineol, karyofillen oksit, *p*-simen, geraniol, linalol, trans-nerolidol, γ -terpinen ve timol gibi 9 farklı kemotipi bildirilmiştir. Karvakrol ve timol kemotipleri dünya üzerinden en yaygın bulunan *T. serpyllum* kemotiplerindendir (Şekil 2.1) (Trindade vd., 2018).



Şekil 2. 1. *T. serpyllum* uçucu yağının tespit edilen kemotipleri

Herbal Medicines PDR'sine göre, *T. serpyllum* uçucu yağının en yaygın kemotipi olan karvakrol majör bileşen olarak belirtilmiştir. Yanı sıra borneol, izobütil asetat, karyofillen, 1,8-sineol, sitral, sitronellol, p-simen ve nispeten yüksek konsantrasyonlarda geraniol, linalol, α-pinen, γ-terpinen, α-terpineol, terpinil asetat ve timol içermektedir (Fleming, 1998). *T. serpyllum*'un farklı ülkelerde yapılmış olan çalışmalarda tespit edilmiş majör bileşenleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2. 1. Farklı ülkelerde yetişen kekik ana bileşenleri

Ülke	Majör bileşenler	Referans
Belarus	γ-terpinen (%21,4), p-simen (%19,0)	Kirillov ve ark.,2016
Hırvatistan	Karvakrol (%49,4), timol (%30), γ-terpinen (%5,3)	Kulisic ve ark.,2005
İran	Karvakrol (%48,8), timol (%13,8), p-simen (%12,3)	Rasooli ve ark.,2002
İtalya	Timol (%32,57), α-terpinen (%22,83), γ-terpinen (%9,15)	De Lisi ve ark.,2011
Kazakistan	Trans-geraniol (%55,93), lavandulil asetat (%28,51)	Kirillov ve ark.,2016
Polonya	Karvakrol (%37,49), γ-terpinen (%10,79)	Wesołowska ve ark.,2015
Romanya	Linalol (%17,4), nerolidol (%9,57), limonen (%6,8)	Georgescu ve Mirone, 2011
Rusya	Geraniol (%26,8), linalol (%21,8), timol (%6,3)	Paaver ve ark.,2010
Sırbistan	Trans-nerolidol (24.2%), germakren D (16.0%),	Petrovic ve ark., 2014

Tablo 2.1’de *T. serpyllum* uçucu yağının fitokimyasal analizleri sonucunda ana bileşenleri verilmiştir. Kazakistan’dan toplanılan yabani kekiğin, uçucu yağ fitokimyasal bileşen analizi sonucunda *trans*-geraniol, lavandulil asetat ve timol, İran’da karvakrol, timol ve *p*-simen ana bileşen olarak tespit edilmiştir (Kirillov vd., 2016; Rasooli vd., 2002).

Belarus’ta yabani kekiğin uçucu yağının uçucu bileşen analizinde γ -terpinen ve *p*-simen; Hırvatistan’da timol, karvakrol ve γ -terpinen; Estonya’da yetişen *T. serpyllum* uçucu yağının majör bileşenleri (E)-nerolidol, karyofilen oksit ve miseren; İtalya’da timol, α -terpinen ve γ -terpinen olarak rapor edilmiştir (De Lisi vd., 2011; Kirillov vd., 2016; Kulisic vd., 2005)

Polonya’da yetişen *T. serpyllum* bitkisinin uçucu yağının ana bileşeni karvakrol ve γ -terpinen iken Sırbistan’da *trans*-nerolidol ve germakren D olarak bulunmuştur (Wesołowska ve ark.,2015). Acimovic ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Sırbistan’dan toplanılmış olan *T. serpyllum*’un, uçucu yağında toplam 26 bileşik tanımlanmıştır ve ana bileşenler sırası ile geraniol (%63,4), nerol (veya *cis*-geraniol) (%18,9), geranil asetat (%4,7), *trans*-karyofillen (%4,6), β -bisabolen (%2,0) ve geranial (%1,2) olarak bulunmuştur. Fitokimyasal uçucu yağ analizi yapılan *T. serpyllum*’un *trans* (%63,4) ve *cis* (%18,9) formunda geraniol kemotipi olduğu sonucuna varılmıştır (Acimovic vd., 2020).

2.1.4. Uçucu yağ biyolojik aktiviteleri

2.1.4.1. Antimikrobiyal aktivite

T. serpyllum uçucu yağı içerisinde bulunan bileşenlerden kaynaklı olarak eski zamanlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Uçucu yağının majör bileşeni fenolik monoterpen olan karvakrolün çeşitli mikroorganizma türleri üzerinde güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Başer, 2008).

Wesołowska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *T. serpyllum* uçucu yağı 9 mikroorganizmaya karşı denenmiş olup, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Escherichia coli* MG1655’ye (MİK:0,025 μ L/mL) karşı göstermiştir. En düşük aktivite ise *Staphylococcus epidermidis* ATCC 4946’de (MİK: 0.78 μ L/mL) gözlemlenmiştir (Wesołowska vd., 2015).

Daha önce yapılan başka bir çalışmada, *T. serpyllum* uçucu yağının, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiş, MİK değerleri 0,10-2,5 mg/mL aralığında tespit edilmiştir (Mrkonjić vd., 2024).

Ouedrhiri ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise *T. serpyllum* uçucu yağının antimikrobiyal etkinliği agar disk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 3366 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmaları kullanılmıştır. Disk difüzyonda, inhibisyon zon çapı *S. aureus* 'ta 36 mm bulunmuş, *P. aeruginosa* 'da 10 mm olarak ölçülmüştür. Uçucu yağın MİK değeri *B. subtilis* ve *E. coli* 'de 0,125 µL/mL, *S. aureus* MİK değeri 0,250 µL/mL bulunmuştur (Ouedrhiri vd., 2016).

Bir başka çalışmada, *T. serpyllum* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi Gram negatif ve Gram pozitif bakterileri üzerinde inhibisyon çapları bakılarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif bakteri olan *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 karşı güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren *T. serpyllum* uçucu yağı, *B. subtilis* ATCC 6633 bakterisine karşı etkili çıkmamıştır (Fidan vd., 2023).

Nedorostova ve çalışma arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *T. serpyllum* uçucu yağının buhar fazı gıda kaynaklı bakterilere (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) karşı test edilmiş ve etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Nedorostova vd., 2009).

Preljevic ve çalışma arkadaşlarının yaptığı *T. serpyllum* uçucu yağı Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışmaları yürütmüşlerdir. Uçucu yağın en düşük MİK değeri *E. coli* patojenine karşı MİK değeri 1,5625 µL/mL olarak bulunmuştur. *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* mikroorganizmaları diğer suşlara karşı daha dirençli (MİK:12,5 µL/mL) bulunmuştur (Preljevic vd., 2024).

2.1.4.2. Antioksidan aktivite

Yabani kekik uçucu yağının antioksidan aktivitesi DPPH• ve ferrik indirgenme kapasitesi gibi farklı metotlarla test edilmiştir. Yapılmış olan bir çalışmada denenen diğer uçucu yağlar ve pozitif kontrole kıyasla *T. serpyllum* uçucu yağının antioksidan aktivitesi düşük bulunmuştur (Jamali vd., 2012).

Hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen *T. serpyllum* uçucu yağının ve timol

bileşeninin antioksidan aktivite çalışmaları için DPPH•, FRAP ve ABTS• metotları kullanılmıştır. Denenmiş tüm metotlarda *T. serpyllum* uçucu yağı ve timoldeki antioksidan aktivite pozitif kontrole kıyasla düşük bulunmuştur (Salaria vd., 2023).

Ouedrhiri ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, BHT metodu kullanılarak *T. serpyllum* uçucu yağının başka uçucu yağlarla karşılaştırmalı olarak antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer uçucu yağlara göre *T. serpyllum* IC₅₀ değeri en düşük çıkarak diğer test materyallerine kıyasla yüksek bir aktivite göstermiştir (Ouedrhiri vd., 2021).

2.1.4.3. Antifungal aktivite

Yabani kekik uçucu yağının antifungal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile 4 farklı *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*) türü üzerinde denenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre *T. serpyllum* (zon çapı 12,00 mm) pozitif kontrol olan flukonazole (zon çapı 29,83 mm) göre etkili bir sonuç ortaya koymamıştır (Jamali vd., 2012).

T. serpyllum uçucu yağının *C. albicans* ve *C. glabrata* üzerinde antifungal aktivitenin test edilmiştir. Çalışmada *T. serpyllum* uçucu yağının MİK değer aralığı 125-500 mg/L olarak rapor edilmiştir (Baj vd., 2020).

Aziz ve çalışma arkadaşlarının yapmış olduğu *T. serpyllum* uçucu yağının antifungal aktivite çalışmasında *Trichophyton longifusus*, *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis*, *Fusarium solani* ve *C. glabrata* üzerinde inhibisyon yüzdeleri incelenmiştir. Yabani kekik uçucu yağı *Fusarium solani*'yi %70 inhibe etmiştir. *C. albicans*, *Aspergillus flavus* ve *C. glabrata*'ya karşı herhangi bir antifungal aktivite bulunmamıştır (Aziz vd., 2010).

2.1.4.5. Antitümör ve sitotoksik etki

Yabani kekik uçucu yağı birçok kanser hücre hatlarında *in vitro* olarak test edilmiştir. Değişik bölgelerden toplanan *T. serpyllum*'un, hidrodistilasyon ile elde edilmiş uçucu yağının karaciğer, akciğer, pankreas ve prostat gibi kanser hücrelerinde testler yapılmıştır. Akciğer (NCI-H460) ve karaciğer (HepG2) kanser hücrelerinde düşük dozlarda daha etkili bulunmuştur (Nikolic vd., 2014).

LNCap prostat kanser hücrelerine karşı test edilen olan *T. serpyllum* uçucu yağı

pozitif kontrol doksorubisin ile karşılaştırıldığında fibroblast hücrelerinin çoğalmasını ve hormona bağlı prostat kanserinin büyümesinin engellendiği görülmüştür, *T. serpyllum*'un ana bileşenleri olarak kabul edilen karvakrol ve timol tümör hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahip olup fibroblastların aktif proliferasyonlarının uyarılmasında rol oynadığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Nikolic vd., 2014).

2.2. *Pinus* L. Genel Bilgiler

Pinus L. cinsi (Pinaceae) dünya üzerinde Kuzey Yarımkürede dağılımı yaygın olan, yaprak dökmeyen, reçineli ağaç veya çalılardan oluşan 130 adet tür içeren kozalaklı ağaçları içeren bir cinstir. *Pinus* L. cinsi kuzey yarım kürenin çoğunluğunda ve güney yarımkürenin ılıman bölgelerinde yetişmektedir (Mitic vd., 2018). Kimyasal bileşenlerinin tıbbi ve aromatik özellikleri, bitkinin tarih boyunca ekonomik açıdan en önemli cinslerden biri haline getirmiştir. Çam, geleneksel tedavi uygulamalarında yaygın olarak kullanılmasının yanında küresel ekonomide de rol oynamaktadır (Fekih vd., 2014).

Pinus L. cinsinin Türkiye'de 5 türü bulunmaktadır. 20 tane taksondan oluşmaktadır ve bunlardan 4 tanesi ülkemiz açısından endemiktir. Bunlar, *Pinus brutia* Ten., *Pinus sylvestris* L., *Pinus halepensis* Mill. ve *Pinus pinea* L. olup Anadolu, Kıbrıs, Kırım, Batı Kafkasya, Balkanlar ve batı Suriye'de dağılım göstermektedir (http-2). Türkiye'de bulunan *Pinus* türlerinin takson dağılımı şu şekildedir:

- 1) *Pinus brutia* Ten., var. *brutia* f. *agrophiotii* (Papaj.) Kandemir & Mataracı, var. *brutia* f. *brutia* Ten., var. *brutia* f. *pyramidalis* (Selik) Kandemir & Mataracı, var. *eldarica* (Medw.) Silba, var. *pendulifolia* Frankis, Ten. var. *pityusa* (Steven) Silba
- 2) *Pinus halepensis* Mill.
- 3) *Pinus nigra* JF Arnold, subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, subsp. *pallasiana* var. *fastigiata* Businský, subsp. *pallasiana* var. *pallasiana* f. *pallasiana*, subsp. *pallasiana* var. *pallasiana* f. *seneriana*, subsp. *pallasiana* var. *yaltirikiana* Alptekin
- 4) *Pinus pinea* L.
- 5) *Pinus sylvestris* L., var. *elcinii* Kandemir & Mataracı, var. *hamata* Steven, var. *hamata* f. *compacta* Kandemir & Mataracı, var. *hamata* f. *hamata* Steven

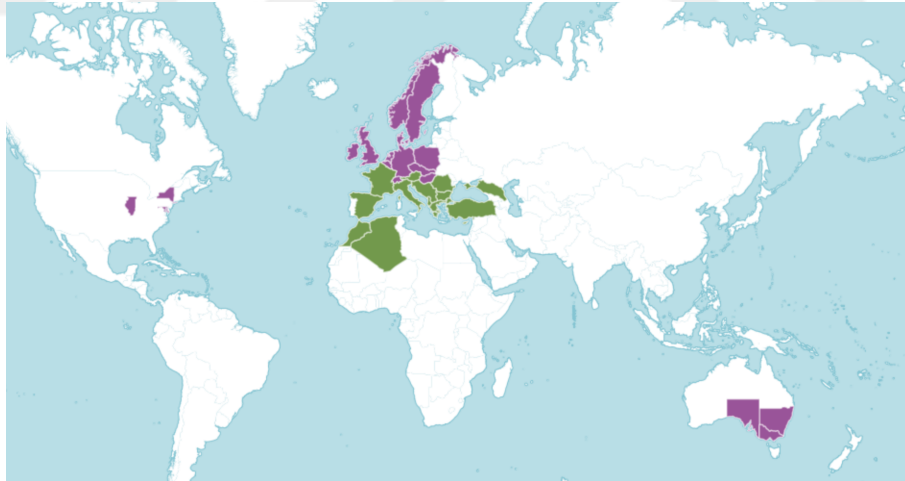
Yüzyıllar boyunca *Pinus* türleri farklı alanlarda kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir. *Pinus* türlerinden reçine, terebentin, çam yağı, tar gibi çeşitli ürünler elde edilmektedir. Çam ağacının kabuğunun yaralanmasıyla ortaya çıkan, geleneksel

olarak kullanılan oleoresin uçucu bileşenlerce (mono ve seskiterpenler) zengindir (Rezzi vd., 2005). Elde edilen çam ağacı ürünleri etnobotanik olarak antiseptik, tonik, ekspektoran, genellikle üst solunum yollarında, haricen romatik ağrılarda ve cilt hastalıklarında kullanılmıştır (Ari vd., 2014; Menković vd., 2011).

Pinus türlerinin uçucu yağları aynı zamanda kozmetikte parfüm, parfüm kimyasallarının sentezinde, yiyecek ve içecekler için aroma katkı maddeleri olarak da kullanılmaktadır (Rezzi vd., 2005). Ek olarak *P. sylvestris*, *P. pinea*, *P. nigra* ve *P. brutia* uçucu yağlarının yapılan çalışmalarla antimikrobiyal etkinlikleri kanıtlanmıştır (Dığrak vd., 1999; Esen ve Dığrak, 2009).

2.2.1. *Pinus nigra* JF Arnold

Avrupa Karaçamı veya karaçam olarak bilinen *P. nigra* geniş fakat parçalı bir gövdeye sahip, yaprak dökmeyen, yaprakları iki iğneli kozalaklı bir ağaçtır. Avrupa ve Asya başta olmak üzere ağırlıklı olarak dağlık bölgelerde dağılım göstermektedir (Görsel 2.2) (Sezik vd., 2010).



Görsel 2. 3. *P. nigra*'nın doğal habitatı

P. nigra 40 metreye kadar boylanabilen, dış kabuğu genç dönemde kül grisi veya gümüşü renktedir. Yetişkinlikte kabuk rengi koyu kestane rengine dönerken dallar kırmızımsı veya turuncu renktedir. Yapraklar asikular, genellikle 6-16 cm uzunluğunda, esnek ve dikenli olmayan çiftler halindedir. Kozalakları yaklaşık 4-8 cm uzunluğunda olup sapları çok kısa veya yoktur (Enescu vd., 2016).



Görsel 2. 4. *Pinus nigra* JF Arnold gövde, yaprak ve kozalak (http-3)

2.2.2. *Pinus nigra* etnobotanik kullanımı

İnsanlık tarihi boyunca çam türleri geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Farklı ülkelerde yapılan etnobotanik araştırmalar sonucunda çam türleri solunum problemlerinde, cilt hastalıklarında, soğuk algınlığında, diyabette, romatizma ağrılarında ayrıca vitamin kaynağı olarak da kullanılmıştır (Kızıllarslan ve Sevgi, 2013; Papp vd., 2022).

Pinus cinsine ait türlerin tıbbi kullanımına ilişkin bilgilerden Materia Medica'da bahsedilmiştir. *P. nigra*'nın kozalağı, reçinesi ve sürgünleri tıbbi amaçla farklı preparatlarda kullanılmıştır. Reçinesi cilt bozuklukları ve diş çürüklerinin tedavisinde kullanılırken, iğne yapraklarının infüzyonu solunum yolları rahatsızlıklarında kullanılmıştır (Günbatan vd., 2016; Papp vd., 2022).

Karaçam katranının haricen skabies tedavisinde de kullanıldığı görülmüştür. Yapılan etnobotanik çalışmalarında *Pinus* türlerinin ve özellikle *P. nigra* katranının Anadolu'daki hayvanları çeşitli parazit ve böceklerden korumaya yönelik etkili tedavi yöntemi olduğu gözlemlenmiştir. Türk halk hekimliğinde *P. nigra*'nın reçinesi haricen yara iyi edici olarak kullanılmıştır (Polat ve Satıl, 2012).

2.2.3. Uçucu yağının fitokimyasal bileşenleri

Karaçam uçucu yağları fitokimyasal olarak zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Tablo 2.2'de belirtildiği üzere *P. nigra* iğne yapraklarından elde edilen uçucu yağın ülkeler bazında majör bileşenler belirtilmiştir.

Tablo 2. 2. *P. nigra* uçucu yağının ülkeler bazında majör bileşenleri

Ülke	Majör bileşenler	Referans
Cezayir	β -karyofilen (%26,2), germakren D (%17,2), α -pinen (%9,4)	Adjaoud vd.,2022
İtalya	α -pinen (%29,4), germakren D (%21,2), β -karyofilen (%16,2)	Macchioni vd., 2003
Kanada	Asetik asit (%31,12), bisiklo[2.2.1]heptan-2-on (%21,45), Limonen (%8,06)	Kılıç vd, 2014
Kosova	α -pinen (%28,79), germakren D (%11,86), limonen (%8,47)	Kurti vd., 2019
Sırbistan	α -pinen (%43,6), germakren D (%29,8)	Şarac vd., 2013
Türkiye	α -pinen (%45,36), karyofilen oksit (%8,05), β -karyofilen (%6,35)	Tumen vd.,2010
	α -pinen (%22,2–43,18), β -pinen (%22,4–34,1)	Sezik vd., 2010

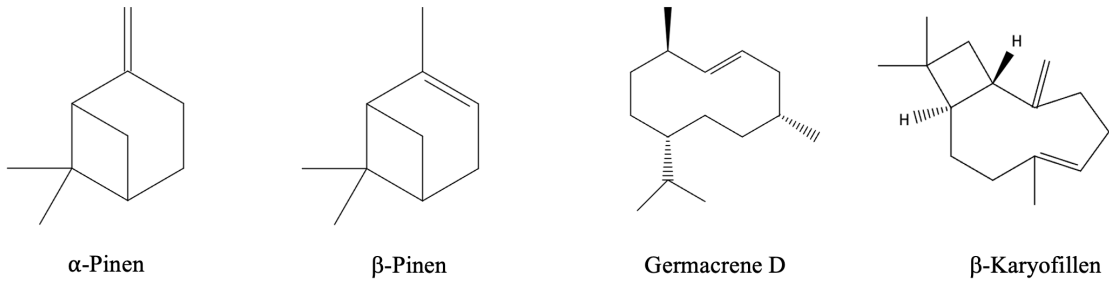
Türkiye'nin belli bölgelerinde bulunan *P. nigra* uçucu yağlarının içeriğinde yüksek miktarda α -pinen (%22,2–43,18) ve β -pinen (%22,4–34,1) tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda yapılan analizler sonucunda β -karyofilen, Türkiye'de bulunan karaçam uçucu yağının karakteristik bileşeni olarak tespit edilmiştir (Sezik vd., 2010).

Kurti ve çalışma arkadaşları, *P. nigra* uçucu yağ bileşenlerinin tespiti için yaptıkları çalışmada toplam 50 tane bileşen tespit etmişlerdir. Baskın olarak α -pinen (%44,98) ve β -pinen (%14,27) bulunurken, majörlerin yanı sıra germakren D (%9,63), limonen (%6,93) ve β -karyofillen (%5,58) içerdiği de belirtilmiştir (Kurti vd., 2019).

Türkiye'de yetişen *P. nigra* iğne yapraklarının uçucu yağının incelendiği başka bir çalışmada α -pinen (%45,36) ana bileşen olarak belirtilmiştir. Ayrıca karyofilen oksit (%8,05) ve β -karyofilen (%6,35), α -pinen'den sonra daha fazla miktarda tespit edilmiş uçucu bileşenlerdir (Tumen vd., 2010). Cezayir'de yetişen karaçam bitkisinin uçucu yağ analizinde β -karyofilen (%26,2) ana bileşen olarak tespit edilirken, diğer bileşenler de germakren D (%17,2) ve α -pinen (%9,4) olarak belirtilmiştir (Adjaoud vd.,2022). Şarac ve arkadaşları, Sırbistan'da yetişmekte olan *P. nigra* bitkisinin iğne yapraklarından elde ettikleri uçucu yağının ana bileşenlerinin analizini yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda β -karyofilen (%26,2), germakren D (%17,2) ve α -pinen (%9,4) ana bileşenler olarak bulunmuştur (Şarac vd., 2013).

Pinus türlerinin kozalak, iğne yaprakları ve dallarından elde edilen uçucu yağlarının verim ve kimyasal bileşiminin analizi yapılmıştır. *P. nigra*'da iğne yapraklarından (%28,4), kozalak (%49,5) ve dallardan (%61,7) uçucu yağ elde

edilmiştir. İğne yapraklarından elde edilen uçucu yağın ana bileşiği germakren D (%21,2) ve β -karyofillen (%16,2) iken, dallarda bu bileşiklerin her ikisi de oldukça düşük miktarlarda (%0,5) tespit edilmiştir. Kozalakların uçucu yağında, ikinci ana bileşik sandaracopi-maradien (%4,8) olarak bulunmuştur (Macchioni vd., 2003). Yapılan başka bir *P. nigra*'nın kozalaklarından elde edilen uçucu yağ analizinde ana uçucu bileşenler monoterpen hidrokarbonlardan α -pinen (%27,06) ve β -karyofilen (%11,03) olarak bulunmuştur (Kozan vd., 2019). Buna karşılık Kılıç ve Koçak yaptıkları çalışmada Kanada'da yetişen *P. nigra* bitkisinin uçucu yağındaki ana bileşenlerinin asetik asit, kafur ve borneol olduğu bildirilmiştir (Kılıç ve Koçak, 2014). Literatür taramaları doğrultusunda karaçam bitkisinin kozalak, iğne yaprakları ve dal uçlarından elde edilen uçucu yağlarının ana bileşenleri α -pinen, germakren D ve β -karyofilen olarak bulunmuştur (Amri vd., 2017).



Şekil 2. 2. *Pinus nigra*'da uçucu yağında bulunan bazı ana bileşiklerin yapıları

2.2.4. Biyolojik aktiviteleri

2.2.4.1. Antimikrobiyal aktivite

İnsandan izole edilmiş 9 tane çoklu dirençli bakteriyel suşa karşı *P. nigra* uçucu yağının etkinliği denenmiştir. Bu çalışmada, *P. nigra* uçucu yağının diğer *Pinus* türlerinin uçucu yağlarına göre antimikrobiyal etkisinin düşük olduğu bulunmuştur (Mitic vd., 2018).

Daha önceden yapılmış bir çalışmada mikrodilüsyon metodu kullanarak *P. nigra* uçucu yağının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi denenmiştir. Etkililiği test edilen mikroorganizmalara karşı MİK değerleri 0,5-4,1 mg/mL aralığında bulunmuştur (Rosato vd., 2018).

Demirci ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmaya göre ise, farklı dönemlerde toplanmış, *P. nigra* iğne yaprakları ve kozalaklarından elde edilen uçucu

yağının Gram pozitif ve Gram negatif 6 mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Nisan döneminden toplanıp elde edilmiş uçucu yağın *K. pneumonia* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkinlik gösterirken, Haziran döneminde toplanıp elde edilmiş uçucu yağların tüm mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bulunmuştur (Demirci vd., 2020).

2.2.4.2. Antioksidan aktivite

Adjaoud ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DPPH•, ABTS•, ve β -karoten gibi metotlar kullanarak *P. nigra* uçucu yağının antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda *P. nigra* uçucu yağının zayıf antioksidan etki gösterdiği rapor edilmiştir (Adjaoud vd., 2022)

Yapılan başka bir çalışmada, *P. nigra* uçucu yağının antioksidan aktivitesi FRAP, DPPH•, ve TBARS yöntemleri ile test edilmiştir. Çalışma sonunda uçucu yağın antioksidan aktivitesi tespit edilememiştir. Aktivitenin tespit edilememiş olmasının sebebinin fenol ana bileşenlerinde fenol içermeyen monoterpenlerin sorumlu olabileceğini savunulmuştur (Politeo vd., 2011).

Çeşitli *Pinus* türlerinin iğne yapraklarından elde edilen uçucu yağların antioksidan potansiyelleri test edilmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitli metotlar ile *P. nigra* türüne ait uçucu yağının düşük DPPH•, süpürücü aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Koutsaviti vd., 2021).

Kurti ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, *P. nigra* uçucu yağının DPPH•, metodu ile antioksidan kapasiteleri test edilmiştir. Çalışmada bulunan diğer *Pinus* türlerine göre *P. nigra* uçucu yağının antioksidan aktivitesi düşük bulunmuştur (Kurti vd., 2019).

2.2.4.3 Antifungal aktivite

Sarac ve çalışma arkadaşları, *P. nigra* uçucu yağı ile *A. niger* ve *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite çalışması yapmışlardır. İğne yapraklarından elde edilen uçucu yağın 5-10 mg/mL dozları arasında *A. niger*'e karşı daha yüksek hassasiyet gösterdiği bulunmuştur (Sarac vd., 2014).

Yapılmış olan başka bir çalışmada *P. nigra* uçucu yağının antifungal aktivitesi

5 fungus (*Bipolaris sorokiniana*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum* ve *Fusarium culmorum*) üzerinde test edilmiştir. Büyüme inhibisyonu %77,01 ile *F. graminearum* 'a karşı görülmüştür. Ana bileşenleri hidrokarbon monoterpen olan *P. nigra* uçucu yağının antifungal etkinliği nispeten yüksek bulunmuştur (Amri vd., 2022).

2.3. Uçucu Yağların Kombinasyon Çalışmaları

Uçucu yağlar ve doğal ürünler içerisinde bulunan sekonder metabolitler, sentetik yollar ile üretilen konvensiyonel ilaçlara göre doğal kombinasyonlardır. Kombinasyon çalışmalarında temel amaç en düşük dozda yüksek etkinlik ve dolayısıyla düşük toksisite ile tedavinin advers etkilerinin azaltılmasıdır. Antimikrobiyal etkili kombine tedavilerde, monoterapide gelişen direncin önüne geçmesinin yanı sıra azaltılmış dozun toksisitesinin de düştüğü birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Diğer avantajı ise geniş bir antimikrobiyal spektrum sağlamasıdır (Hemaiswarya vd., 2008; Wagner ve Ulrich-Merzenich, 2009; Williamson, 2009).

Uçucu yağların patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteleri birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Sentetik ilaçların patojenlere karşı direnç geliştirmesi gibi sonuçlar doğrultusunda uçucu yağların kombine edilmesi yeni alternatif tedavi şekilleri oluşturmaktadır. Uçucu yağların inhibitör hedefli etkileri ve direnç oluşumunun önüne geçebilmesi, uçucu yağlarla ve antimikrobiyal maddelerle kombine kullanımlarında gelecek vadede potansiyel olduğu belirtilmiştir (Ju vd, 2022). Uçucu yağların antibiyotiklerle sinerjisinin, suşlar tarafından kazanılmış antimikrobiyal direncin önüne geçebileceği düşünülmektedir (Vuuren vd., 2009).

Karadağ ve diğerlerinin yaptığı bir uçucu yağ sinerji çalışmasında, Avrupa Farmakopesi kalitesinde *Lavandula angustifolia* L. ve *Foeniculum vulgare* Mill. uçucu yağlarının birbirleri ve amoksisilin ile kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivite çalışmaları test edilmiştir. *E. coli* ve *E. faecalis* patojenlerine karşı *F. vulgare*- amoksisilin kombinasyonu sinerjik etki göstermiştir (Karadağ vd., 2022). Daha önceden yapılmış başka bir çalışmada, *Pelargonium graveolens* L'Hér. uçucu yağı ile norflaksasin kombinasyonunun aktivitesine bakıldığında, *S. aureus* ve *B. cereus*'a karşı sinerjik etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Rosato vd., 2007).

Uçucu yağlar ve bileşenlerinin, beta-laktam antibiyotiklerle kombinasyonları

üzerine yapılan bir çalışma sonucunda, kombinasyonlarda sinerjik etki bulunmuştur. Örneğin, kekik bileşeni olan timolün, *Esheria coli*'ye karşı penisilin ile kombinasyonu belirli bir dozda sinerjik göstermiştir. Ancak başka bir çalışmada, *Origanum onites* L. ve majör bileşeni olan karvakrol ile kombine edilen penisilin, *E. coli*'ye karşı sinerjik bulunmamıştır (Langeveld vd., 2014).

İkili uçucu yağ kombinasyonunu konu alan çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda yapılan *T. serpyllum* uçucu yağının *Origanum majorana* L. ile kombinasyonları *S. aureus* ve *E. coli* patojenlerine karşı denenmiştir. İki uçucu yağın kombinasyonlarının her iki patojene karşı kısmi sinerji etkisi gözlemlenmiştir (Ouedrhiri vd., 2017). Önceden yapılmış *T. serpyllum* ile *Myrtus communis* L. ve *Artemisia herba-alba* Asso uçucu yağlarının kombinasyonlarının *S. aureus*'a karşı sinerjik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ouedrhiri vd., 2022).

Literatürde uçucu bileşenlerin çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının aktivite çalışmaları yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılmış olan bir çalışmada ampisilin, amoksisilin ve klaritromisin gibi çeşitli antibiyotiklerin geraniol ile kombinasyonları *E. coli*, *Helicobacter pylori* ve *S. aureus* patojenlerine karşı değerlendirmiştir. Geraniol ile amoksisilin ve klaritromisin kombinasyonları *H. pylori* suşuna karşı sinerjik aktivite göstermiş olup ülser enfeksiyonunun tedavisi için potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği tespit edilmiştir (Bhattamisra vd., 2018). Ayrıca antimikrobiyal etkinliği olmayan *p*-simen, karvakrol'un antimikrobiyal aktivitesini artırıcı etkisi kanıtlanmıştır (Ultee vd., 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan uçucu yağ ve standart maddeler

Farmakope kalitesinde olan *T. serpyllum* L. ve *P. nigra* J.F. Arnold uçucu yağları Orlife Global firmasından temin edilmiştir. Standart madde olarak kullanılan α -pinen (%99) ve geraniol (%97) belirtilen saflıkta Sigma Aldrich firmasından ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.2. Antibakteriyel ilaç etken maddeleri

Kombinasyon deneylerinde ve antimikrobiyal deneylerin pozitif kontrol maddeleri olarak kullanılan farmakope kalitesindeki standart antimikrobiyal maddeler (Amoksisilin, siproflaksasin ve kloramfenikol) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan maddeler ve çözücüler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Marka
Agar	Neogen
Dimetilsülfoksit	Honeywell
Etanol	Sigma-Aldrich
Etilasetat	Sigma-Aldrich
Hekzan	Sigma-Aldrich
Mueller-Hinton Broth (MHB)	Sigma-Aldrich
Muller-Hinton Agar	Sigma-Aldrich
NaCl	Zag Kimya
Resazurin tuzu	Sigma-Aldrich
Tetrazolyum tuzu	Sigma-Aldrich
MTT [3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]	Serva
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) – low glucose	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin 10,000U/mL	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 Kullanılan sarf malzemeleri

Hazır İTK plakları (İTK-Silikajel 60 F₂₅₄, Merck), cam Pastör pipetleri, tek kullanımlık plastik kapaklı Petri (90 mm x25 ve 150 mm, ISOLAB), tek kullanımlık plastik mikropipet uçları (1000, 100, 10 µL), 96 kuyucuklu 'U' tipi steril mikroplateler kullanılmıştır.

3.1.5 Kullanılan cihazlar ve aletler

Deneyisel çalışmalarda kullanılmış cihaz ve aletler Tablo 3.2.'de belirtilmiştir.

Tablo 3. 2. Deneylerde kullanılan cihaz ve aletler

Adı	Markası
Analitik terazi	Mettler Toledo
Bakteriyel Etüv	MMM Inocucell
Otoklav	Hirayama, HV-50
Gaz-Kromatografisi	Agilent 6890 N GC
Gaz-Kromatografisi / Kütle Spektroskopisi	Agilent 5975 GC-MSD
Sınıf 2 Biyolojik güvenlik kabini	Esco global
Ultraviyole lamba	Camag
Otomatik ve multikanal pipetör seti	Eppendorf
Pulverizatör	Isolab
CO ₂ inkübatörü	Esco global
Mikroplate okuyucu	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	ESCOGLOBAL

3.1.6 Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Kullanılan mikroorganizmalar Tablo 3.3.'de görülmektedir.

Tablo 3. 3. Deneyisel çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma/ Kaynak	
<i>Bacillus cereus</i> NRRL B-3711	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-4378	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA44
<i>Escherichia coli</i> NRLL B-3008	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	<i>Streptococcus mitis</i> NCIMB 13770
<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 23245	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25125

3.1.7. Uçucu yağların analiz koşulları

T. serpyllum ve *P. nigra* uçucu yağlarının farmakope uygunluğunun analizi için GK/KS sistemi kullanılmıştır.

GK/KS Sistem: Agilent 5975 GC/MSD

Dedektör: 300 °C, FID

Kolon: HP-Innowax (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)

Taşıyıcı gaz: Helyum (0.8 mL. dk⁻¹)

Enjeksiyon portu sıcaklığı: 250 °C

Dedeksiyon aralığı: 70 eV

Sıcaklık Programı: 60 °C’de 10 dk, 4 °C/dk artışla 300 °C’ye çıkan, 300 °C’de 5 dk bekleme ile toplam 65 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır.

3.2. *In vitro* Yöntemler

3.2.1. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

In vitro antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI) broth mikrodilüsyon metodu ile uçucu yağların Tablo 3.3’ de yer alan mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) hesaplanmıştır.

Mikroorganizmalar 2-8°C’de saklanmıştır ve stok kültürler -85°C’de muhafaza edilip ihtiyaç halinde steril koşullar altında canlandırma işlemi yapılmıştır. Bakteri suşlarını aktive etmek için Muller-Hinton Agar (MHA) besi yeri kullanılmıştır. Hazır olarak temin edilen besi yeri paket üzerinde yazan talimatlara göre hazırlanmıştır ve pH kontrolü yapılarak 121 °C’de 20 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir. Besi yerinin sıcaklığı 50°C’ye inmesinin ardından Petriler 20 mL olacak şekilde dökülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde Mueller-Hinton Broth (MHB) besi yeri kullanılmıştır. Hazır olarak temin edilen besi yeri orijinal ambalajındaki tarife uygun olarak hazırlanmıştır. 121 °C ve 1.1 atmosfer basıncı altında 20 dakika boyunca steril hale getirilmiştir ve soğuduktan sonra kullanılabilecek kadar +4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

Tez çalışmaları kapsamında antimikrobiyal standart ilaç etken maddeleri amoksisillin, siproflaksasin ve kloramfenikol kullanılmıştır. Toz formda temin edilen ilaç etken maddelerinin başlangıç kuyucuk konsantrasyonu amoksisillin 1 µg/mL, siproflaksasin 8 µg/mL ve tetrasiklin 8 µg/mL olacak şekilde stokları hazırlanmıştır.

Ticari olarak temin edilen uçucu yağların ilk kuyucuktaki konsantrasyonunun 1 mg/mL ve dimetilsülfoksit (DMSO) konsantrasyonunun %1 olacak şekilde stok hazırlanmıştır. Antimikrobiyal çalışmalarda standart uçucu bileşenlerin ilk kuyucuk konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.

96’lı ‘U’ tipi steril mikrolateler kullanılarak deneyler yapılmıştır. MİK değerlerinin tespiti için uçucu yağlar ve standart maddeler üç tekrarlı olarak 1’den 12’ye kadar olan satıra eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 100 µL MHB besi yerinden eklenmiştir.

İlk satıra 50 µL MHB besi yeri ilave olarak eklenmiştir. İlk kuyucuğa konsantrasyonu ayarlanan 50 µL uçucu yağ veya standart madde eklenmiştir. Tüm işlemler sonunda ilk kuyucuktan 100 µL alınıp maddenin çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

Bakteri süspansiyonun hazırlanması: Tablo 3.3'te yer alan mikroorganizma suşları - 80°C'den testin 48 saat öncesinde çıkarılıp oda ısısına geldikten sonra Mueller Hinton Agar besiyerine pasajlanmıştır ve 35 ± 2 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Steril NaCl (%0,85) çözeltisine 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/mL) değerinde olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır Kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere tüm kuyucuklara 50 µL bakteri süspansiyonu eklenmiştir.

Plaklar 35 ± 2 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından %1 konsantrasyonla hazırlanmış resazurin çözeltisinden 10 µL tüm kuyucuklara eklenmiş ve plaklar 35 ± 2 °C'de 3 saat daha inkübatörde tutulmuştur. Üreme varlığında eklenen resazurin mavi renkten pembe renge dönüşmektedir. İnkübasyon sonunda resazurin yardımıyla MİK değerleri görsel olarak değerlendirilmiştir. Üremenin gözlemlenmediği en düşük madde konsantrasyonu o maddenin çalışılmış mikroorganizmadaki MİK değeri olarak belirlenmiştir (CLSI, 2012).

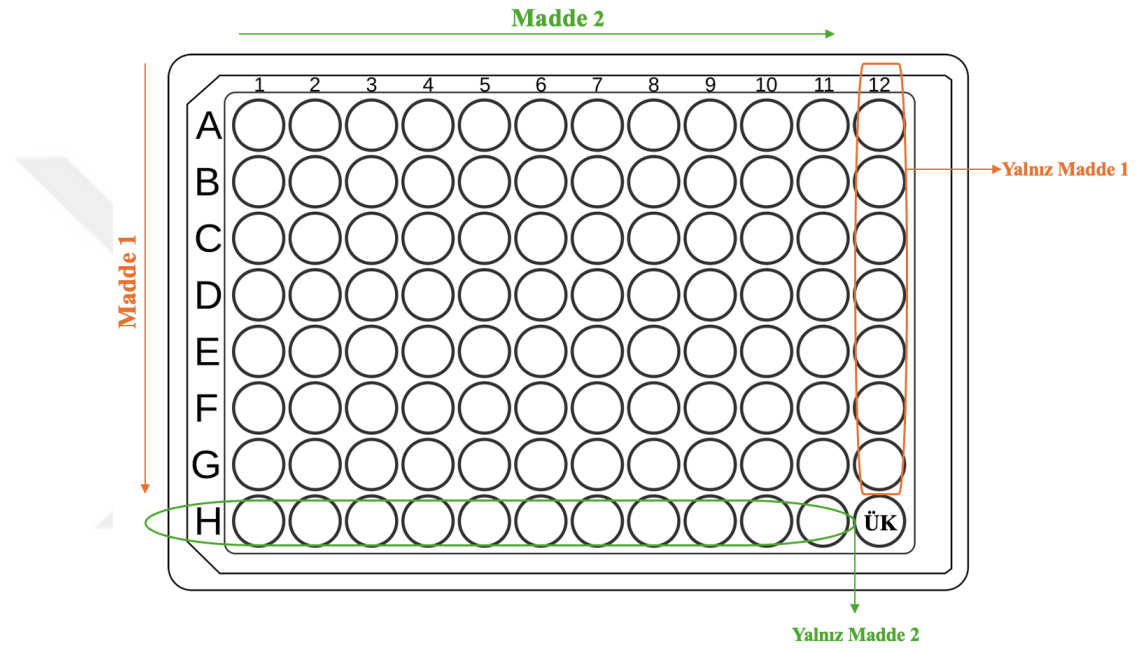
3.2.2. Dama tahtası yöntemi

Dama tahtası yöntemi 96 kuyucuklu mikropate kullanılarak iki antimikrobiyal ajanın kombinasyonu sonucunda birbirlerinin antimikrobiyal etkinliklerine etkilerinin test edilmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Uygulama kolaylığı ve değerlendirme yöntemlerinin basit olması sebebiyle en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Her kombinasyon için ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) indeks hesabı yapılarak belirlenir. Kombinasyonları sinerji etkinlikleri dama tahtası yöntemi kullanılarak incelenmiştir. (Van Vuuren VD., 2009)

Deneyisel çalışmada kombinasyonlar uçucu yağ-uçucu yağ, uçucu yağ-antimikrobiyal ajan ve uçucu ana bileşen-uçucu ana bileşen olarak tasarlanmıştır. Uçucu yağların kuyucuktaki başlangıç konsantrasyonları 1 mg/mL, siproflaksasin 8 µg/mL, amoksisilin 8 µg/mL, tetrasiklin 8 µg/mL ve majör bileşenler 10 µg/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Kombinasyondaki maddeler en yüksek konsantrasyon A satırında sütun

1'den 12'ye kadar aynı konsantrasyonda madde içerecek şekilde 50 µL pipetleme yapılmıştır. A satırından başlanarak G satırına kadar çift kat seri dilüsyon yapılmıştır.

Kombinasyondaki diğer madde 1 nolu sütunda aynı konsantrasyonda madde olacak şekilde 50 µL pipetleme yapılmıştır. 1 nolu sütundan 11 nolu sütuna kadar çift kat seri dilüsyon yapılmıştır. Plağın H12 kuyucuğu üreme kontrolü (ÜK) olarak belirlenmiştir.



Görsel 3. 1. Dama tahtası uygulama detayları

Kombinasyon plakları hazırlandıktan sonra tüm kuyucuklarda bakteri konsantrasyonu 0,5 McFarland olacak şekilde MHB ile seyreltilerek hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50 µL pipetleme yapılmıştır. 35 ± 2 °C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından %1 konsantrasyonla hazırlanmış resazurin çözeltisinden 10 µL tüm kuyucuklara eklenmiş ve plaklar 35 ± 2 °C'de 3 saat daha inkübatörde tutulmuştur. Üreme varlığında eklenen resazurin mavi renkten pembe renge dönüşmektedir. İnkübasyon sonunda resazurin yardımıyla kombinasyonların etkileri görsel olarak değerlendirilmiştir.

Kombinasyondaki maddelerin etkilerinin değerlendirilmesinde fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon (FİK) indisi kullanılmıştır. Kombinasyon halinde maddenin üreme olmayan kuyucuktaki en düşük konsantrasyonun tek başına aynı

mikroorganizmaya karşı belirlenen MİK değerine bölünmesi ile FİK değeri hesaplanmıştır (Van Vuuren vd., 2009).

$FİK1 = \text{Madde 1'in kombinasyondaki MİK değeri} / \text{Madde 1'in tek başına MİK değeri}$

$FİK2 = \text{Madde 2'nin kombinasyondaki MİK değeri} / \text{Madde 2'nin tek başına MİK değeri}$

$$FİKİ = FİK1 + FİK2$$

$FİKİ \leq 0.5 = \text{Sinerjik etki}$

$0.5 < FİKİ \leq 1 = \text{Aditif etki}$

$1 < FİKİ < 4 = \text{Bağımsız etki}$

$FİKİ \geq 4 = \text{Antagonist etki}$

FİKİ hesaplamaları sonucunda yukarıda belirtilen aralıklara göre kombinasyonların etkinlikleri tespit edilmiştir.

Sinerjik etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında, tek başlarında kullanıldığından elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki elde edilmesidir. Aditif etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen etkinin, tek başlarına kullanıldığında elde edilen etkiler toplamına eşit olmasıdır. Bağımsız etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen sonucun en etkili test materyalinin tek başına kullanıldığında elde edilen sonuçtan farklı olmadığı durumlardır. Antagonist etki, test materyallerinin kombinasyon halinde kullanıldığında elde edilen etkinin, test materyallerinin tek başına yaptığı etkiden daha az olması durumudur (Van Vuuren vd., 2009).

3.3.3. Biyootografi yöntemi

3.3.3.1. İnce tabaka kromatografisi (İTK) sistemi

Alüminyum plak üzerinde 0.2 mm kalınlığında 60 F₂₅₄ (Merck) silikajel adsorbanıyla kaplanmış olan 20 x20 cm hazır olarak temin edilen kromatografi plakları 8x8 cm ebatlarına getirilerek kullanılmıştır. Plaklar oda sıcaklığında karanlık ve nemsiz kutularda saklanmıştır. Kılcal boru ile 20 mg/mL etanolde çözündürülen uçucu yağ stokları 10 µL olacak şekilde plaklara uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol

(128 µg/ml) İTK plağına 10 µL tatbik edilmiştir. 9:1 (h/h) oranında hekzan: etilasetat çözücü sistemi hazırlanarak İTK plaklarından biri referans seçilerek çözücü sisteminde yürütülmüştür. Çözücü sisteminden alınan plaklardan bir tanesi biyootografi deneyi için bekletilirken diğer plaktan çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra 254 ve 364 nm dalga boylarında incelenmiştir. UV altında aktif spotlar işaretlenip, UV absorpsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesi adına renk reaktifi olan anisaldehit/H₂SO₄ çözeltisi ile reaksiyon sonucu etüvde 110 °C’de 3 dakika ısıtılmıştır.

3.3.3.2. Besi yerlerinin hazırlanması ve aşılınması

Bu çalışmada kullanılan MHA ve MHB hazır olarak temin edildiği kutu üzerindeki tarife uygun hazırlanmıştır. Plağın üzerinde direk olarak temas edecek olan yumuşak (molten) agar 1000 mL’de 21 g MHB ve 15 g agar içerecek şekilde hazırlanmıştır. Uzun tüplerde 9 mL molten agar olacak şekilde bölünmüştür. 121 °C’de 20 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir. Otoklavlandıktan sonra molten agarın donmaması için aşılana kadar 42°C’de su banyosunda bekletilmiştir.

Önceden otoklavlanmış ve steril hale getirilmiş %0,085 NaCl 0,5 McFarland mikroorganizma içerecek şekilde aşılır. Mikroorganizmalı %0,085 NaCl’den 1 mL alınarak su banyosunda bekletilen belirli bir sıcaklığa düşen molten agara eklenmiştir.

3.3.3.3. Aktivite belirlenmesi

15 cm’lik steril petri kaplarına taban oluşturacak kadar MHA besi yeri dökülmüştür. Develope edilen plaklar asetik şartlar altında her bir mikroorganizma için ayrı plaklara yerleştirilmiştir. Aşılana molten agarlar çok ince katman oluşturacak şekilde dikkatlice petriye dökülmüştür. Donan plaklar 37°C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda plaklara TTC tuzu çözeltisi (Distile suda %1) püskürtülerek 3 saat daha inkübatörde bırakılmıştır. Üremenin gözlenmediği alanlar şeffaf zon olarak belirlenmiştir. Öncesinde anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile reaksiyonu hazırlanmış referans plakla karşılaştırma yapılarak aktiviteden sorumlu spotlar belirlenmiştir.

3.3.4. MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]

HEK293 hücre hattı kullanarak proliferasyon potansiyelleri belirlenmiştir. Hücre canlılığı üzerine etkinin değerlendirilmesinde, enzimatik bir test olan MTT [3-(4,5-

dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi kullanılacak ve canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanmıştır. Hücreler %10 FBS (Gibco, ABD) ve %1 penisilin/streptomisinle (Gibco, ABD) tamamlanmış DMEM (Gibco, İngiltere) ile %5 CO₂ ve 37°C’de kültür edilmiştir.

Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde yapılmış olup hücrelerin inkübasyonu için 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan bir etüv kullanılmıştır.

Maddelerin HEK293 hücre hattındaki etkileri belirtilen inkübasyon zamanından sonra MTT besi ortamı ile karıştırılarak konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µL MTT solüsyonu eklenmiştir. Plakalar 37°C’de 2 saat inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak, hücre içinde depolanan MTT formazanı açığa çıkarmak için 100 µL izopropanol kullanılmıştır. Her kuyucuğun absorbans değeri 570 nm dalga boyunda mikropate okuyucu ile ölçülerek canlı hücre sayısı belirlenmiştir. %20’lik dimetilsülfoksit (DMSO) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Toksisite deneyi sonucunda % hücre canlılığı kontrol grubu ile karşılaştırılarak %70’den daha düşük görelî hücre canlılığı olan dozlar sitotoksik kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE YORUM

4.1. Uçucu Yağların Fitokimyasal Analiz Sonuçları

Ticari olarak temin edilmiş *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının fitokimyasal analizleri Gaz Kromatografisi ile yapılmıştır. Ana bileşenler sırası ile *P. nigra* uçucu yağı için α -pinen (%73,8), trans-verbenol (%4,4), trans-pinokarveol (%2,0), α -pinen oksit (%2,0) çıkarken; *T. serpyllum* uçucu yağı için geraniol (%19,3), *p*-simen (%12,9), α -tuyon (%6,6), linalool (%6,4), karvakrol (%5,7), geranil asetat (%5,7), kafur (%3,7), timol (%3,3), terpinen-4-ol (%2,5) ve β -karyofillen (%2,3) bulunmuştur. Uçucu yağ analizinde elde edilen tüm bileşiklerin detaylı sonuçları ile Tablo 4.1’de (EK-1) verilmiştir.

Tablo 4. 1. *P. nigra* ve *T. serpyllum* uçucu yağ bileşenleri

RRI	Bileşikler	<i>P. nigra</i> %	<i>T. serpyllum</i> %
1032	α -Pinen	73,8	1,2
1035	α -Tujen	-	0,4
1076	Kamfen	1,7	1,7

Tablo 4. 2. (Devam) *P. nigra* ve *T. serpyllum* uçucu yağ bileşenleri

1118	β -Pinen	1,4	0,4
1132	Sabinen	-	0,1
1135	Tuyon-2,4(10)-dien	0,1	-
1174	Miseren	-	0,7
1188	α -Terpinen	-	0,6
1203	Limonen	1,7	-
1213	1,8-Sineol	-	1,3
1255	γ -Terpinen	-	1,8
1265	3-Oktanon	-	0,3
1280	<i>p</i> -Simen	0,1	12,9
1298	Terpinolen	-	0,2
1382	<i>cis</i> -Alloosimen	-	-
1384	α -Pinen oksit	2,0	-
1437	α -Tuyon	-	6,6
1439	γ -Kamfolen aldehit	0,1	-
1451	β -Tuyon	-	2,2
1452	1-Okten-3-ol	-	0,1
1452	α - <i>p</i> -Dimetil sitren	-	0,1
1499	α -Kamfolen aldehit	0,1	-
1532	Kamfor	-	3,7
1535	β -Bourbonen	0,3	-
1536	Pinokampon	0,1	-
1553	Linalol	-	6,4
1556	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-	-
1565	Linalil asetat	-	0,5
1571	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	0,1
1586	Pinokarvon	0,2	-
1590	Bornil asetat	-	0,5
1604	Timol metil eter	-	0,5
1611	Terpinen-4-ol	-	2,5
1612	β -Karyofillen	-	2,3

Tablo 4. 3. (Devam) *P. nigra* ve *T. serpyllum* uçucu yağ bileşenleri

1614	Karvakrol metil eter	-	1,9
1638	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	0,1
1648	Mirtenal	0,4	-
1662	Pulegon	-	0,2
1670	<i>trans</i> -Pinokarveol	2,0	-
1683	<i>trans</i> -Verbenol	4,4	-
1687	α -Humulen	-	1,6
1694	Neral	-	0,2
1706	α -Terpineol	-	0,9
1709	α -Terpinil asetat	-	0,5
1715	Geranil format	-	4,3
1719	Borneol	-	0,7
1725	Verbenon	1,6	-
1726	Germakren D	-	0,2
1740	Geranial	-	1,0
1741	β -Bisabolen	-	0,1
1751	Karvon	0,2	-
1784	(<i>E</i>)- α -Bisabolen	-	1,0
1793	α -Kamfolen alkol	-	-
1795	Geranil asetat	-	5,6
1804	Mirtenol	0,8	-
1808	Nerol	-	0,5
1845	<i>trans</i> -Karveol	0,1	-
1857	Geraniol	-	19,3
2008	Karyofillen oksit	-	0,5
2071	Humulen epoksit II	-	0,4
2104	Viridiflorol	-	2,0
2198	Timol	-	3,3
2239	Karvakrol	-	5,7
Toplam		92,0	97,2

Ticari olarak temin edilen *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağının Tablo 4.1’de belirtildiği üzere ayrıntılı fitokimyasal analizinin ana bileşenleri sırasıyla geraniol ve α -pinen olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada *T. serpyllum* uçucu yağı geraniol kemotipine ait olduğu tespit edilmiştir (Preljevic vd., 2024). Çalışmamızda kullanılan *T. serpyllum* uçucu yağının majör bileşeni Avrupa Farmakopesi ve ESCOP’ta bulunan verilerle uyuşmamaktadır. Farmakope kalitesinde olmayan *T. serpyllum* uçucu yağının litaretürdeki kemotipleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

P. nigra uçucu yağının ana bileşeni olarak tespit edilen α -pinen, literatürde bulunan çalışmalar doğrultusunda *P. nigra* uçucu yağının karakteristik bileşeni olduğu bilinmektedir (Kurti vd., 2019). Türkiye ve dünyada yapılan *P. nigra* uçucu yağının fitokimyasal analizleri sonucunda profillerin birbirleriyle benzerlik gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda kullanılan *P. nigra* uçucu yağının ana bileşeni tüm verilerle paralellik göstermektedir.

4.2. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Gram pozitif (*S. aureus*, *S. aureus* BAA44, *S. mutans*, *S. mitis*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. subtilis*) ve Gram negatif (*M. catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*) olmak üzere 12 adet bakteri suşlarına karşı *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin tespiti için broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. MİK değerleri $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmiştir. Test materyalleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan standart antimikrobiyal maddelerin MİK değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4. 4. Uçucu yağların ve antibiyotiklerin MİK değerleri

Mikroorganizma	<i>T. serpyllum</i>	<i>P. nigra</i>	Amoksisilin	Tetrasiklin	Siproflaksasin
MİK					
<i>Bacillus cereus</i>	1000	250	0,25	1	0,01
<i>Bacillus subtilis</i>	1000	1000	0,5	0,250	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000	500	4	0,06	0,5
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	1	1	0,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1000	>1000	0,5	8	0,01

Tablo 4. 5. (Devam) Uçucu yağların ve antibiyotiklerin MİK değerleri

<i>Moraxella catarrhalis</i>	1000	1000	1	8	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000	>1000	8	8	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	0,5	8	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> BAA44	>1000	>1000	4	8	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1000	1000	1	8	0,01
<i>Streptococcus mitis</i>	>1000	>1000	8	0,5	0,5
<i>Streptococcus mutans</i>	500	1000	1	0,5	0,03

Tablo 4.2’de *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı MİK değerleri yer almaktadır. Test materyali olan uçucu yağlar, bazı mikroorganizmalara karşı MİK değerleri aynı dozlarda bulunmuştur. *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. catarrhalis* ve *S. epidermidis*’ e karşı yabancı kekik uçucu yağının MİK değeri 1000 µg/mL olarak bulunmuştur. Antimikrobiyal etkinliğin test edildiği mikroorganizmalar içerisinde *T. serpyllum* en yüksek aktiviteyi *S. mutans*’a karşı göstermiştir (500 µg/mL). Ağız patojeni olan *S. mutans* diş çürüklerinin oluşumunda önemli bir etken olarak görülmektedir. *S. mutans* suşuna karşı yabancı kekiğin en yüksek aktivite göstermesinden dolayı diş çürüklerinin önüne geçilmesinin amaçlandığı formülasyonlarda kullanımı mümkün olabilmektedir.

Deneyisel çalışma verilerine göre *P. nigra* uçucu yağı, *B. subtilis*, *M. catarrhalis*, *S. epidermidis*, *S. mutans*’a karşı MİK değeri 1000 µg/mL olarak bulunmuştur. Diğer patojenlere kıyasla *E. faecalis*’te MİK değeri 500 µg/mL saptanırken, en yüksek aktivitesi *B. cereus*’a karşı olduğu tespit edilmiştir (250 µg/mL). En yüksek aktivite gözlemlenen *B. cereus* genel olarak gıda ile bulaşan bir mikroorganizmadır. Dolayısıyla karaçam uçucu yağının gıda kaynaklı hastalıklarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

4.3. Kombinasyonların antimikrobiyal aktiviteleri

Yapılmış olan kombinasyon çalışmalarında literatürde bulunan ve kullanımı yaygınlaşan dama tahtası yöntemi uygulanmıştır. Materyal ve metot bölümünde bulunan mikroorganizmaların tümü denenmiştir. Etkiyi belirlemek adına kombinasyonların fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonları (FİK) hesaplanmıştır. FİK değerlerinden yararlanılarak fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksi (FİKİ) hesaplanarak

kombinasyonun sinerjistik-aditif-bağımsız-antagonizma etkileri değerlendirilmiştir. Uçucu yağ-uçucu yağ ve uçucu yağ-standart antimikrobiyal madde kombinasyonları yapılmıştır. Kombinasyonlarda kullanılan standart antimikrobiyal maddeler, farklı antibiyotik gruplarından olan ve geniş spektruma sahip amoksisilin, siproflaksasin ve tetrasiklidir.

Ayrıca *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının GK/KS analizi sonucunda tespit edilen ana bileşenlerinin birbirleriyle kombinasyonları oluşturulmuştur. Belirtilen kombinasyonların FİK ve FİKİ değerleri Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4. 6. *T. serpyllum*-*P. nigra* uçucu yağ kombinasyonları

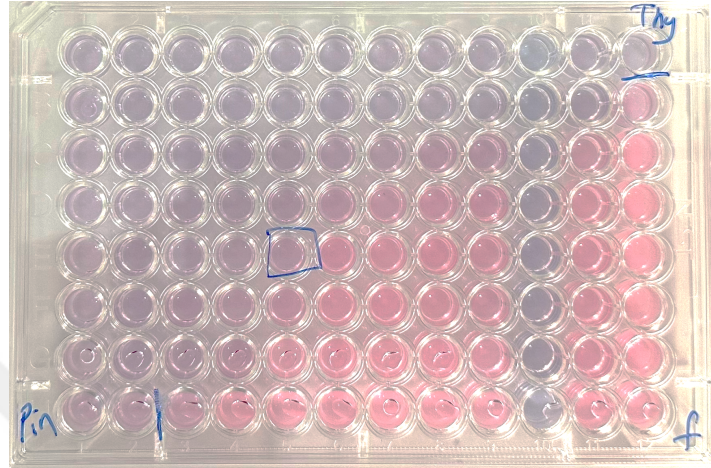
Mikroorganizma	<i>T. serpyllum</i>			<i>P. nigra</i>				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>S. mutans</i>	0,5	0,250	0,5	1	0,015	0,015	0,515	Aditif
<i>S. aureus</i> BAA44	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	1	0,0625	0,0625	0,5	0,0625	0,125	0,1875	Sinerjistik
<i>M. catarrhalis</i>	1	1	1	1	0,5	0,5	1,5	Bağımsız
<i>E. coli</i>	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>S. typhimurium</i>	1	1	1	1	1	1	2	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	1	0,125	0,125	0,5	0,125	0,250	0,375	Sinerjistik
<i>B.cereus</i>	1	0,250	0,250	1	0,250	0,250	0,5	Aditif
<i>B. subtilis</i>	1	0,5	0,5	1	0,250	0,250	0,750	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** Numunelerin kombinasyon halindeki MİK değeri. Tabloda verilen tüm maddelerin konsantrasyonları mg/ml olarak verilmiştir.

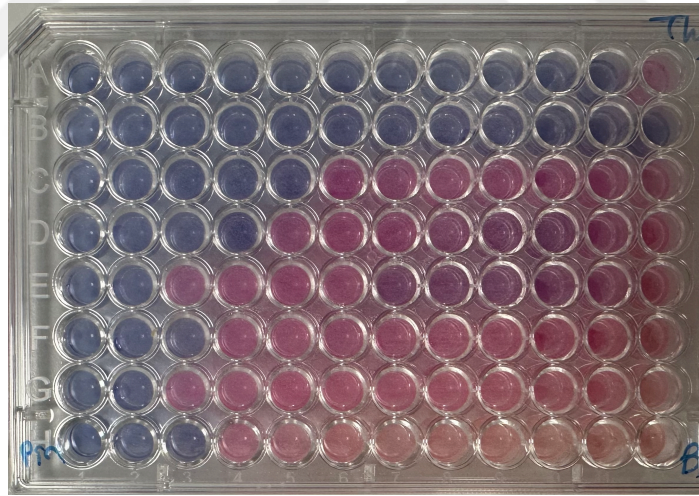
12 adet mikroorganizma üzerinde denenmiş iki uçucu yağın birbirleriyle kombinasyonlarının FİK ve FİKİ değerleri Tablo 4.3’te belirtilmiştir. *T. serpyllum*-*P. nigra* kombinasyonunun *S. aureus* BAA44, *S. aureus*, *S. mitis*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. typhimurium* patojenlerine karşı bağımsız etki, yani uçucu yağların tek başına gösterdikleri etkinin kombinasyonda da değişmeyerek devam ettiği bulunmuştur. Uçucu yağ kombinasyonunun *S. mutans*, *B.cereus* ve *B. subtilis* mikroorganizmalarına karşı aditif etki göstermiştir. Aditif etki, uçucu yağlarının bireysel olarak gösterdiği etkilerinin toplamının kombinasyondaki etkiye eşit olması durumudur.

T. serpyllum-*P. nigra* uçucu yağı kombinasyonu denen 12 mikroorganizma içerisinde sadece 2 mikroorganizmada (*E. faecalis* ve *S. epidermidis*) sinerjik etki saptanmıştır. Dama tahtası yöntemiyle belirlenmiş olan sinerjik etkiler Görsel 4.1 ve

Görsel 4.2’de gösterilmiştir. Sinerjik etkinin uçucu yağların majör bileşenlerinden kaynaklı olup olmadığının tespiti için majör bileşenlerin birbirleriyle dama tahtası yöntemi kullanılarak aktivite testleri yapılmıştır.



Görsel 4. 1. 96’lı mikropate *T. serpyllum*- *P. nigra* kombinasyonunun *E. faecalis*’e karşı etkisi



Görsel 4. 2. *S. epidermidis*’e karşı *T. serpyllum*- *P. nigra* kombinasyonu

Tablo 4. 7. *T. serpyllum*- antimikrobiyal ajan kombinasyonları

<i>T. serpyllum</i> ve Amoksisilin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>T. serpyllum</i>			Amoksisilin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	1	0,060	0,060	0,5	0,250	0,5	0,560	Aditif
<i>B. cereus</i>	1	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1,015	Bağımsız
<i>E. coli</i>	1	0,015	0,015	1	0,5	0,5	0,515	Aditif
<i>E. faecalis</i>	0,5	0,015	0,031	4	4	1	1,031	Bağımsız

Tablo 4. 8. (Devam) *T. serpyllum*- antimikrobiyal ajan kombinasyonları

<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	0,5	0,5	1	2	Bağımsız
<i>M. catarrhalis</i>	1	0,015	0,015	1	1	1	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	1	0,015	0,015	0,5	0,5	1	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i> BAA44	1	0,5	0,5	4	2	0,5	1	Aditif
<i>S. epidermidis</i>	1	0,250	0,250	0,5	0,5	1	1,25	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	0,250	0,250	8	1	0,250	0,5	Aditif
<i>S. mutans</i>	0,5	0,25	0,5	1	1	1	1,5	Bağımsız
<i>S. typhimurium</i>	1	0,5	0,5	8	1	0,125	0,625	Aditif
<i>T. serpyllum</i> ve Siproflaksasin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>T. serpyllum</i>			Siproflaksasin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	1	0,031	0,031	0,015	0,015	1	1,031	Bağımsız
<i>B.cereus</i>	1	0,250	0,250	0,250	0,125	0,5	0,750	Aditif
<i>E. coli</i>	1	0,031	0,031	0,015	0,015	1	1,031	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	1	0,031	0,031	1	0,5	0,5	0,531	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	1	0,031	0,031	0,125	0,062	0,5	0,531	Aditif
<i>M. catarrhalis</i>	1	0,015	0,015	0,0625	0,0625	1	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	1	0,015	0,015	0,250	0,125	0,5	0,515	Aditif
<i>S. aureus</i> BAA44	1	0,062	0,062	8	4	0,5	0,562	Aditif
<i>S. epidermidis</i>	1	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1,015	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	0,250	0,250	0,250	0,125	0,5	0,750	Aditif
<i>S. mutans</i>	1	0,031	0,031	0,250	0,125	0,5	0,531	Aditif
<i>S. typhimurium</i>	1	0,125	0,125	0,125	0,062	0,5	0,625	Aditif
<i>T. serpyllum</i> ve Tetrasiklin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>T. serpyllum</i>			Tetrasiklin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B.cereus</i>	1	0,03	0,03	1	0,5	0,5	0,503	Aditif
<i>B.subtilis</i>	1	0,015	0,015	0,250	0,250	1	1,015	Bağımsız
<i>E. coli</i>	1	0,015	0,015	1	1	1	1,015	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0,5	0,03	0,06	0,06	0,03	0,5	0,506	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>M. catarrhalis</i>	1	0,5	0,5	8	2	0,25	0,75	Aditif
<i>S. aureus</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. aureus</i> BAA44	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	0,015	0,015	0,5	0,250	0,5	0,515	Aditif

Tablo 4. 9. (Devam) *T. serpyllum*- antimikrobiyal ajan kombinasyonları

<i>S. mutans</i>	1	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,75	Aditif
<i>S. typhimurium</i>	1	0,015	0,015	8	4	0,5	0,515	Aditif

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** Numunelerin kombinasyon halindeki MİK değeri. Tabloda verilen uçucu yağın konsantrasyonu mg/ml, antibiyotiklerin konsantrasyonu mg/L olarak verilmiştir.

Tablo 4.4'te *T. serpyllum* ve standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının FİK ve FİKİ değerleri bulunmaktadır. Kombinasyonlarda çalışılan mikroorganizmalara karşı sinerjik aktivite saptanmamıştır. Kombinasyonlar, FİKİ sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda yoğunluklu olarak aditif ve bağımsız etki gösterdiği görülmüştür. Literatür taramalarına göre *T. serpyllum* uçucu yağının herhangi bir antibiyotikle kombinasyonu bulunmamaktadır.

Tablo 4. 10. *P. nigra*- antimikrobiyal ajan kombinasyonları

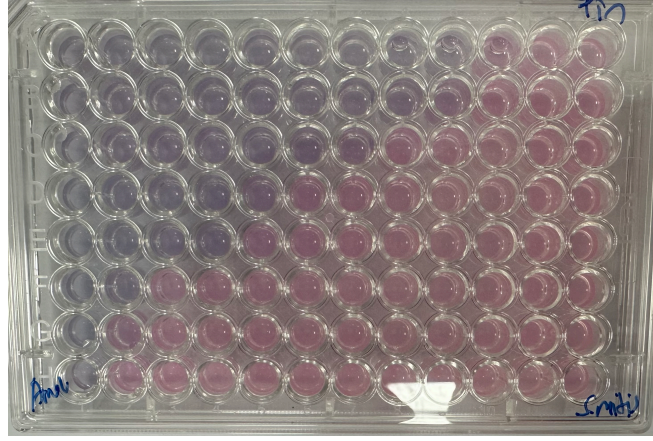
<i>P. nigra</i> ve Amoksisilin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>P. nigra</i>			Amoksisilin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	1	0,060	0,060	0,5	0,250	0,5	0,560	Aditif
<i>B.cereus</i>	1	0,250	0,250	0,250	0,125	0,5	0,750	Aditif
<i>E. coli</i>	0,5	0,015	0,030	2	1	0,5	0,530	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	1	0,06	0,06	4	2	0,5	0,56	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	0,5	0,5	1	2	Bağımsız
<i>M. catarrhalis</i>	0,5	0,015	0,030	1	1	1	1,030	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	1	0,015	0,015	0,5	0,5	1	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i> BAA44	1	1	1	4	1	0,25	1,25	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	1	0,250	0,250	8	4	0,5	0,750	Aditif
<i>S. mitis</i>	1	0,062	0,062	8	1	0,125	0,187	Sinerjizm
<i>S. mutans</i>	0,250	0,015	0,062	1	1	1	1,062	Bağımsız
<i>S. typhimurium</i>	1	0,062	0,062	8	4	0,5	0,562	Aditif
<i>P. nigra</i> ve Siproflaksasin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>P. nigra</i>			Siproflaksasin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	1	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1,015	Bağımsız
<i>B.cereus</i>	1	0,060	0,060	0,5	0,250	0,5	0,560	Aditif
<i>E. coli</i>	1	0,015	0,015	0,125	0,125	1	1,015	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	1	0,015	0,015	1	0,5	0,5	0,515	Aditif
<i>K. pneumoniae</i>	1	0,030	0,030	0,030	0,015	0,5	0,530	Aditif
<i>M. catarrhalis</i>	1	0,015	0,015	0,060	0,030	0,5	0,515	Aditif

Tablo 4. 11. (Devam) *P. nigra*- antimikrobiyal ajan kombinasyonları

<i>S. aureus</i>	1	0,030	0,030	0,5	0,250	0,5	0,530	Aditif
<i>S. aureus</i> BAA44	1	0,015	0,015	1	1	1	1,015	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	1	0,015	0,015	0,015	0,015	1	1,015	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	0,015	0,015	0,5	0,5	1	1,015	Bağımsız
<i>S. mutans</i>	1	0,015	0,015	0,060	0,030	0,5	0,515	Aditif
<i>S. typhimurium</i>	1	0,015	0,015	0,030	0,015	0,5	0,515	Aditif
<i>P. nigra</i> ve Tetrasiklin kombinasyonu								
Mikroorganizma	<i>P. nigra</i>			Tetrasiklin				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	1	0,015	0,015	0,125	0,125	1	1,015	Bağımsız
<i>B.cereus</i>	0,5	0,03	0,06	1	0,5	0,5	0,506	Aditif
<i>E. coli</i>	1	0,015	0,015	1	1	1	1,015	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	0,06	0,06	1	0,5	0,015	0,03	1,03	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>M. catarrhalis</i>	1	1	1	8	4	0,5	1,5	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	1	0,015	0,015	1	1	1	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i> BAA44	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	1	0,015	0,015	0,25	0,25	1	2	Bağımsız
<i>S. mutans</i>	1	1	1	8	8	1	2	Bağımsız
<i>S. typhimurium</i>	1	0,015	0,015	4	4	1	1,015	Bağımsız

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** Numunelerin kombinasyon halindeki MİK değeri. Tabloda verilen uçucu yağın konsantrasyonu mg/ml, antibiyotiklerin konsantrasyonu mg/L olarak verilmiştir.

P. nigra- standart antimikrobiyal ajan kombinasyonlarının FİK ve FİKİ değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan 12 mikroorganizmaya karşı *P. nigra*-amoksisilin kombinasyonunun *S. mitis*'e karşı sinerjik aktivite gösterdiği görülmüştür (Görsel 4.3). *P. nigra*'nın diğer standart antimikrobiyaller ile yapılan kombinasyon çalışmaları sinerjik aktivite göstermemiştir. Yoğunluklu olarak bağımsız etki görülürken, *P. nigra* uçucu yağı ile kombine edilen tüm antimikrobiyaller *B. cereus*' a karşı aditif etki göstermiştir.



Görsel 4. 3. *P. nigra*- amoksisilin kombinasyonu

Tablo 4. 12. *Geraniol ve α -pinen kombinasyonları*

Mikroorganizma	Geraniol			α -Pinen				
	T	K	FİK	T	K	FİK	FİKİ	Sonuç
<i>B. subtilis</i>	10	10	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>B.cereus</i>	10	10	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>E. coli</i>	10	10	1	10	10	1	2	Bağımsız
<i>E. faecalis</i>	10	5	0,5	10	5	0,5	1	Bağımsız
<i>K. pneumoniae</i>	10	10	1	10	10	1	2	Bağımsız
<i>M. catarrhalis</i>	10	10	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i>	5	5	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>S. aureus</i> BAA44	5	5	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>S. epidermidis</i>	10	10	1	10	10	1	2	Bağımsız
<i>S. mitis</i>	10	10	1	10	0,15	0,015	1,015	Bağımsız
<i>S. mutans</i>	10	10	1	10	10	1	2	Bağımsız
<i>S. typhimurium</i>	10	10	1	10	10	1	2	Bağımsız

T: numunelerin tek başına MİK değeri, **K:** Numunelerin kombinasyon halindeki MİK değeri. Tabloda verilen bileşenlerin konsantrasyonu $\mu\text{g/ml}$ olarak verilmiştir.

Etkiden sorumlu bileşiğin saptanması ve etki mekanizmasını aydınlatmak adına uçucu yağların ana bileşenleri ile aktivite çalışmaları yapılmıştır. Uçucu yağlardaki ana bileşenlerin kombinasyonu mikroorganizmalara karşı denenmiş ve Tablo 4.6’da FİK ve FİKİ değerleri verilmiştir. Ana bileşenlerle yapılan kombinasyon çalışmasında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı bağımsız etki ortaya konmuştur.

4.4. Biyootografi Sonuçları

Antimikrobiyal etkiden sorumlu bileşiğin belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise biyootografidir. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus mutans* türlerine karşı *T. serpyllum*, *P. nigra*, geraniol, α -pinen ve karvakrol test edilmiştir. Yöntemler bölümünde belirtilen şekilde hazırlanan plaklara 20 mg/mL konsantrasyonda 10'ar μ L maddeler uygulanmıştır. Standart antibakteriyel ajan olarak tetrasiklin (T) 128 μ g/mL konsantrasyonda kullanılmıştır. Mikroorganizma ile kaplanmış olan plaklara inkübasyondan sonra TTC çözeltisi püskürtülmüştür ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda paralel olarak götürülen İTK plağı ile karşılaştırıldığında etkili bileşiğin tespiti için kullanılan majör bileşenler uygulanan dozlarda zon oluşturmamıştır.

4.5. MTT Sonuçları

Etkinlik seçiciliğini belirlemek amacıyla sinerji gözlemlenen kombinasyonların in vitro toksisite testleri, hücre kültüründe HEK293 hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile yapılmıştır. FİKİ değerleri doğrultusunda sinerjik etki gösteren *P. nigra*-*T. serpyllum* ve *P. nigra*-amoksisilin kombinasyonları, uçucu yağlarının ve amoksisilin tek başına toksisitesi değerlendirilmiştir. FİKİ değerleri doğrultusunda belirlenen dozlar uygulandığında tüm kombinasyonlar tekil MİK değerlerinden daha fazla hücre canlılığı tespit edilmiştir.

Hücre kültüründe gerçekleşen toksisite çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda kombinasyon çalışmalarında toksisitede azalma görülmüştür.

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmaları kapsamında ticari olarak temin edilen *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının kombinasyonları, her bir uçucu yağın amoksisilin, siproflaksasin ve tetrasiklin kombinasyonları ve GK/KS analizi sonucunda ana bileşen olarak belirlenmiş geraniol ve α -pinenin birbiriyle kombinasyonlarının sinerjik/antagonistik biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca sinerjik etki bulunan kombinasyonların *in vitro* toksisitesi hücre kültüründe test edilmiştir. Etkiden sorumlu bileşiği saptamak amacıyla biyootografi yöntemi kullanılmıştır. Tüm kombinasyon çalışmaları ilk kez bu çalışmada denenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan uçucu yağların etnobotanik kullanımları, yabani kekiğin kemotip çeşitliliği ve Avrupa Farmakopesi'nde bulunması, karaçamın doğal yetiştirme alanının çok geniş olması ve ana bileşeni olan α -pinen uçucu bileşiğinin antimikrobiyal aktivitesinin (Silva vd., 2012) yüksek olmasından dolayı tercih edilmişlerdir.

Ticari olarak temin edilmiş uçucu yağların ana bileşen ve genel fitokimyasal kompozisyonunun tespiti için GK/KS sistemi kullanılmıştır. *T. serpyllum* uçucu yağının ana bileşeni geraniol olarak bulunmuştur. Dünya üzerinde geniş bir alana yayılan *T. serpyllum* bitkisinin uçucu yağının birçok farklı ülkelerde fitokimyasal analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlarda ana bileşenlerin bitkinin toplandığı bölgeye göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çeşitlilik *T. serpyllum* uçucu yağlarının birçok kemotipinin oluşmasına yol açmıştır (Jalil vd., 2024; Paaver vd., 2018). Çalışmamızda kullanılmış olan *T. serpyllum* ticari uçucu yağı analiz sonuçları ve literatür taramasından yola çıkılarak geraniol kemotipi olduğu tespit edilmiştir (Preljevic vd., 2024). *P. nigra* uçucu yağının analiz sonuçlarına göre majör bileşeni α -pinen olarak bulunmuştur. Literatürde birçok fitokimyasal aydınlatma çalışmaları yapılmış olan *P. nigra* uçucu yağlarının çoğu ile aynı majör bileşeni içermektedir. *P. nigra*'nın iğne yapraklarından elde edilen uçucu yağının fitokimyasal analizlerinde ana bileşen olarak α -pinen rastlanmıştır (Kurti vd., 2019; Tumen vd., 2010).

Çalışmamızda kullanılan ticari uçucu yağların fitokimyasal analizi değerlendirildiğinde, *P. nigra* uçucu yağının önceden yapılmış olan fitokimyasal çalışmalarıyla paralellik gözlenmiştir. Bir diğer çalışılmış *T. serpyllum* uçucu yağı ise kemotip çeşitliliğinden kaynaklı olarak fitokimyasal analizde farklı yüzdelerde farklı bileşenlere rastlanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında *in vitro* biyolojik aktivite testleri Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere uçucu yağların etnobotanik kullanımlarında hastalığa yol açabilecek toplamda 12 adet mikroorganizma üzerinde test edilmiştir. *T. serpyllum* uçucu yağının MİK değerleri incelendiğinde diğer patojenlere kıyasla (1000 ile >1000 µg/mL) *S. mutans* karşı (500 µg/mL) nispeten daha etkili bulunmuştur. *P. nigra* uçucu yağının sırasıyla MİK değerleri *B. cereus* (250 µg/mL) ve *E. faecalis* (500 µg/mL) patojenlerine karşı oranla daha etkili bulunmuştur. Diğer mikroorganizmalara karşı *P. nigra* uçucu yağı 1000 ile >1000 µg/mL arasında etki göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada *T. serpyllum* uçucu yağının *B. subtilis* ve *E. coli*' ye karşı MİK değerleri 0,125 µL/mL, *S. aureus* MİK değeri 0,250 µL/mL olarak bildirilmiştir. Kullanılan uçucu yağın majör bileşenleri ise *p*-simen (% 36,16), γ -terpinen (%18,31) ve timol (%17,29) olarak bulunmuştur (Ouedrhiri vd., 2016).

Bu tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmaların *T. serpyllum* uçucu yağı ile benzer MİK değerlerine rastlanmamıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında aktivitelerin farklı çıkması iki uçucu yağın ana bileşenlerinin farklı olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Aktivitede çıkan MİK değerlerinin farklılığı uçucu yağın ticari olarak temin edilmesi ve fitokimyasal bileşenlerin farklı yüzdelerde bulunması sebep olabilmektedir.

P. nigra uçucu yağının MİK değerleri incelendiğinde *B. cereus* suşuna karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur. Önceden yapılmış çalışmalar doğrultusunda karaçam uçucu yağının literatürde bulunan çalışmalarla farklılıklar gözlemlenmiştir.

P. nigra uçucu yağının ana bileşeni olarak kabul edilen α -pinen bileşeninin biyolojik aktivite sonuçları tek başına değerlendirildiğinde düşük antimikrobiyal aktivite rastlanmıştır. Ana olarak α -pinen içeren herhangi bir uçucu yağının aktivitesinin, uçucu yağın fitokimyasal kompozisyonundan kaynaklı olduğu çalışmalarla doğrulanmıştır (Mercier vd., 2009).

Literatürdeki diğer çalışmalarla (Mrkonjić vd., 2024; Rosato vd., 2018). karşılaştırmalı değerlendirme yapıldığında antimikrobiyal aktivite *P. nigra* ve *T. serpyllum* uçucu yağlar için farklı sonuçlar dikkat çekmektedir. Özellikle yabani kekiğin polimorfizmden kaynaklı olarak çeşitli kemotiplerinin bulunması, önceden yapılmış antimikrobiyal aktivite çalışmalarında farklı MİK değerlerinin bulunmasına bu durumu açıklayabilmektedir.

Yaygın olan karvakrol ve timol kemotiplerinin üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmalarında diğer kemotiplere göre yüksek aktiviteler tespit edilmiştir (Mrkonjić vd., 2024). Karvakrol ve timol bileşiklerinin aktivite çalışmalarında güçlü bir antimikrobiyal madde olabileceği kanıtlanmıştır. Birbirlerinin kimyasal izomerleri olan bu bileşikler en sık bildirilen antimikrobiyal etki mekanizmaları hücre membranını bozarak bakteriyel lizis olarak belirtilmiştir (Kachur ve Suntres, 2020).

MİK değerleri saptanmış olan uçucu yağların birbirleriyle, sentetik maddelerle ve tespit edilen ana bileşenlerin birbirleriyle sinerjik/antagonistik etkilerini incelemek için kombinasyon çalışmalarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmadaki amaç, ticari olarak antimikrobiyal aktiviteleri test edilen uçucu yağların, kombinasyon halinde sinerjik etki göstermesi durumunda azalmış olan doza paralel olarak toksisitenin de azalıp potansiyel bir doğal ilaç kombinasyonu oluşturmasıdır. *T. serpyllum*-*P. nigra* kombinasyonları çalışmadaki tüm mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. İki uçucu yağ kombinasyonunun FİK değerleri karşılaştırıldığında test edilen 12 mikroorganizmadan sadece *E. faecalis* (FİKİ: 0,1875) ve *S. epidermidis* (FİKİ: 0,375) patojenlerine karşı sinerji etki göstermiştir. Bir diğer sinerjik etki *P. nigra* ve amoksisilin kombinasyonunda (FİKİ:0,187) *S. mitis*'e karşı gözlemlenmiştir. *S. mitis*'e karşı gözlemlenen sinerjik etki amoksisilin ve *P. nigra* uçucu yağının ana bileşeni olan α -pinen'nin hücre duvarı üzerindeki yıkıcı etkilerini güçlendirdiği sonucuna varılabilir.

Ayrıca α -pinen'nin lipofilik karakterli siklik monoterpen bileşik olmasından kaynaklı olarak membran akışını arttırarak enzim inhibisyonuna neden olmaktadır. Böylelikle hücre bütünlüğünü bozarak membran geçirgenliğini arttırdığı gözlemlenmiştir (Sikkema ve ark., 1994). *P. nigra*'nın diğer antimikrobiyal ajanlarla FİKİ değerleri değerlendirildiğinde birçoğunda aditif veya bağımsız etkiye rastlanmıştır.

Çalışmada test edilmiş diğer tüm kombinasyonlar aditif ve bağımsız etki göstermiştir. Ayrıca antimikrobiyal aktivitenin majör bileşenlerinden kaynaklı olup olmadığının aydınlatılabilmesi için majör maddeler dama tahtası yöntemiyle test edilmiştir. Önceden yapılmış çalışmalar incelendiğinde iki ana uçucu bileşenin kombinasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Bireysel olarak antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış olan geraniol (Lira vd., 2020) ve α -pinen (Silva Rivas vd., 2012) bileşenleri ampisilin, norflaksasin ve penisilin gibi çeşitli antibiyotikler ile kombine çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda denenmiş olan uçucu bileşenlerle herhangi bir sinerjik etki tespit edilememiştir (Gallucci vd., 2006).

Çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının ana bileşenlerinin bağımsız etki yani kombinasyon halinde gösterdikleri etki ile tek başına gösterdikleri etkinin aynı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *S. epidermidis* ve *E. faecalis* suşlarına karşı sinerjik etki gözlemlenen *T. serpyllum*- *P. nigra* kombinasyonundaki etkinin ana bileşenler olan geraniol ve α -pinen'den kaynaklı olmadığı sonucuna varılabilir. Sinerjik etki, uçucu yağlar içerisinde fitokimyasal analiz sonucunda tespit edilen bileşenlerin tümüyle açıklanabilmektedir.

Biyootografi deneyinde *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının aktiviteden sorumlu bileşiklerin tespiti için standart madde olarak geraniol, karvakrol ve α -pinen kullanılmıştır. Uçucu yağların ana bileşenleri olan geraniol ve α -pinen uygulanan dozlarda zon oluşturmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre aktivitenin majör bileşenden kaynaklı olmadığı, tüm bileşenlerin bir arada bir sinerji oluşturdıkları sonucuna varılabilmektedir.

MTT yöntemi ile sinerjik etki gösteren kombinasyonların toksisite çalışmaları yapılmıştır. Toksik etki göstermeyen kombinasyonlar, sinerji çalışmalarında amaçlanan düşük doz ve düşük toksisite amaçlarını karşılamaktadır.

Ticari *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağlarının genel olarak birçok enfeksiyon durumlarında kullanımı bilinse de çalışmada kullanılan uçucu yağların birbirleri ve sentetik antimikrobiyal maddelerle antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirmesi yapılmamıştır. Bu çalışmada literatürde bulunan eksik giderilmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda sinerji olarak belirlenen kombinasyonların toksisite değerleri de tespit edilmiştir.

Tez çalışmamızda *T. serpyllum* ve *P. nigra* uçucu yağ ve ana bileşenlerinin kombinasyonlarının antimikrobiyal etkilere sahip olduğu, aynı zamanda söz konusu olan uçucu yağların geniş spektrumlu antimikrobiyallerle kombinasyonlarının antimikrobiyal etkinlik potansiyellerinin olduğu sistematik olarak gösterilmiştir. Uçucu yağlar ve uçucu bileşenlerinin antimikrobiyal kombinasyonlarının mikroorganizma direncini engelleme anlamında önemi tekrardan vurgulanmıştır. Tez kapsamında elde edilen bulgular kendi alanında ilk olma özelliği taşımaktadır.

Güvenli olarak insanlarda kullanılmadan önce, etki gözlemlenen üst solunum yolları patojenleri üzerinde daha ayrıntılı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılarak farklı kombinasyonların yenilikçi ilaç formlarında ve formülasyonlarında denenmesi için daha

ileri detaylı çalışmaların yapılması elzemdir. İlaç formülasyonlarının yanı sıra, kombinasyonlar kozmetik, parfümeri ve gıda endüstrisinde kullanılmak üzere çeşitli çalışmaların yapılması gerekmektedir..



KAYNAKÇA

- Acimovic, M., Pezo, L., Jeremic, J. S., Cvetkovic, M., Rat, M., Cabarkapa, I., Tesevic, V. (2020). QSRR model for predicting retention indices of geraniol chemotype of *Thymus serpyllum* essential oil. J Essent. Oil-Bear. Plants, 23(3), 464-473.
- Adams, M., Schneider, S.V., Kluge, M., Kessler, M., Hamburger, M. (2012). Epilepsy in the renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. J Ethnopharmacol. 143,1–13.
- Adjaoud, A., Laouer, H., Braca, A., Cioni, P., Moussi, K., Berboucha-Rahmani, M., Falconieri, D. (2022). Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauritanica* (Pinaceae), Northern Algeria. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 156(2), 358-369.
- Amri, I., Hanana, M., Jamoussi, B., Hamrouni, L. (2017). Essential oils of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. Arabian Journal of Chemistry, 10, S3877-S3882.
- Amri, I., Khammassi, M., Gargouri, S., Hanana, M., Jamoussi, B., Hamrouni, L., Mabrouk, Y. (2022). Tunisian pine essential oils: Chemical composition, herbicidal and antifungal properties. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 25(3), 430-443.
- Ari, S., Kargioğlu, M., Temel, M., Konuk, M. (2014). Traditional tar production from the Anatolian black pine [*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe var. *pallasiana*] and its usages in Afyonkarahisar, Central Western Turkey. J. Ethnobiol. Ethnomed. 10, 29.
- Aziz, S. (2008). Studies on the chemical constituents of *Thymus serpyllum*. Turkish Journal of Chemistry, 32(5), 605–614.
- Aziz, S., Habib-ur-Rehman, Irshad, M., Asghar, S. F., Hussain, H., Ahmed, I. (2010). Phytotoxic and antifungal activities of essential oils of *Thymus serpyllum* grown in the state of Jammu and Kashmir. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13(2), 224-229.
- Bączek, K., Pióro-Jabrucka, E., Kosakowska, O., Węglarz, Z. (2019). Intraspecific variability of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) occurring in Poland. Journal of applied research on medicinal and aromatic plants, 12, 30-35.
- Baj, T., Biernasiuk, A., Wróbel, R., Malm, A. (2020). Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus*

- vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Open Chemistry, 18(1), 108-118.
- Başer, K.H.C. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Current Pharmaceutical Design, 14 (29), 3106-3119.
- Bhattamisra, S. K., Kuean, C. H., Chieh, L. B., Yan, V. L. Y., Lee, C. K., Hooi, L. P., Sahu, P. S. (2018). Antibacterial activity of geraniol in combination with standard antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. Natural Product Communications, 13(7), 1934578X1801300701.
- Boren, K., Crown, A., Carlson, R. (2020). Multidrug and Pan-Antibiotic Resistance—The Role of Antimicrobial and Synergistic Essential Oils: A Review. Nat. Prod. Commun. 15(10), 1934578X20962595.
- CLSI. (2012). M07-A10 methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-tenth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 32 (2) 17-18.
- Cottarel, G., Wierzbowski, J. (2007). Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. Trends in biotechnology, 25(12), 547-555.
- De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., Negro, D. (2011). Chemical characterization of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. Food Chemistry 125,1284–1286.
- Demirci, A. N., Çömlekçioğlu, N., Aygan, A. (2020). Determination of the chemical composition, antimicrobial activity and flavonoid content of the essential oils of *Cedrus libani* and *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 8(8): 1747-1754.
- Diğrak, M., İlçim, A., Hakkı Alma, M. (1999). Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 13(7), 584-587.
- Esen, M., Diğrak, M. (2009). Kahramanmaraş Yöresindeki Bazı Orman Ağaçlarından Elde Edilen Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivitesi. Firat University Journal of Science, 21(1).
- European Pharmacopoeia, 2023. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care (EDQM), 11th ed. Council of Europe, Strasbourg.

- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. ESCOP monographs, The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Online series. Wild Thyme (*Thymus serpyllum*). Exeter: ESCOP; 2014.
- Evans, W. C. (2009). Trease and Evans' pharmacognosy. Elsevier Health Sciences.
- Farooqi, A.A., Sreeramu, B.S., Srinivasappa, K.N. (2005). Cultivation of Spice Crops. Universities Press, Hyderabad.
- Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaib, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria J. Costa. Asian Pasific Journal of Tropical Disease. 4(2): 97-103.
- Fidan, H., Lazarov, A., Petkova, N., Stankov, S., Dincheva, I., Gandova, V., Koleva, Y. (2023). Chemical composition of essential oil from *Thymus serpyllum* L. and its antimicrobial and antioxidant activity. Oxidation Communications, 46(3).
- Fleming, T. (Ed.). (1998). PDR for herbal medicines (No. Ed. 1, pp. iv+-1244).
- Gairola, S., Sharma, J., Bedi, Y. S. (2014). A cross-cultural analysis of jammu, kashmir and ladakh (india) medicinal plant use. Journal of Ethnopharmacology, 155(2), 925–986.
- Gallucci N, Casero C, Oliva M. (2006). Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. Molec Med Chem 10:30–2.
- Georgescu, C., Mironescu, M. (2011). Obtaining, characterisation and screening of the antifungal activity of the volatile oil extracted from *Thymus serpyllum*. 12(4), 2294-2302.
- Günbatan, A., Gürbüz, İ., Özkan, A. (2016). The current status of ethnopharmacobotanical knowledge in Çamlıdere (Ankara, Turkey). Turkish Journal of Botany, 40(3), 241-249.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15:639–52.
- http-1:** <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30066276-2/general-information#descriptions>. (Erişim tarihi: 06.02.2024)
- http-2:** <https://www.turkiyeflorasi.org.tr/pdf-kutuphanesi.html>. (Erişim tarihi: 18.05.2024)
- http-3:** <https://www.arbolapp.es/en/species/info/pinus-nigra/>. (Erişim tarihi: 18.05.2024)
- Hussain, A. I., Anwar, F., Chatha, S. A., Latif, S., Sherazi, S. T., Ahmad, A., Sarker, S. D. (2013). Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two thymus species from the pakistani flora. LWT- Food Science and Technology, 50(1),

185–192.

- Jalil, B., Pischel, I., Feistel, B., Suarez, C., Blainski, A., Spreemann, R., Heinrich, M. (2024). Wild thyme (*Thymus serpyllum* L.): a review of the current evidence of nutritional and preventive health benefits. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1380962.
- Jamali, C. A., ElBouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, M., Wohlmuth, H., Abbad, A. (2012). Chemical Composition and Antioxidant and Anticandidal Activities of Essential Oils from Different Wild Moroccan *Thymus* Species. *Chemistry & Biodiversity*, 9(6), 1188–1197.
- Jaric, S., Mitrović, M., Pavlović, P. (2015). Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation.
- Jovanović, A. A., Balanč, B., Petrović, P., Pravilović, R., Djordjević, V. (2021). Pharmacological potential of *Thymus serpyllum* L.(wild thyme) extracts and essential oil: A review. *Journal of Engineering & Processing Management*, 13(2), 32-41.
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Yao, W. (2022). Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: A new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(7), 1740-1751.
- Jugreet, B. S., Suroowan, S., Rengasamy, R. K., Mahomoodally, M. F. (2020). Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 89-105.
- Kachur, K., Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3042-3053.
- Karadağ, A. E., Çaşkurlu, A., Demirci, B., Demirci, F. (2023). Binary synergistic combinations of lavender and fennel essential oils with amoxicillin. *Planta Medica*, 89(08), 800-807.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., Ilcim, A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of ethnopharmacology*, 76(2), 183-186.
- Kılıç, O., Koçak, K. (2014). Essential oil composition of six *Pinus* L. taxa (Pinaceae) from Canada and their chemotaxonomy. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4,67–73.
- Kızılarşlan, Ç., Sevg, E. (2013). Ethnobotanical uses of genus *Pinus* L.(Pinaceae) in Turkey.

- Kirillov, V., Stikhareva, T., Mukanov, B., Chebotko, N., Ryazantsev, O., Atazhanova, G., Adekenov, S. (2016). Composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. from Northern Kazakhstan. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(1), 212-222.
- Koutsaviti, A., Toutoungy, S., Saliba, R., Loupassaki, S., Tzakou, O., Roussis, V., Ioannou, E. (2021). Antioxidant potential of pine needles: a systematic study on the essential oils and extracts of 46 species of the genus *Pinus*. *Foods*, 10(1), 142.
- Kozan, E., Ilhan, M., Tümen, I., Akkol, E. K. (2019). The scolicidal activity of the essential oil obtained from the needles of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe on hydatid cyst. *Journal of ethnopharmacology*, 235, 243-247.
- Kulisic, T., Radonic, A. and Milos, M. (2005). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Ital. J. Food Sci.* 3: 315-324
- Kurti, F., Giorgi, A., Beretta, G., Mustafa, B., Gelmini, F., Testa, C., Hajdari, A. (2019). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of different *Pinus* species from Kosovo. *Journal of Essential Oil Research*, 31(4), 263-275.
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.
- Lira, M., Andrade Júnior, F., Moraes, G., Macena, G., Pereira, F., Lima, I. (2020). Antimicrobial activity of geraniol: An integrative review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(3), 187-197.
- Macchioni, F., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., Ansaldi, M. (2003). Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 139-143.
- Mancianti, F., Ebani, V. V. (2020). Biological activity of essential oils. *Molecules*, 25(3), 678.
- Menković, N., Šavikin, K., Tasić, S., Zdunić, G., Stešević, D., Milosavljević, S., Vincek, D. (2011). Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J. Ethnopharmacol.* 133, 97–107.
- Mercier, B., Prost, J., Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): A review. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 22(4), 331-342.

- Mitic, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović-Radić, Z. Z., Cvetković, V. J., Stojanović, G. S. (2018). Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 111, 55-62.
- Mrkonjić, Ž., Kaplan, M., Milošević, S., Božović, D., Sknepnek, A., Miletić, D., Pavlić, B. (2024). Green Extraction Approach for Isolation of Bioactive Compounds in Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.) Herbal Dust—Chemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activity and Comparison with Conventional Techniques. *Plants*, 13(6), 897.
- Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*, 399, 625–655.
- Mustafa, B., Hajdari, A., Pieroni, A., Pulaj, B., Koro, X., Quave, C. L. (2015). A cross-cultural comparison of folk plantuses among albanians, bosniaks, gorani and turks living in south Kosovo. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1).
- Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food chemistry*, 173, 339-347.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157–160
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190.
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F. O., Taleb, M., Greche, H. (2016). Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 89, 1-9.
- Ouedrhiri, W., Mechchate, H., Moja, S., Baudino, S., Saleh, A., Al Kamaly, O. M., Greche, H. (2022). Optimized antibacterial effects in a designed mixture of essential oils of *Myrtus communis*, *Artemisia herba-alba* and *Thymus serpyllum* for wide range of applications. *Foods*, 11(1), 132.

- Ouedrhiri, W., Mechchate, H., Moja, S., Mothana, R. A., Noman, O. M., Grafov, A., Greche, H. (2021). Boosted Antioxidant Effect Using a Combinatory Approach with Essential Oils from *Origanum compactum*, *Origanum majorana*, *Thymus serpyllum*, *Mentha spicata*, *Myrtus communis*, and *Artemisia herba-alba*: Mixture Design Optimization. *Plants*, 10(12), 2817.
- Ouedrhiri, W., Mounyr, B., Harki, E. H., Moja, S., Greche, H. (2017). Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3149-3158.
- Paaver, U., Orav, A., Arak, E., Mäeorg, U., Raal, A. (2008). Phytochemical analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Natural product research*, 22(2), 108-115.
- Papp, N., Purger, D., Czigle, S., Czégényi, D., Stranczinger, S., Tóth, M., Filep, R. (2022). The importance of pine species in the ethnomedicine of Transylvania (Romania). *Plants*, 11(18), 2331.
- Petrovic, S., Ristic, M., Petrovic, N., Lazic, M., Franciskovic, M. (2014). Chemical composition and antioxidative activity of essential oil of *Thymus serpyllum* L. *Chemical Industry*, 68(3), 389–397.
- Polat, R., Satil, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 626-641.
- Politeo, O., Botica, I., Bilusic, T., Jukic, M., Carev, I., Burcul, F., Milos, M. (2011). Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(30), 6590-6596.
- Preljevic, K., Pašić, I., Vlaović, M., Matić, I. Z., Krivokapić, S., Petrović, N., Perović, S. (2024). Comparative analysis of chemical profiles, antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of essential oils of two *Thymus* species from Montenegro. *Fitoterapia*, 105871.
- Raal, A., Paaver, U., Arak, E., Orav, A. (2004). Content and composition of the essential oil of *Thymus serpyllum* L. growing wild in Estonia. *Medicina, Kaunas*. 40: 795-800
- Rasooli, I., Mirmostafa, S.A. (2002). Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*. 73: 244-250.
- Rezzi, S., Bighelli, A., Castola, V., Corsica, J. (2005). Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica. *Industrial Crops and Products*. 21:

71-79.

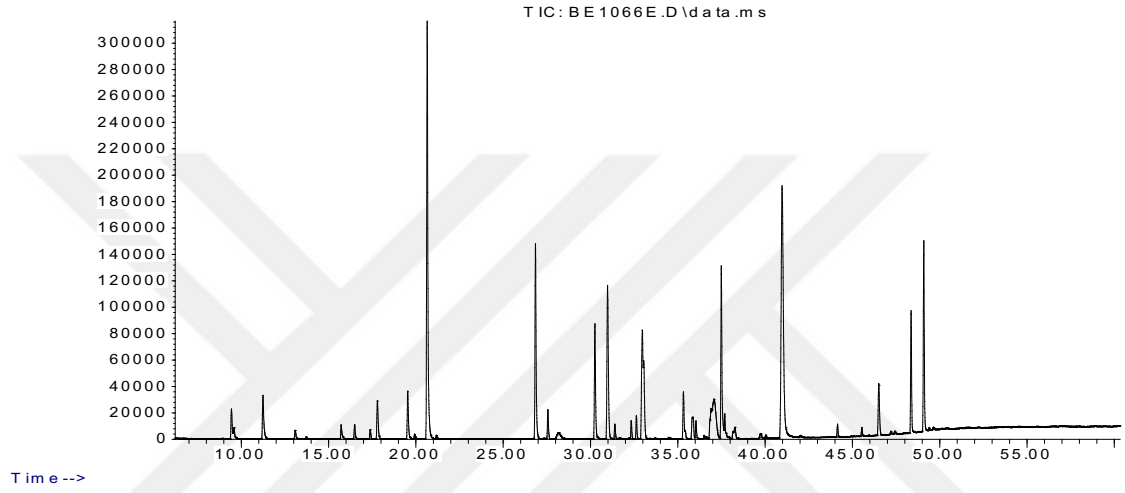
- Rosato, A., Maggi, F., Cianfaglione, K., Conti, F., Ciaschetti, G., Rakotosaona, R., Corbo, F. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils. *Journal of Essential oil research*, 30(4), 233-243.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Milillo, M. A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14(11), 727-732.
- Sáez, F., Stahl-Biskup, E. (2002). Essential oil polymorphism in the genus *Thymus*. In *Thyme* (pp. 139-157). CRC Press.
- Salaria, D., Rolta, R., Fadare, O. A., Fadare, R. Y., Guleria, S., Lal, U. R., Kumar, V. (2023). *In silico* and *in vitro* antioxidant potential of *Thymus serpyllum* L. essential oil. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 8, 100280.
- Salehi, B., Abu-Darwish, M. S., Tarawneh, A. H., Cabral, C., Gadetskaya, A. V., Salgueiro, L., Contreras, M. (2019). *Thymus* spp. plants-Food applications and phytopharmacy properties. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 287-306.
- Šarac, Z., Bojović, S., Nikolić, B., Tešević, V., Đorđević, I., Marin, P. D. (2013). Chemotaxonomic significance of the terpene composition in natural populations of *Pinus nigra* JF Arnold from Serbia. *Chemistry & Biodiversity*, 10(8), 1507-120.
- Šarac, Z., Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić, A. M., Bojović, S., Marin, P. D. (2014). Biological activity of *Pinus nigra* terpenes—evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in biology and medicine*, 54, 72-78.
- Sezik, E., Üstün, O., Demirci, B., Başer, KHC. (2010). Composition of the essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey, *Turkish Journal of Chemistry: Vol. 34: No. 2, Article 17*.
- Shealy C N. The illustrated encyclopaedia of healing remedies. Australia; Element Books 1998
- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J J Biol Chem*, 269:8022–8.
- Silva Rivas, A. C., Lopes, P. M., Azevedo Barros, M. M., Costa Machado, D. C., Alviano, C. S., Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.

- Singletary, K. (2016). Thyme: history, applications, and overview of potential health benefits. *Nutrition today*, 51(1), 40-49.
- Stahl-Biskup, E., Sáez, F. (Eds.). (2002). *Thyme: the genus Thymus*. CrC press.
- Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Bugarski, B. (2011). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685–696.
- Trindade, H., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. (2018). Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. *Industrial crops and products*, 124, 530-547.
- Tumen, I., Hafizoglu, H., Kilic, A., Dönmez, I. E., Sivrikaya, H., Reunanen, M. (2010). Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. natively grown in Turkey. *Molecules*, 15(8), 5797-5806.
- Tumen, I., Hafizoglu, H., Kilic, A., Dönmez, I.E., Sivrikaya, H., Reunanen M. (2010). Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. Natively grown in Turkey. *Molecules*, 15, 5797–5806.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S., Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in applied microbiology*, 48(4), 440-446.
- Ventola C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *Pharm. Ther.* 40:277–283.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16:97–110.
- Wesołowska, A., Grzeszczuk, M., Jadczak, D., Nawrotek, P., Struk, M. (2015). Comparison of the chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus serpyllum* essential oils. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 432-438.
- Williamson, E. M. (2009). Synergy and other interactions in phytomedicines. W. Evans Y., (1995). *Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in Middle and West*.

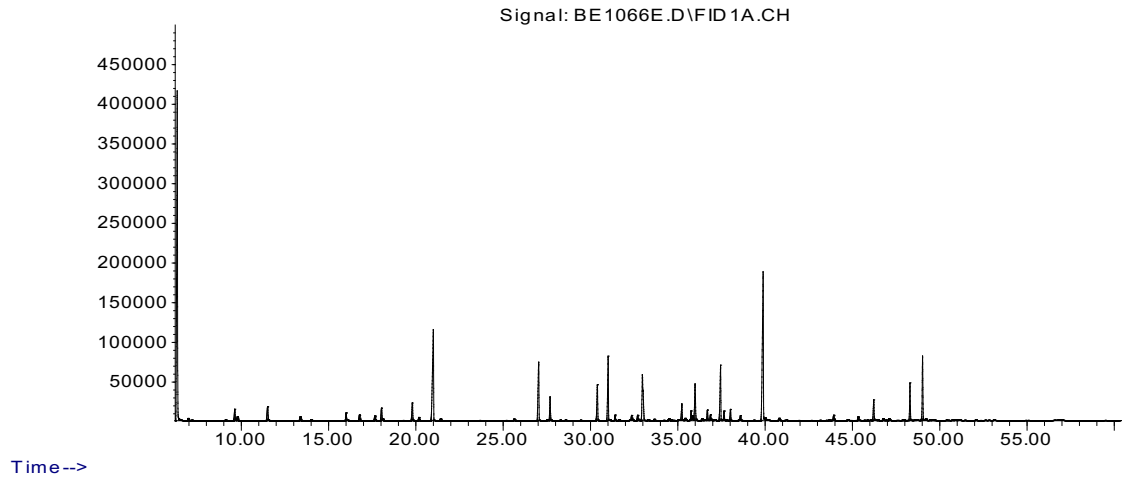
EKLER

EK-1. *Thymus serpyllum* ve *Pinus nigra* uçucu yağlarının GK/KS ve GK/AİD Spektrumu

Abundance

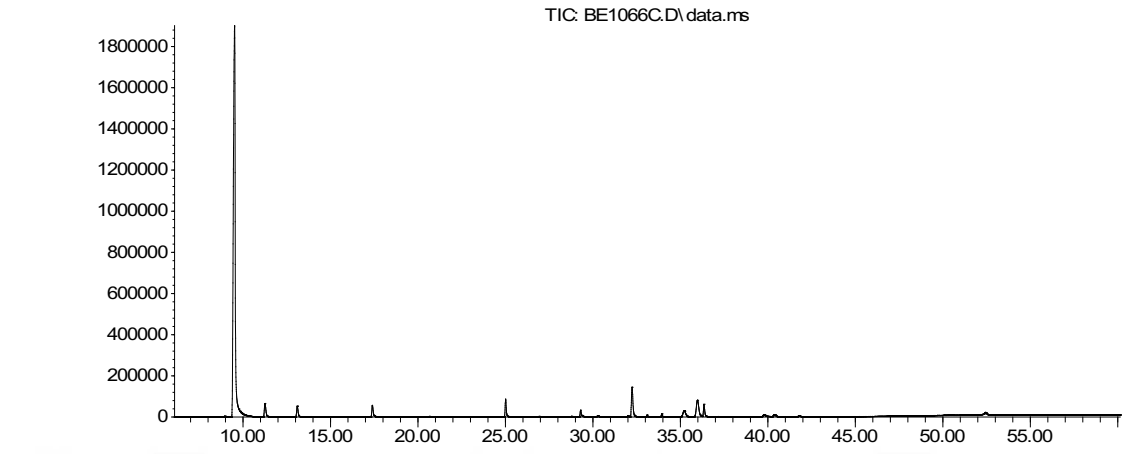


Abundance

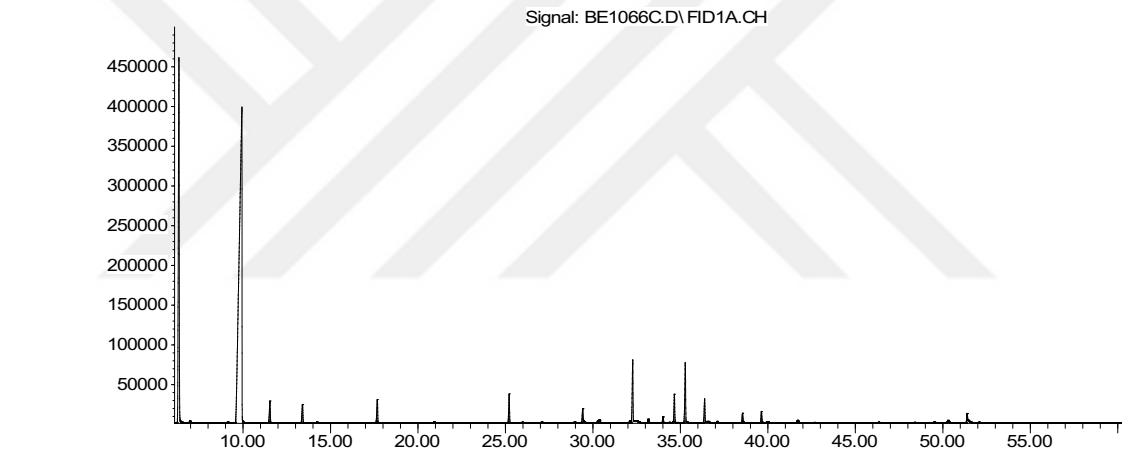


Pinus nigra uçucu yağı GK/KS ve GK/AİD Spektrumu

Abundance



Abundance



EK-2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler; 15th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, November 2-5- Antalya, Türkiye

PP60. SYNERGISTIC POTENTIAL OF *PINUS NIGRA* J.F. ARNOLD AND *THYMUS* L. ESSENTIAL OILS AGAINST DIFFERENT HUMAN PATHOGENS

Sümeyye Elif KAHYA^{1,2*} , Ayşe Esra KARADAĞ¹ , Betül DEMİRCİ³ , K. Hüsnü Can BAŞER⁴ , Fatih DEMİRCİ^{3,5} 

¹Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Istanbul Medipol University, Beykoz, Istanbul, TÜRKİYE

²Department of Pharmacognosy, University of Health Sciences, Anadolu University, Eskişehir, TÜRKİYE

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, TÜRKİYE

⁴Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Northern Cyprus

⁵Faculty of Pharmacy, Eastern Mediterranean University, Famagusta, Turkish Republic of Northern Cyprus

In this study, it is aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial effects of *Pinus nigra* J.F. Arnold and *Thymus serpyllum* L., *T. capitatus* Hoffmans. & Link, and *T. vulgaris* L. essential oils individually and in combination. The composition of the commercial essential oils was confirmed using by simultaneous Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography/Flame Ionization Detector (GC/FID) analyses. The major component of *P. nigra* essential oil was α -pinene (73.8 %), while the major constituents of *T. capitatus*, *T. serpyllum*, *T. vulgaris* oils were carvacrol (65.8%), geraniol (19.3%) and thymol (31.1%), respectively. *In vitro* antimicrobial evaluation of commercial essential oils against *Streptococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli* were performed using a broth microdilution assay. The synergistic or antagonistic effects of *P. nigra* and *Thymus* sp. essential oils were evaluated using the checkerboard method, where the fractional inhibitory concentration (FIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI) values were calculated. According to the initial results, the FICI of *P. nigra* + *T. capitatus* essential oil combinations against *M. catarrhalis* showed synergic effect, while *P. nigra* + *T. serpyllum* oil combinations showed antagonism. To the best of our knowledge, this is the first study for *P. nigra* + *Thymus* essential oil combinations against selected human pathogenic microorganisms.

Keywords: *Pinus*, *Thymus*, essential oil, antimicrobial activity, combinations.

Acknowledgement: This work is part of the MSc thesis of S.E.K.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Sümeyye Elif KAHYA

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2022-Halen devam eden, Araştırma Görevlisi, İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı.
- Lisans: 2022, İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık.
- Lise: 2016, Ordu Başöğretmen Anadolu Lisesi.
- İlk ve Orta Öğretim: 2012, Ordu Hamdullah Suphi Tanrıöver İlköğretim Okulu.

Yayınları ve Bilimsel Faaliyetleri:

- Kahya S.E., Karadağ A.E., Demirci B, Başer K.H.C, Demirci F. (2023) Synergistic Potential of Pinus nigra JF. Arnold and Thymus L. Essential Oils Against Different Human Pathogens (Poster Bildiri), 15th International Symposium On The Chemistry of Natural Compounds 2-5 November 2023, Antalya/Türkiye
- Karadağ A.E., Kahya S.E., Çaşkurlu A, Demirci B, Demirci F. (2023) Antimicrobial Evaluation of Mentha piperita & Thymus serpyllum & Pelargonium graveolens Essential Oil Combinations With Chlorhexidine For Mouthwash Application (Poster Bildiri), 53rd International Symposium on Essential Oils September 13-16, 2023, Milazzo, Messina, Italy
- Kahya S.E., Karavuş Ş.N. (2023) Antimicrobial Activity Evaluation Of Three Different Medicinal Plants Against Human Pathogenic Strains (Poster Bildiri), 71st International Congress and Annual Meeting of The Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA) 2-5 July 2023, Dublin, Ireland