ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN ETKİNLİĞİNİ ARTTIRAN UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Gamze Göger

Doktora Tezi

ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN ETKİNLİĞİNİ ARTTIRAN UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Gamze Göger

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalı
Eskişehir, Şubat 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fatih Demirci

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. (Proje No. 1301S005)

Jüri ve Enstitü Onayı

Gamze Göger 'in "Antimikrobiyal Maddelerin Etkinliğini Arttıran Uçucu Yağ ve Bileşenlerinin Belirlenmesi" başlıklı, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 05.02.2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Fatih Demirci Anadolu Üniversitesi	.....
Üye	Prof. Dr. Neş'e Kırımer Anadolu Üniversitesi	.....
Üye	Prof. Dr. Erdem Yeşilada Yeditepe Üniversitesi	.....
Üye	Doç. Dr. Bülent Ergun Anadolu Üniversitesi	.....
Üye	Doç. Dr. Figen Çalışkan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	.....

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.03.2016 **... tarih ve** 9 **..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Prof. Dr. Dilek Ak
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Gamze Göger

Doğum tarihi ve yeri : 16.05.1984, İstanbul

Uyruğu : T.C

Medeni durumu : Evli

İletişim Adresleri : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir
gamzecayirdere@gmail.com

Eğitim Durumu

İlkokul : 50.Yıl General Refet Bele İlköğretim Okulu (İstanbul, 1991)

Ortaokul : 50.Yıl General Refet Bele İlköğretim Okulu (İstanbul, 1995)

Lise : Süleyman Demirel Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (İstanbul, 1998)

Lisans: : Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü (Bursa, 2002)

Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Farmakognozi ABD (2007)

Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim : Mefar İlaç Sanayi - Mikrobiyoloji Analisti (İstanbul, 05.2010- 08.2012)
Mikrobiyolojik analizler (Bakteriyal endotoksin testi, Sterilite testi, Mikrobiyal identifikasyon, Su analizleri, Spektroskopik Miktar Tayinleri, Nefelometrik Yöntem ile Miktar Tayini, Slot Blot Metodu İle Kalitatif Analiz

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Göger, F., Köse, Y.B., Göger, G., Demirci, F., Phytochemical Characterization of Phenolics by LC-MS/MS and Biological Evaluation of *Ajuga orientalis* L. from Turkey, *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10, 639-644 (2015).

2. Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Characterization and Antimicrobial Evaluation of the Essential Oil of *Pinus pinea* L. from Turkey, *Natural Volites and Essential Oils*, 2 (2), 39-44 (2015).

3. Yurttaş, L, Kaplancıklı, Z.A., Göger, G., Demirci, F.,, Synthesis and Anticandidal Evaluation of New Benzothiazole Derivatives with Hydrazone Moiety, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, pp. 1-7 (2015).

4. Kaplancıklı, Z.A., Altıntop, M.D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Göger, G., Demirci, F., Synthesis and *In Vitro* Evaluation of Some Hydrazone Derivatives as Potential Antibacterial Agents, *Letters in Drug Design & Discovery*, 11 (3), 355-362 (2014).

5. Kaplancıklı Z.A., Yurttaş L., Turan-Zitouni G., Özdemir A., Göger G., Demirci F., Abu Mohsen U. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Pyrimidine-Hydrazones, *Letters in Drug Design & Discovery,* 11, 76-81 (2014).

6. Turan-Zitouni G., Altıntop M.D., Kaplancıklı Z.A.,Özdemir A., Demirci F., Ilgın S., Atlı Ö., Göger G.,Synthesis and evaluation of Thiazole-Pyridine Derivatives as New Anticandidal and Cytotoxic Agents, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48 (7), 452-455 (2014).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan poster ve sözlü bildiriler

1. Demirci, F., Temel, H.E., Akalın, G., Şener, G., Göger, G., İşcan, G., Başer, K.H.C. Inhibitory effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil on Selected Metalloproteinases, 8th Brazilian Symposium on Essential Oils International Symposium on Essential Oils, 10-13, November, 2015, Rio de Janeiro, Brazil.

2. Göger, G., Baysal, M., Ilgın, S., Demirci, B., Demirci, F., *Pinus mugo* Turra. essential oil, its fractions and selective antimicrobial drug combinations against resistant pathogens, 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC), 1-4 October, 2015, Antalya, Türkiye. **(Doktora tezi kapsamında)**

3. Öztürk, G., Demirci, B., Göger, G., Duran, A., Çelik, M., Başer, K.H.C., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Seseli salsuginea* A. Duran et M. Çelik, 11th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (SCNC), 1-4 October, 2015, Antalya, Türkiye.

4. Öztürk,G., Göger, G., Demirci, F., Demirci, B., Synergistic Antibacterial Evaluation of *Coriandri aetheroleum* and Linalool Enantiomers, 59th TEAC /Symposium on Chemistry of Terpens, Essential Oils and Aromatics, 5-7 September 2015, Osaka, Japan.

5. Başer, K.H.C., Göger, G., Demirci, B., Ilgın, S., Demirci, F., *Salvia sclarea* L. essential oil in combination with oxiconazole and terbinafine against human pathogenic Candida species, 59th TEAC /Symposium on Chemistry of Terpenes, Essential Oils and Aromatics, 5-7 September 2015 (Sözlü bildiri). Osaka, Japan.

6. Demirci, F., Göger, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., *Salvia lavandulifolia Vahl.* synergic essential oil combinations against cosmetic pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*, 46th International Symposium on Essential Oils (ISEO 2015), September 13-16, 2015, Lublin, Poland.

7. Sağlık, B.N., Göger, G., Özkay, Y., Demirci, F., Synthesis of Some Novel Benzimidazole Derivatives and Investigation of Their Antimicrobial Activity, Frontiers in Medicinal Chemistry, September 14-16, 2015, Antwerp, Belgium.

8. Polatoğlu, K., Göger, G., Temel, H.E., Demirci, F.,, *In vitro* Biological and Toxicological evaluation of *Lathyrus* sp. Extracts, 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 23-27 August /2015, Budapest, Hungary.

9. Göger, G., Bueno, J., Karaca, N., Göger, F., Demirci, F., Inhibition of Microbial Oral Pathogens by *Eucalyptus* sp. Extracts from Turkey, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12, 2015, Ankara, Türkiye.

10. Göger, F., Göger, G., Köse, Y. B., Demirci, F., Biological and Phytochemical Evaluation of *Ajuga chamaepitys* ssp *palestina* and *Ajuga chamaepitys* ssp *cypria* from Turkey, International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain.

11. Kıyan, H.T., Demirci, B., Göger, G., Demirci, F., Chemical Characterization and Biological Evaluation of the Volatiles of *Alnus glutinosa subsp. barbata* Gaertn. and *A. orientalis var. pubescens* Decne, International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain.

12. Yurttaş, L., Kaplancıklı, Z.A., Demirci, F., Göger, G., Synthesis and anticandidal activity of some 2-mercaptobenzothiazole derivatives**,** International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain.

13. Köse, Y.B., Göger, F., Göger, G., Demirci, F., Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Ajuga genevensis* L. Extract, International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain.

14. Göger, G., Demirci, B., Demirci, F., Characterization of the Chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil, its fractions and antimicrobial effects in combination with antimicrobial agents, International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain. **(Doktora tezi kapsamında)**

15. Demirci, F., Göger, G., Ilgın, S., Ergun, B., Demirci, B., Caraway (*Carum carvi* L.) essential oil combinations with antifungal drugs against *Candida* sp. and cytotoxicity assesment; International Conference on Antimicrobial Research, 1-3 October, 2014, Madrid, Spain.

16. Göger, G., Ilgın, S., Demirci, F., Göger, F., Kırımer, N., Demirci, F., *Pimpinella anisum* L. essential oil and combination with antifungal drugs against *Candida* species and cytotoxicity of selected compounds. 45th ISEO, International symposium on Essential oils; 07-10 September, 2014, İstanbul, Türkiye.

17. Karakaya, S., Polat, D.Ç., Göger, G., Demirci, B., Çoşkun, M., Başer, K.H.C., Essential oil composition of the aerial parts of *Ferula orientalis* L. and determination of its antimicrobial properties by bioautography, 45th ISEO, International symposium on Essential oils; 07-10 September, 2014 İstanbul, Türkiye.

18. Delimustafaoğlu, F.G., Ekşi, G., Göger, G., Kılıç, C.S., Demirci, B., Başer, K.H.C. Compostion of volatile of the roots of *Ferulago sandrasica* Peşmen & Quezel (Apiaceae) growing in Turkey and determination of its antimicrobial properties by biautography, 45th ISEO, International symposium on Essential oils; 07-10 September, 2014, İstanbul, Türkiye.

19. Mokhtarzadeh, S., Demirci, B., Göger, G., Mahmood, K., Kırımer, N., Determitation of essential oil components in *Melissa officinalis* L. under *in vitro* conditions, 45th ISEO, International symposium on Essential oils; 07-10 September, 2014 İstanbul, Türkiye.

20. Göger, G., Akçal, B., İşcan, G., Fatih Demirci, Synergistic anticandidal evaluation of commercial *Lavandula* oils in combination with ketoconazole; International Multidisiplinary Symposium on Drug Research and Development, 28-30 November, 2013, Antalya, Turkey.

21. Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., Başer, K.H.C., Characterization and Antimicrobial Evaluation of the Essential Oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. 44th International Symposium on Essential Oils, 8-13 September, 2013, Budapest, Hungary.

22. Göger, G., Göger, F., Demirci, F., Antimicrobial evaulation of *Melissa officinalis* and *Matricaria recutita* tinctures. Workshop on Plant Product Chemistry and the International Symposium on Medicinal & Aromatic Plants, 4-7 June, 2013, İzmir, Türkiye.

23. Demirci, F., Temel, H.E., Çayırdere, G., Berber, H., İşcan, G., Başer, K.H.C., The inhibition of acetylcholine- / butrylcholinesterases and lipoxygenase by p-cymene derivatives. 9 th Internatıonal Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23-26 June, 2009, Ankara, Türkiye.

24. Demirci, F., Çayırdere, G., Demirci, B., Göger, F., İşcan, G., Başer, K.H.C., Essential oil composition and antimicrobial activity of *Cedrus libani* A. Rich from Turkey, 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, 17-19, June, 2009, Eskişehir, Türkiye.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Yurttaş, L., Özkay, Y., Demirci, F., Göger, G., Ulusoylar-Yıldırım, Ş., Mohsen, U.A., Öztürk, Ö., Kaplancıklı, Z.A. Synthesis, Anticandidal Activity and Cytotoxicity of some Thiazole Derivatives with Dithiocarbamate Side Chains, *Turkish Journal of Chemistry*, 38: 815-824 (2014).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan poster bildiriler

1. Kuş, G., Özkurt, M., Kabadere, S., Demirci, F., Göger, G., Thymoquinone inhibits the proliferation and ınduces apoptosis of cancer cell *in vitro*, Turkish Society of Physiological Sciences, 41 st National Physiology Congress (Sözlü Bildiri), 09-13 September, 2015, Çanakkale, Türkiye.
2. Öztürk, G., Demirci, B., Göger, G., Göger, F., Demirci, F., Ardıç, Çam ve Biberiye Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal ve Antioksidan Özellikleri**,** 5. Kozmetik Kimyası, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, 6-8 Şubat, 2015, Antalya, Türkiye.

3. Göger, G., Demirci, B., Demirci, F., Uçucu Yağ Kombinasyonlarının Cilt Patojenlerine Karşı Sinerjik Antibakteriyel Etkinlikleri, 5. Kozmetik Kimyası, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, 6-8 Şubat, 2015, Antalya, Türkiye.

4. Demirci, B., Göger, G., Demirci, F., Sitronella Uçucu Yağı ve Farklı Kombinasyonlarının Akne Patojenine Karşı Sinerjik Etkinliği, 5. Kozmetik Kimya, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, 6-8 Şubat, 2015, Antalya, Türkiye.

5. Göger, G., Akçal Çomoğlu, B., Demirci, F., Ticari Lavanta Uçucu Yağlarının *Propionibacterium acnes* Suşlarına Karşı Etkinliği; 22.Ulusal Biyoloji Kongresi; 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.

6. Göger, G., Yetimoğlu, N., Büyükkılıç, B., Demirci, B., Demirci, F., Farmakope Kalitesindeki *Eucalyptus globulus* Labill. Uçucu Yağının *in vitro* Antibakteriyal, Antioksidan ve Antienflamatuvar Etkinliklerinin Değerlendirilmesi; XXI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 28.05-01.06.2014, Nevşehir, Türkiye.

7. Temel, H.E., Demirci, F., Çayırdere, G., Kırımer, N., Farklı organik çözücülerin kolinesterazlar üzerindeki etkileri, XVI. Biyoteknoloji kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya, Türkiye.

8. Demirci F., Çayırdere G., Bütün S., İşcan G.,Kırımer N., Başer K.H.C, Timokinonun fungal biotransformasyonu, 18.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 16-18 Ekim, 2008, İstanbul, Türkiye.

Kitap Bölümü

1. Demirci, F., Temel, H.E., Çayırdere, G., Berber, H., İşcan, G., Baser, K.H.C., The Inhibition of Acetylcholine-, Butrylcholinesterases and Lipooxygenase by *p*-Cymene Derivatives, in: Prof. M. Iqbal Choudhary, Personality and Achievements (A Tribute for the 50th Birthday), Atta-ur-Rahman, M. Alam (Editors), Karachi, pp 45-58., 2010.

Projeler

1. Antimikrobiyal Maddelerin Etkinliğini Arttıran Uçucu Yağ ve Bileşenlerinin Belirlenmesi- BAP 1301S005- (Doktora Tez Projesi) Araştırmacı; 2013.
2. Doğal Maddelerin Kimyasal ve Biyolojik İncelenmesi; 1306S240; Araştırmacı, 01.09.2013-01.09.2014.
3. Terpenlerin Lakkaz ile Biyotransformasyonu BAP No:1404S110- Araştırmacı, 02.06.2014-02.06.2015.
4. Hidrazon Kalıntısı İçeren Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi ve Antifungal Etkilerinin Araştırılması, BAP 1403S066; Araştırmacı, 07.04.2014-Ocak 2015.
5. Standart Antifungal Etken Madde ve Uçucu Yağ Kombinasyonlarının Seçici Olarak Dirençli *Candida* Türlerine Karşı Sinerjik Etkinlikleri, TÜBİTAK - SBAG 113S250 – Görev: Bursiyer, 0.1.10.2013-01.10.2015
6. Biyokatalizörler yardımıyla p-simenden timokinon ve benzeri biyoaktif metabolitlerin üretimi-TUBITAK- TBAG-106T117, Görev: Bursiyer (08. 2007- 07. 2009).

Ödül

En iyi poster ödülü; Demirci, B., Göger, G., Demirci, F., Sitronella Uçucu Yağı ve Farklı Kombinasyonlarının Akne Patojenine Karşı Sinerjik Etkinliği, 5. Kozmetik Kimya, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, 6-8 Şubat, 2015, Antalya, Türkiye.

Katılınan kurslar ve eğitim programları

1. Workshop on Plant Products Chemistry: Structural Elucidation of Natural Products – Spectral Interpretation (1- and 2D NMR, and MS) An Intensive Course, Kaya Thermal Hotel - Balcova Izmir, (4-5 June 2013).

2. Quality Control of Analysis Training: Technology transfer of Prevenar 13 vaccine from Pearl River to Turkey. Nephelometry Analysis Method and Slot Blot Method training for Prevenar 13 vaccine. Pfizer Pharmaceutical Company New York / USA (12.03.2011-28.03.2011).

3. Vitek 2 Compact Instrument Applicatıon Training: Biomeriux - Mikroorganizma İdentifikasyonu Yöntemi (13.07.2010- 14.07.2010)

4. Bitki Çizim Kursu: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (40 Saat) (25.01.2010 - 29.01.2010).

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim süresince ve çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşan, sabrı ve anlayışıyla bana örnek olan sevgili danışman hocam, Prof. Dr. Fatih Demirci'ye,

Çalışmalarımın tamamını yaptığım Farmakognozi Anabilim Dalı araştırma laboratuvarının olanaklarını kullanmama izin veren ve desteğini her zaman hissettiğim Anabilim Dalı başkanı hocam Prof. Dr. Neş'e Kırımer'e,

Engin tecrübe ve bilgisiyle her konuda yardımcı olan hocam Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer'e,

Çalışmalarım sırasında GK/KS analizlerimi gerçekleştiren Prof. Dr. Betül Demirci'ye,

Sitotoksisite çalışmalarının gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sinem Ilgın'a,

Tez projesinin desteklenmesinde katkıda bulunan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı (BAP Proje No. 1301S005) ve Tübitak 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Program'ına (Proje No. 113S250),

Tez kapsamında bazı antibiyotik ve antifungal maddelerin temin edilmesinde destek veren Deva İlaç Şirketi'ne,

Tez kapsamında kullanılan klinik mikroorganizmaları temin etmemde yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne,

Bilgi ve tecrübeleriyle ile bana yol gösteren ve tüm çalışmalarım sırasında her türlü manevi desteği gördüğüm sevgili eşim, Uzm. Dr. Fatih Göger'e,

Manevi desteğini hep hissttiğim sevgili ikizim Volkan Çayırdere'ye, eğitim ve öğretim hayatımda beni hep destekleyen, sevgili Babam'a ve bugünlere gelmem de büyük emeği olan rahmetli Annem'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN ETKİNLİĞİNİ ARTTIRAN UÇUCU YAĞ VE BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Bu tez projesi kapsamında antibiyotiklere dirençli Gram (+) *Staphylococcus aureus*; Gram (-) *Escherichia coli* ve antifungal ilaçlara duyarlı *Candida albicans* klinik ve standart suşları olmak üzere altı farklı hedef patojen seçilmiştir. Antimikrobiyal etkinlik testlerinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) *in vitro* mikrodilüsyon yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. Doğal antimikrobiyal madde olarak, öncelikle Avrupa Farmakope kalitesinde *Matricaria recutita* L., *Lavandula latifolia* Medik., *Pinus mugo* Turra, *Citrus reticulata* Blanco. uçucu yağları (Aetheroleum) seçilmiştir. Etkinliği arttırmak amacıyla uçucu yağlar sırasıyla kolon kromatografisiyle *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanolle fraksiyonlanmıştır. Antimikrobiyal deneylerde ayrıca uçucu yağların ana bileşenlerinden *R*-(+)-limonen, (+)-linalol, 1,8-sineol, (±)-kafur, *β*-karyofillen, *α*- pinen, (-)-*β*-pinen, *γ*-terpinen, farnasen, bisabolol ve (+)-δ-3-karen kullanılmıştır. Test materyallerinin ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin standart antimikrobiyal maddeleriyle farklı kombinasyonlarının etkileşimleri dama tahtası yöntemiyle sinerjik etkinlikleri açısından incelenmiştir.

Tüm test numunelerinin dirençli mikroorganizmalara karşı etkinlikleri minimum inhibisyon konstrastrasyonu (MİK) olarak belirlenmiştir. Kombinasyon sonuçları, fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri şeklinde sinerjik, aditif, bağımsız etki veya antagonist etkili olarak sınıflandırılmıştır.

Aktif fraksiyon-antimikrobiyal madde kombinasyonu seçici toksisitesi karşılaştırmalı olarak değerlendirmek üzere *in vitro* WS1-XTT sitotoksisite (insan cilt fibroblast hücre dizileri) ve biyolüminesans yöntemiyle *Aliivibrio fischeri* NRRL B 11177 suşuna karşı çalışılmıştır.

Sonuç olarak, tasarlanan doğal madde kombinasyonların sinerjik/aditif etkinlikleri ilk defa bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Etkinlikler değerlendirildiğinde, toplam 54 sinerjik, 75 aditif ve 108 adet bağımsız etkili antimikrobiyal kombinasyon aktivite sonucu elde edilmiştir. Genel olarak oluşturulan uçucu yağ kombinasyonları, *in vitro* antimikrobiyal aktivite açısından daha etkin ve daha az toksik olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik dirençli bakteri, *Candida albicans*, Uçucu yağlar, Kombinasyon çalışmaları, Dama tahtası yöntemi, Sinerjik etki.

DETERMINATION OF ESSENTIAL OILS AND COMPONENTS FOR INCREASING EFFECTIVENESS OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES

ABSTRACT

In the frame of this project, six clinical and standard pathogenic drug resistant strains, namely; Gram (+) *Staphylococcus aureus*, Gram (-) *Escherichia coli* and antifungal susseptible *Candida albicans* were used as *in vitro* antimicrobial targets using the modified CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) microdilution method. European Pharmacopoiea grade *Matricaria recutita* L., *Lavandula latifolia* Medik., *Pinus mugo* Turra, *Citrus reticulata* Blanco. essential oils (Aetheroleum) were used as natural antimicrobials. Essential oil fractions by column chromtography using *n*-hexane, diethyl ether, dichloromethane and methanol, respectively were used to increase the antimicrobial activity. Addiditonally, some components such as *R*-(+)-limonene, (+)-linalool, 1,8-cineole, (±)- camphor, *β*-caryophyllene, *α*-pinene, (-)-*β*-pinene, *γ*-terpinene, farnesene, bisabolol and (+)-δ-3-carene were used. The standard antimicrobials ampicillin, sefuroxime, tetracycline, fluconazole, nystatin were combined with the essential oils or derived test materials using the Checkerboard method.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined using the microdilution method, fractional inhibitory concentrations (FIC) of the combinations were classified as synergistic, additive, indifferent, and antagonistic, respectively, for all the tested materials against the microorganisms.

In addition, the active combinations were subjected to *in vitro* WS1-XTT cytotoxicity (human skin fibroblasts) and bioluminescent *Aliivibrio fischeri* NRRL B 11177 toxicity assays to determine the selectivity profile comparatively.

As a conclusion, this is the first report on the synergistic/additive activity of the designed essential oil combinations. Overall, 54 synergistic, 75 additive, and 108 indifferent activity results towards the efficacy were observed, where the toxicity was lowever.

Key words: Antibiotic resistant bacteria, *Candida albicans*, Essential Oils, Combination studies, Checkerboard method, Synergistic effect.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri	3
***Matricaria recutita* L. uçucu yağı (Matricariae aetheroleum)**	3
***Lavandula latifolia* Medik. uçucu yağı (Spicae aetheroleum)**	7
***Pinus mugo* Turra. uçucu yağı (Pini pumilionis aetheroleum)**	9
***Citrus reticulata* Blanco. uçucu yağı (Citri reticulatae aetheroleum)**	11
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ Bileşenleri	14
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bazı Dirençli Mikroorganizmalar ve Patojeniteleri	15
Staphylococcus aureus ve antibiyotik direnci	15
Escherichia coli ve antibiyotik direnci	15
Candida albicans ve antifungal ilaçlara direnç	15
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Antibakteriyel ve Antifungal Etken Maddeler	16
Ampisilin	16

Sefuroksim 17

Tetrasiklin 17

Flukonazol 18

Nistatin 18

Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları 19

Uçucu Yağ Bileşenlerinin Biyosentezleri ve Biyolojik Etkileri 20

Uçucu Yağ Analizi ve Kromatografisi 20

Uçucu Yağ Antimikrobiyal Aktivite Yöntemleri 21

Difüzyon Testleri 21

Disk difüzyon testi 21

Agar difüzyon testi 21

Dilüsyon Testleri 21

Tüp dilüsyon 21

Agar dilüsyon 22

Biyootografi (İTK) Yöntemi 22

Antimikrobiyal Kombinasyon Çalışmaları 22

Kombinasyon Yöntemleri 23

Dama tahtası 23

Zamana bağlı-öldürme eğrisi (Time kill curve) 24

E-test 24

Uçucu Yağ ve Standart İlaç Etken Madde Kombinasyonları 24

***In vitro* Toksisite Test Çalışmaları** 33

Uçucu Yağ Toksisite Çalışmaları 33

WS1-XTT toksisite testi 34

Aliivibrio fischeri biyolüminesans toksisite testi 34

GEREÇLER ve YÖNTEMLER 35

GEREÇLER 35

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Maddeler Besiyerleri, Standart Antibakteriyel ve Antifungal İlaçlar ve Cihazlar 35

Kimyasal maddeler ve çözücüler 35

Cihazlar 35

Tez kapsamında kullanılan uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri 36

Standart antibakteriyel ve antifungal ilaç etken maddeleri 36

Mikroorganizmalar 36

Besiyerleri 37

YÖNTEMLER 38

Kromatografik-Spektroskopik Yöntemler 38

Uçucu yağların gaz kromatografisi / alev iyonlaşma dedektörü (GK/AİD) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ile analizi 38

GK/AID analiz koşulları 38

GK/KS analiz koşulları 38

Kolon Kromatografisi (KK) ile Uçucu Yağların Fraksiyonlanması 38

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) 39

Antimikrobiyal Aktivite Yöntemleri 39

Standart antibakteriyel ve antifungal ilaç etken maddeleri ve hazırlanışı 39

Antifungal ilaç etken maddelerinin hazırlanması 39

Antibakteriyel ilaç etken maddelerinin hazırlanması 40

Uçucu yağların hazırlanması 40

Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Test Yöntemi 41

Üreme kontrol indikatörünün hazırlanması (Resazurin reaktifi) 42

Kombinasyon Çalışmaları : Dama Tahtası Yöntemi 42

***In vitro* Sitotoksite Çalışmaları** 44

WS1-XTT sitotoksisite test yöntemi 44

WS1 hücrelerinin çoğaltılması 44

WS1 hücrelerinin plakalara ekilmesi 45

WS1 hücrelerine XTT sitotoksisite testinin uygulanması 45

***Aliivibrio fischeri* Biyolüminesans Toksisite Test Yöntemi** 46

BULGULAR ve TARTIŞMA 48

***MATRICARIA RECUTITA* UÇUCU YAĞI** 48

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri 48

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%) 50

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları 51

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları 51

Dama tahtası yönteminin sonuçları 52

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları 58

***Aliivibrio fischeri* Toksisite Test Sonuçları** 60

***LAVANDULA LATIFOLIA* UÇUCU YAĞI** 62

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri 62

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%) 64

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları 65

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları 65

Dama tahtası yönteminin sonuçları 66

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları 75

***Aliivibrio fischeri* Toksisite Test Sonuçları** 77

***PINUS MUGO* UÇUCU YAĞI** 79

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri 79

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%) 81

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları 82

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları 82

Dama tahtası yönteminin sonuçları 83

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları 91

***Aliivibrio fischeri* Toksisite Test Sonuçları** 92

***CITRUS RETICULATA* UÇUCU YAĞI** 95

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri 95

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%) 98

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları 98

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları 98

Dama tahtası yönteminin sonuçları 100

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları 109

***Aliivibrio fischeri* Toksisite Test Sonuçları** 111

SONUÇ ve ÖNERİLER 114

KAYNAKLAR 121

EK 1 *MATRICARIA RECUTITA* UÇUCU YAĞI (Matricaria aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0) 140

EK 2 *LAVANDULA LATIFOLIA* UÇUCU YAĞI (Spicae aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0) 141

EK 3 *PINUS MUGO* UÇUCU YAĞI (Pini pumilionis aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0) 142

EK 4 *CITRUS RETICULATA* UÇUCU YAĞI (Citri reticulatae aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0) 143

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI **SAYFA**

Şekil 1	*Matricaria chamomilla* L.	3
Şekil 2	*Matricaria recutita* uçucu yağındaki ana maddeler	4
Şekil 3	*Lavandula latifolia* Medik.	7
Şekil 4	*Lavandula latifolia* uçucu yağındaki ana maddeler	8
Şekil 5	*Pinus mugo* Turra.	9
Şekil 6	*Pinus mugo* uçucu yağındaki ana maddeler	10
Şekil 7	*Citrus reticulata* Blanco.	11
Şekil 8	*Citrus reticulata* uçucu yağındaki ana maddeler	12
Şekil 9	Antifungal maddelerin etki mekanizmaları	19
Şekil 10	Antibakteriyel maddelerin etki mekanizmaları	19
Şekil 11	Biyolüminesans oluşumu	34
Şekil 12	Dama tahtası yönteminin uygulanma şekli	43
Şekil 13	Antimikrobiyal aktivite testleri-otomatik pipetleme sistemi	44
Şekil 14	Toksisite ölçümleri - lüminometre cihazı	46
Şekil 15	Çalışma şeması	47
Şekil 16	*Matricaria recutita* uçucu yağına ait ana maddelerin kromatogramı	50
Şekil 17	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonları	51
Şekil 18	*Matricaria recutita* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları	56
Şekil 19	*Matricaria recutita* uçucu yağ kombinasyonlarının *A. fischeri* % inhibisyon sonuçları	61
Şekil 20	*Lavandula latifolia* uçucu yağına ait ana maddelerin kromatogramı	64
Şekil 21	*Lavandula latifolia* uçucu yağ fraksiyonları	64

Şekil 22 *Lavandula latifolia* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara ait % dağılım oranları 75

Şekil 23 *Lavandula latifolia* uçucu yağ kombinasyonlarının *A. fischeri* % inhibisyon sonuçları 78

Şekil 24 *Pinus mugo* uçucu yağına ait ana maddelerin kromatogramı 81

Şekil 25 *Pinus mugo* uçucu yağına ait fraksiyonlar 82

Şekil 26 *Pinus mugo* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları 90

Şekil 27 *Pinus mugo* uçucu yağ kombinasyonlarının *A. fischeri* % inhibisyon sonuçları 94

Şekil 28 *Citrus reticulata* uçucu yağına ait ana bileşiklerin kromatogramı 97

Şekil 29 *Citrus reticulata* uçucu yağına ait fraksiyonlar 98

Şekil 30 *Citrus reticulata* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları 108

Şekil 31 *Citrus reticulata* uçucu yağ kombinasyonlarının *A. fischeri* % inhibisyon sonuçları 112

Şekil 32 Uçucu yağlara ait karşılaştırmalı genel antimikrobiyal kombinasyon dağılımı 118

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI **SAYFA**

Çizelge 1	*Matricaria recutita* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları	5
Çizelge 2	*Lavandula latifolia* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları	8
Çizelge 3	*Pinus mugo* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış aktivite çalışmaları	10
Çizelge 4	*Citrus reticulata* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları	12
Çizelge 5	Uçucu yağ ve bileşenleri ile antifungal madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar	25
Çizelge 6	Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar	28
Çizelge 7	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler	35
Çizelge 8	Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	35
Çizelge 9	Kombinasyon çalışmalarında kullanılan uçucu yağ bileşenleri	36
Çizelge 10	İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri	39
Çizelge 11	Standart antifungal maddeler için hazırlanan test konsantrasyonları	39
Çizelge 12	Antibiyotikler için hazırlanan mikrodilüsyon test konsantrasyonları	40
Çizelge 13	*Escherichia coli* için MİK değerleri (sınır değerleri)	40
Çizelge 14	*Staphylococcus aureus* için MİK değerleri (sınır değerleri)	40
Çizelge 15	Uçucu yağlar için hazırlanan konsantrasyonlar	40
Çizelge 16	*Matricaria recutita* uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri	48
Çizelge 17	*Matricaria recutita* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri	50

Çizelge 18	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı MİK değerleri (µg/mL)	51
Çizelge 19	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı MİK değerleri (µg/mL)	51
Çizelge 20	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus*'a karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)	53
Çizelge 21	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Escherichia coli*'ye karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)	54
Çizelge 22	*Matricaria recutita* uçucu yağının *Candida albicans* suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)	55
Çizelge 23	*Matricaria recutita* uçucu yağına ait kombinasyonların % dağılımı	55
Çizelge 24	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar	58
Çizelge 25	Standart ilaç etken maddelerine ait $İK_{50}$ (µg/mL)	59
Çizelge 26	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)	59
Çizelge 27	*Matricaria recutita* uçucu yağ ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)	59
Çizelge 28	*Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları	60
Çizelge 29	*Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri	62
Çizelge 30	*Lavandula latifolia* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri	64
Çizelge 31	*Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)	65
Çizelge 32	*Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)	65
Çizelge 33	*Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)	67

Çizelge 34 Klinik *S. aureus* suşuna karşı *n*-hekzan fraksiyonunun ana bileşiklerine ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 68

Çizelge 35 Klinik *S. aureus* suşuna karşı dietil eter fraksiyonunun ana bileşiklerine ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 69

Çizelge 36 *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Escherichia coli* suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL) 70

Çizelge 37 Klinik *E. coli* suşuna karşı *n*-hekzan fraksiyonunun ana bileşiklerine ait FİKİ sonuçları (µg/mL) 71

Çizelge 38 Klinik dirençli *Escherichia coli* suşuna karşı dietil eter fraksiyonlarına ait ana bileşiklerin FİKİ sonuçları (µg/mL) 72

Çizelge 39 *Lavandula latifolia* uçucu yağının *Candida albicans* suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL) 73

Çizelge 40 Klinik *Candida albicans* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait FİKİ sonuçları (µg/mL) 74

Çizelge 41 *Lavandula latifolia* uçucu yağına ait kombinasyonların % dağılımı 74

Çizelge 42 *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar 75

Çizelge 43 Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 76

Çizelge 44 *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 76

Çizelge 45 *Lavandula latifolia* uçucu yağ ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 76

Çizelge 46 *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları 77

Çizelge 47 *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri 79

Çizelge 48 *Pinus mugo* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri 81

Çizelge 49 *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL) 83

Çizelge 50 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL) 83

Çizelge 51 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına FİKİ sonuçları (µg/mL) 84

Çizelge 52 Klinik *S. aureus* suşuna karşı bazı uçucu ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 86

Çizelge 53 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Escherichia coli* suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL) 87

Çizelge 54 Klinik *Escherichia coli* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 88

Çizelge 55 *Pinus mugo* uçucu yağının *Candida albicans* suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL) 89

Çizelge 56 *Pinus mugo* uçucu yağına ait kombinasyonların suşlara göre % dağılım oranı 90

Çizelge 57 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar 91

Çizelge 58 Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 91

Çizelge 59 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 92

Çizelge 60 *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlarana ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 92

Çizelge 61 *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları 93

Çizelge 62 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri 95

Çizelge 63 *Citrus reticulata* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri 98

Çizelge 64 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL) 99

Çizelge 65 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL) 99

Çizelge 66 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına FİKİ sonuçları (µg/mL) 101

Çizelge 67 Klinik dirençli *Staphylococcus aureus* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 103

Çizelge 68 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *Escherichia coli* suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL) 104

Çizelge 69 Klinik *Escherichia coli* suşuna karşı bazı uçucu ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL) 106

Çizelge 70 *Citrus reticulata* uçucu yağının *Candida albicans* suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL) 107

Çizelge 71 Klinik *Candida albicans* suşuna karşı *γ*-terpinen ve nistatin kombinasyon sonucu (µg/mL) 108

Çizelge 72 *Citrus reticulata* uçucu yağına ait kombinasyon sayısı ve aktivite sonuçlarının % dağılımı 108

Çizelge 73 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar 109

Çizelge 74 Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 109

Çizelge 75 *Citrus reticulata* uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 110

Çizelge 76 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlarana ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL) 110

Çizelge 77 *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları 111

Çizelge 78 Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri 115

Çizelge 79 Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Escherichia coli* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri 116

Çizelge 80 Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Candida albicans* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri 117

Çizelge 81 Uçucu bileşiklerin klinik *Staphylococcus aureus* suşlarına FİKİ değerleri 118

Çizelge 82 Uçucu yağ ve fraksiyonlarının WS1 hücrelerine ait $İK_{50}$ değerleri 120

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
BCCM	: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms
CECT	: Spanish Type Culture Collection
CIP	: The Collection of Institut Pasteur
CCM	: Czech Collection of Microorganisms
CFU	: Colony Forming Unit (=Koloni oluşturan birim)
CGMCC	: China General Microbiological Culture Collection Center
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMST	: Department of Medical Sciences Thailand
dak.	: Dakika
DSM	:Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
e	: Eser miktar (<% 0.1)
EMEM	: Eagle Minimum Essential Medium (Besi yeri)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FCBP	: First Fungal Culture Bank of Pakistan
FİK	: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu
FİKİ	: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksi
g	: Gram
GK/AİD-GK/KS	: Gaz kromatografisi alev iyonlaşma dedektörü /Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
Gr (+)	: Gram pozitif
Gr (-)	: Gram negatif
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu β-laktamaz
$İK_{50}$	: % 50 inhibisyon konsantrasyonu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi

KK	: Kolon Kromatografisi
KMHB -II	: Katyon ilaveli Mueller Hinton Broth 2
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
MTCC	: Microbial Type Culture Collection
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaCl	: Sodyum klorür
NRRL	:Northern Regional Research Laboratory
PDA	: Patates Dektroz Agar
PFCC	: Plant Fungi Culture Collections
PTCC	: Persian Type Culture Collection
RRI	: Relatif tutunma indeksi
RCMB	: The Regional Center for Mycology and Biotechnology
s	: Saat
SPA	: Subrapubic aspirate
TISTR	: Thailand Institute of Scientific and Technological Research
XTT	: 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksi anilit tuzu
YBSK	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
WS1	: Normal insan cilt fibroblast hücresi

GİRİŞ ve AMAÇ

Uçucu yağlar farklı kimyasal bileşenleri içeren karmaşık yapıda karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir. Biyolojik etkileri arasında antimikrobiyal, antifungal, antiviral vb. etkileri bilinen ve dikkat çeken özelliklerinden bazılarıdır (Sienkiewicz ve ark., 2012; Prakash ve ark., 2012; de Rapper ve ark., 2013; Pinto ve ark., 2013a; Pinto ve ark., 2013b; Roby ve ark., 2013; Shojaee-Aliabadi ve ark., 2013; Varona ve ark., 2013; Astani ve ark., 2014; Böhme ve ark., 2014; Civitelli ve ark., 2014; Gilling ve ark., 2014; Teixeira ve ark., 2014).

Son yıllardaki antimikrobiyal maddelerin yanlış kullanımı nedeniyle, antibiyotik ve antifungal dirençli veya duyarlı mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlardaki artıştan dolayı yeni etkin ilaçların araştırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Antibakteriyel ve antifungal maddelerin bazı doğal ekstre veya maddeler ile birlikte kullanımları sonucu sinerjik etkiden yararlanarak mikroorganizmalara karşı direnç gelişimini önlemek ve daha düşük dozda uygulanmaları ile yan etki olasılığını azaltmak amacıyla kombinasyon çalışmaları ilgi çekmektedir. Bu yaklaşımlar arasında uçucu yağ ile antibakteriyel ve antifungal maddelerin kombinasyon çalışmaları son yıllarda giderek artış göstermektedir (Giordani ve ark., 2004; Rodrigues ve ark., 2009; Ahmad ve ark., 2010; Amber ve ark., 2010; Khan ve ark., 2012; Ahmad ve ark., 2014).

Bu tez kapsamında, direnç kazanmış klinik izolatlardan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve bu suşlara ait standart (ATCC= American Type Culture Collection= Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu) suşlar olmak üzere 6 farklı mikroorganizmaya karşı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) mikrodilüsyon metodu uyarlanmıştır. Avrupa Farmakope kalitesindeki dört farklı uçucu yağ, beş farklı antimikrobiyal maddenin antimikrobiyal etkinliği ve sonrasında uçucu yağların standart antimikrobiyal maddelerle kombinasyonları Dama tahtası (Checkerboard) yöntemiyle çalışılmıştır. Farmakope kalitesinde *Citrus reticulata* Blanco. (Mandalina), *Lavandula latifolia* Medik. (Sivri lavanta), *Pinus mugo* Turra. (Bodur çam) ve *Matricaria recutita* L. (Alman Papatyası) uçucu yağlarının yanı sıra bazı uçucu yağ ana bileşenleri; *R*-(+)-limonen, (+)-linalol, 1,8-sineol, (±)-kafur, *β*-karyofillen, *α*-pinen, (-)-*β*-pinen, *γ*-terpinen, farnesen, bisabolol ve (+)-δ-3-karen ile birlikte antimikrobiyal maddelerden ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin ile sekiz farklı kombinasyonunun etkileşimleri incelenmiştir.

Farmakopeler, ilaç hammadde ve preparatlarda kalite standartlarını tanımlayan monografların ve analizde kullanılan yöntemler ile cihazların yer aldığı kitaplardır. Avrupa Farmakopesi ilaç etken maddelerinde olduğu gibi uçucu yağlar gibi bitkisel preparatlar konusunda da ilgili standartları ve kalite paramatrelerini düzenli olarak güncellemektedir. Tez konusu kapsamında, eğer başka bir şekilde belirtilmemişse en güncel Avrupa Farmakopesi (Ph.Eur 8.0) kısaca "farmakope" olarak tanımlanmıştır.

Sinerjik etkiden sorumlu kimyasal madde / madde gruplarını belirlemek amacıyla uçucu yağlar kolon kromatografisi yöntemi kullanılarak polariteye göre sırasıyla; *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanarak tekrar dama tahtası yöntemiyle yapılan kombinasyonları antimikrobiyal etkinlik açısından değerlendirilmiştir.

Aktif fraksiyonun kimyasal kompozisyonu GK/AİD ve GK/KS analizleri ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal maddeler ile uçucu yağ fraksiyonlarının dirençli mikroorganizmalara karşı etkinlikleri MİK olarak belirlenmiştir. Kombinasyon sonuçları FİKİ değerleri olarak belirtilmiş sinerjik, aditif, bağımsız etki veya antagonist olarak değerlendirilmiştir.

Mikroorganizmaların direnç gelişimine yönelik alternatif farklı modeller araştırılırken aynı zamanda insan hücrelerine zararlı etkilerinin olmaması beklenir. Bu sebepten dolayı aktif olarak belirlenen fraksiyonların (Sinerjik /aditif etkili) sitotoksisite çalışmaları; *in vitro* WS1-XTT sitotoksite testi ve *Aliivibrio fischeri* NRRL B 11177 suşuna karşı biyolüminesans toksisite testi olmak üzere 2 farklı yöntem ile incelenmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Bu bölümde tez kapsamında çalışılan famakope kalitesindeki uçucu yağlarla ilgili genel özellikler, antibakteriyel ve antifungal maddelerin özellikleri, uçucu yağ, bileşenleri ve standart ilaç etken madde kombinasyonlarıyla yapılan çalışmalar, ayrıca çalışmalarda kullanılan mikroorganizmaların özellikleriyle sebep oldukları enfeksiyonlar üzerine yapılmış güncel literatür bilgileri ve araştırmalar derlenip özetlenmiştir.

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri

Matricaria recutita L. uçucu yağı (Matricariae aetheroleum)



Şekil 1. ***Matricaria recutita*** **L. (http-1)**

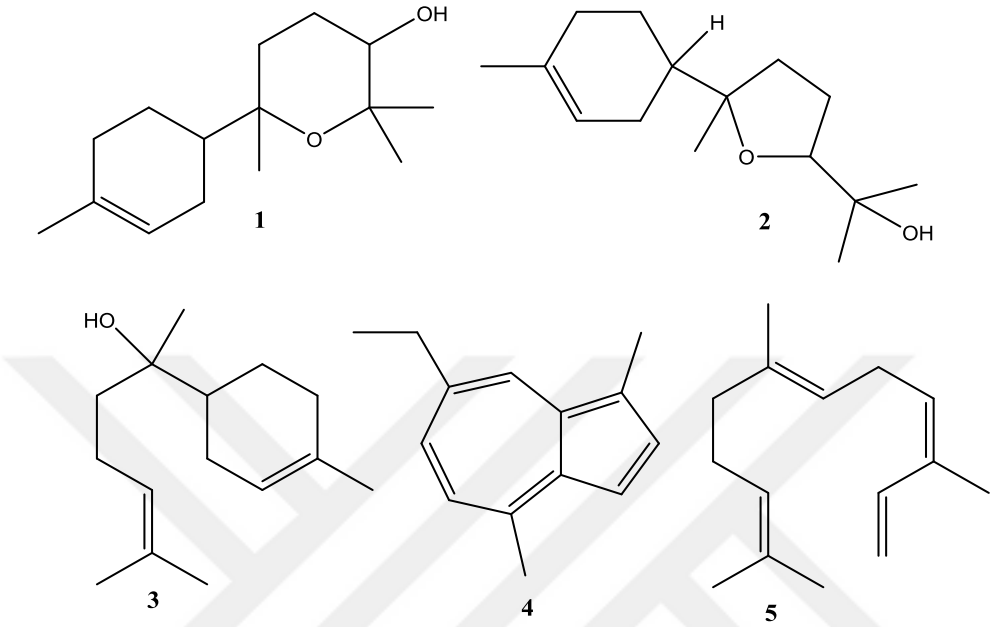
Asteraceae familyasına ait *Matricaria recutita* L. [sin *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] Alman papatyası ülkemizde de Mayıs papatyası olarak bilinmektedir. 10-30 cm yüksekliğinde, çok dallı, yaprakları parçalı tüysüz, çiçekleri küçük başlar (kapitulum) şeklinde olan tek yıllık otsu bir bitkidir. Genellikle bitki Kuzey Avrupa'ya özgü olup, yabani olarak orta Avrupa ülkelerinde yetişmektedir. Ayrıca Batı Asya, Kuzey Afrika, Akdeniz Bölgesi ve Amerika Birleşik Devletleri'nde de yetişmektedir. Birçok ülkede kültürü yapılmaktadır (Franke ve Schilcher, 2005; Srivastava ve ark., 2010; Singh ve ark., 2011).

Mavi renkli uçucu yağ, *M. recutita* bitkisinin taze veya kurutulmuş çiçek başları veya çiçekli kısımlarının buhar distilasyonu ile elde edilir. Farmakope'ye göre papatya çiçeği en az 4 mg/kg karakteristik mavi renkli uçucu yağ içermelidir.

Avrupa Farmakopesi'nde kimyasal içerik açısından 2 tip *M. recutita* uçucu yağı tanımlanmıştır: 1) Bisabolol oksitler veya 2) (-)-*α*-Bisabolol maddeleri açısından zengin olan papatya uçucu yağları şeklinde. Bisabolol oksitler açısından zengin olan *M. recutita* uçucu yağında; bisabolol oksitler (% 29-81) ve kamazulen (≥ % 1) tanımlanmış oranlarda olmalıdır. (-)-*α*-Bisabolol maddesince zengin *M. recutita* uçucu yağları ise (-)-*α*-bisabolol (% 10-65), kamazulen (≥ % 1) ve bisabolol oksitlerin ve (-)-*α*-bisabolol maddelerinin toplamı oransal olarak en az % 20 olmalıdır.

Papatya çiçekleri (% 0.4-1.5) kamazulen yoğunluğuna bağlı olarak (% 1-15) mavi renkli uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağın ana maddeleri ; *α*-bisabolol oksit A **(1)** *α*-bisabolol oksit B **(2)**, *α*-bisabolol **(3)**, kamazulen **(4)** ve (*E*)-*β*-farnesen **(5)**'dir.

Uçucu yağın antipirüritik, antiseptic, antibakteriyel, antifungal, antiviral, böcek kovucu, antienflamatuvar, antioksidan, antispazmodik, karminatif, anti-ülser ve analjezik özellikleri bilinmektedir (Cepae, 1999; Orav ve ark., 2010; Murti ve ark., 2012; Gupta ve ark., 2010; Hajjaj ve ark., 2014).



Şekil 2. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağındaki ana maddeler**

Çizelge 1. *Matricaria recutita* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
Streptococcus pyogenes PTCC 1447	0.1 µg/mL	*Mikrodilüsyon, MİK	(Owlia ve ark., 2007)
S. mutans PTCC 1601	0.5 µg/mL		
S. salivarius PTCC 1448	0.5 µg/mL		
S. faecalis ATCC 29212	4 µg/mL		
S. sanguis PTCC 1449	0.5 µg/mL		
S. aureus ssp. *aureus* ATCC 700699	inhibisyon yok	Disk difüzyon	(Chao ve ark., 2008)
Propionibacterium acnes CGMCC 65002	0.125	Mikrodilüsyon MİK	(Zu ve ark., 2010)
Bacillus subtilis ATCC 10707	7 µg/mL	Mikrodilüsyon MİK	(Sokovic ve ark., 2010)
Enterobacter cloacae (izolat)	7 µg/mL		
Escherichia coli O157:H7	7.5 µg/mL		
Micrococcus flavus ATCC 9341	7 µg/mL		
Proteus mirabilis (insan izolatı)	7 µg/mL		
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	7 µg/mL		
S. enteritidis ATCC 13076	9 µg/mL		
Staphylococus epidermidis ATCC 12228	8 µg/mL		
S. typhimurium ATCC 13311	9 µg/mL		
S. aureus ATCC 25923	8 µg/mL		
Aspergillus niger ATCC 9142	IK_{50}=300 µg/mL	Büyüme inhibisyonu	(Tolouee ve ark., 2010)
Bacillus cereus BCCM/LMG 13569	4 µg/mL	Mikrodilüsyon, MİK	(Abdoul-Latif ve ark., 2011)
Enterococcus faecalis CIP 103907	4 µg/mL		
E. coli CIP 11609	4 µg/mL		
Listeria innocua LMG 1135668,	2 µg/mL		
Salmonella enterica CIP105150	2 µg/mL		
Shigella dysenteria CIP 5451	1 µg/mL		
S. aureus ATCC 9244	2 µg/mL		
P. mirabolis 104588 CIP	4 µg/mL		
S. camorum LMG 13567	2 µg/mL		
Candida albicans ATCC 10231	1 µg/mL		
P. aeruginosa (izolat)	1 µg/mL		
S. pyogenes (klinik izolat),	2 µg/mL		
Aspergillus niger (klinik izolat)	2 µg/mL		
Aspergillus sp.(klinik izolat)	16 µg/mL		
C. albicans (klinik izolat)	2 µg/mL		
Bacillus cereus MTCC 430	11.5 mm	Disk difüzyon agar	(Alireza, 2012)
B. subtilis MTCC 441	8 mm		
S. aureus subsp. aureus MTCC 2940	13.5 mm		
Klebsiella pneumonia MTCC 109	9 mm		
E. coli MTCC 443	8 mm		
P. vulgaris MTCC 426	11.5 mm		
S. typhi MTCC 733	8.5 mm		

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu, IK_{50} = İnhibe edici konsantrasyonun yarısı.

Çizelge 1. (Devam) ***Matricaria recutita*** **uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları**

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
Aspergillus flavus PFCC 50041	% 3.98 - 64.29	Büyüme	(Jamalian ve
A. fumigatus PFCC 50091	% 6.38-93.62	inhibisyonu	ark., 2012)
A. niger PFCC 50101	% 3.52-89.45		
F. oxysporum PFCC 1286	% 17.4- 89.41		
Trichoderma harzianum PFCC 11-89	% 6.38-77.66,		
Microsporum canis PFCC 50691	% 24.48- 100		
M. gypseum PFCC 50701	% 3.24-68.15		
Trichophyton rubrum PFCC 51431	% 27.79- 100		
T. tonsurans PFCC 88-1352	% 45.73-100		
T. mentagrophytes PFCC 50541	% 11.40- 96.65		
Escherichia coli O157 ATCC 1659	12.5 µg/mL	Mikrodilüsyon,	(Roby ve
S. tyhpi ATCC 13076	12.5 µg/mL	MİK	ark., 2013)
B. cereus ATCC 11778	10 µg/mL		
S. aureus ATCC 13565	10 µg/mL		
C. albicans ATCC 10231	10 µg/mL		
A. flavus ATCC 16875	12.5 µg/mL		
Aspergillus flavus (izolat)	% 100 inhibisyon	Büyüme inhibisyonu	(Ali, 2013)
Staphylococcus aureus (izolat)	0.021 µg/mL	Mikrodilüsyon,	(Kazemi,
B. cereus (izolat)	0.032 µg/mL	MİK	2014)
B. subtilis (izolat)	0.041 µg/mL		
S. shiga (izolat)	0.178 µg/mL		
S. sonnei (izolat)	0.195 µg/mL		
P. aeruginosa (izolat)	6 µg/mL		
Proteus sp.	0.161 µg/mL		
C. krusei (izolatı)	% 38	Büyüme	(Gawde ve
Cryptococcus neoformans (izolatı)	% 39	inhibisyonu	ark., 2014)
Mycobacterium intracellulare (izolat)	% 35		
C. glabrata (izolat)	% 14		
P. aeruginosa (izolat)	% 10		
E. coli (izolat)	% 3		
C. albicans (izolat)	% 5		
A. fumigatus (izolat)	Inhibisyon yok		
MRSA (Metisilin dirençli)	Inhibisyon yok		
S. aureus (izolat)			
16 MRSA,	25.80±3,12 µg/mL	*Mikrodilüsyon,	(Barbosa ve
15 MSSA (Metisilin duyarlı)	26.60±4.77 µg/mL	MİK	ark., 2015)
S. aureus			
E. coli (16 izolat)	54.40±5.80 µg/mL		
P. aeruginosa (16 izolat)	54.40±4.65 µg/mL		
S. typhimurium (15 izolat)	54.40±2.70 µg/mL		
S. enteritidis (16 izolat)	54.40±1.85 µg/mL		

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

***Lavandula latifolia* Medik. uçucu yağı (Spicae aetheroleum)**



Şekil 3. *Lavandula latifolia* Medik. (http-2)

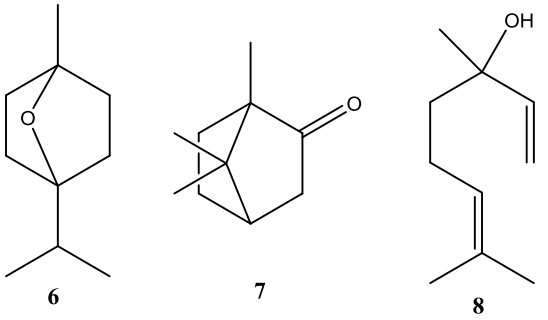
Lamiaceae familyasına ait *Lavandula latifolia* Medik. sivri lavanta olarak bilinmektedir. Akdeniz Bölgesi'nde, İran, Kanarya Adaları ve Avustralya'da yayılış gösteren çiçekli bir bitkidir. Dünyanın birçok farklı yerinde kültürü yapılmaktadır. *L. latifolia* 30 - 80 cm uzunluğunda aromatik bir bitkidir. Yaprakları her daim yeşil, 3 - 6 cm uzunluğunda ve 5-8 mm genişliğindedir. Haziran-Eylül ayları arasında çiçeklenme göstermektedir (Chu ve ark., 2001; Lis-Balchin, 2003).

Avrupa Farmakopesi'nde *L. latifolia* uçucu yağında kimyasal içerik açısından limonen (% 0.5 - 3.0), 1,8-sineol (% 16.0 - 39.0) **(6)**, kafur (% 8.0 - 16.0) **(7)**, linalol (% 34.0 - 50.0) **(8)**, linalil asetat ≤ 1.6, α-terpineol (% 0.2 - 2.0) ve *(E)*-α-bisabolen (% 0.4 - 2.5) maddeleri verilen limitler içerinde olmalıdır.

L. latifolia yoğun kafur içeriğinden dolayı *L. angustifolia*'dan daha güçlü ve keskin bir kokuya sahiptir. *L. angustifolia* ile benzer kullanımlara sahip olup gıda, parfümeri, aromaterapi ve ilaç endüstrilerinde de kullanılmaktadır (Cooke ve ark., 2000; Babar ve ark., 2015). Lavanta yağları genellikle antimikrobiyal, gaz giderici, sedatif, antidepresif, yara iyi edici ve böcek sokmalarında kullanılmaktadır (Cavanagh ve ark., 2002; Munoz-Bertomeu ve ark., 2007).

L. latifolia uçucu yağının ana bileşenleri; 1,8-sineol (% 11-27), kafur (% 12.5 - 13.0) ve linalol (% 41 - 43.2) olarak bilinmektedir (Barazandeh, 2002; Harborne ve ark., 2002; Alatrache ve ark., 2007; Munoz-Bertomeu ve ark., 2007; Herraiz-Penalver ve ark., 2013).

Lavandin olarak adlandırılan uçucu yağın üretimi için (*L. angustifolia x L. latifolia*) türlerinden hibrit tür *(L x intermedia*) elde edilir (Kara ve ark., 2013). Türkiye'de ekonomik anlamda sadece Isparta yöresinde lavandin (*L x intermedia var.* Super A) kültürü yapılmaktadır. Isparta yöresinde ortalama 60 kg taze lavandin çiçeklerinden su buharı distilasyonuyla 1 kg kadar uçucu yağ elde edilmektedir ve elde edilen lavandin yağlarında % 30 - 45 arasında linalol ve % 20 - 30 arasında linalil asetat bulunmaktadır (Kara ve Baydar, 2013). Lavandin uçucu yağları içeriğindeki düşük kafur oranından dolayı parfümeride ve terapötik amaçlı kullanılmamaktadır. Antiseptik ve antimikrobiyal amaçlı olarak kullanılmaktadır (Guenther, 1954; Woronuk ve ark., 2011).



6 **7** **8**

Şekil 4. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağındaki ana maddeler**

Çizelge 2. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları**

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
H. influenzae ATCC 33391	**MID= 12.5 µg/ L hava	Buhar faz aktivite	(Inouye ve ark., 2001a; Inouye ve ark., 2001b)
Penisiline duyarlı	MID= 25 µg/ L hava		
S. pyogenes ATCC 12344	MID= 25 µg/ L hava		
Penisilin dirençli			
S. pnemoniae IP-692			
S. pneumoniae PRC 53	MID= 25 µg/ L hava		
S. aureus FDA 209P JC-1	MID= 50 µg/ L hava		
Escherichia coli NIHJ-JC-2	MID= >1600 µg/ L hava		
Helicobacter pylori ATCC 43504	% 0.1 (v/v)	*Mikrodilüsyon MİK	(Ohno ve ark. 2003)
H. pylori CPY2052	% 0.1		
H. pylori KP142B	% 0.1		
H. pylori KP143B	% 0.1		
H. pylori KP146B	% 0.1		
H. pylori KP206B	% 0.1		
H. pylori KP223B	% 0.1		
Thricophyton mentagrophytes (izolat)	***MFD= 16 µg/ mL hava	Buhar faz aktivite	(Inouye ve ark., 2006)
MRSA *S. aureus*	8 mm	Disk difüzyon	(Roller ve ark., 2009)
MSSA *S. aureus*	30 mm		
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6872	IK_{50} = 0.06 mM	Agar kuyucuk difüzyon	(Lamine ve ark., 2015)
mutant izolatı CH31	IK_{50}= 0.1 mM		

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu, IK_{50} = İnhibe edici konsantrasyonun yarısı, **MID: minimum inhibisyon doz, ***MFD: Minimum fungisidal doz

***Pinus mugo* Turra. uçucu yağı (Pini pumilionis aetheroleum)**



Şekil 5. *Pinus mugo* Turra. (http-3)

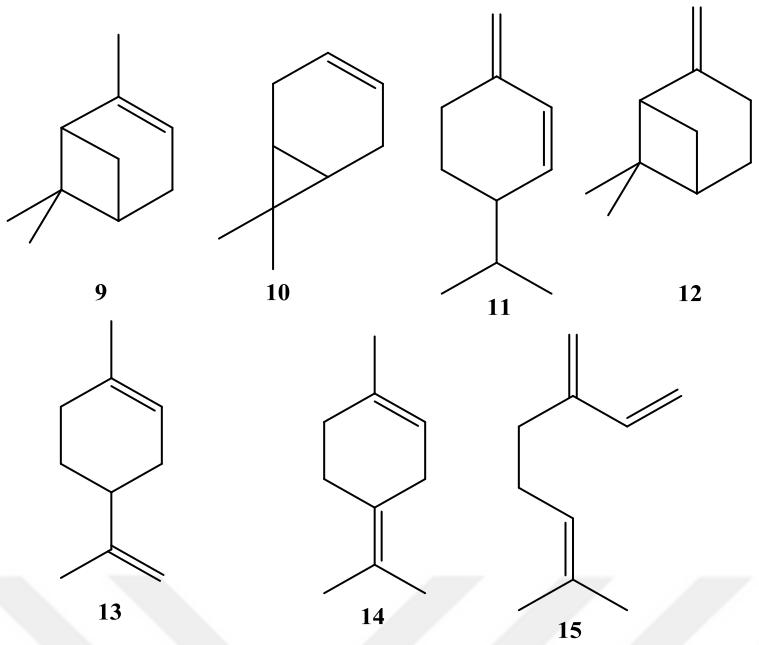
Bodur çam ağacı, *Pinus mugo* Turra. Pinaceae familyasından olup, Orta ve Güney Avrupanın dağlık bölgelerinde yetişen bir çam türüdür. 5-10 m boyunda olup piramidal yapıya sahiptir. İğne yapraklar koyu yeşil, 3-8 cm uzunlukta ve sık dizilmiş, ucu küt, kalın, sert, düz biçiminde ve ikilidir (Karapandzova ve ark., 2011; Venditti ve ark., 2013).

P. mugo uçucu yağı, taze yaprak ve ince dallardan elde edilir berrak, renksiz veya açık sarı reklidir.

Avrupa Farmakopesi standartlarındaki *P. mugo* uçucu yağında kimyasal bileşim açısından α-pinen (% 10-30) **(9)**, δ-3-karen (% 10-20) **(10)**, *β*-fellandren (% 10-19) **(11)**, *β*-pinen (% 3-14) **(12)**, limonen (% 8.0-14) **(13)**, terpinolen ≤ % 8.0 **(14)**, mirsen (% 3.0-12) **(15)**, kamfen ≤ % 2.0, *p*-simen ≤ % 2.5, bornil asetat (% 0.5-5.0) ve *β*-karyofillen (% 0.5-5.0) **(17)** maddeleri verilen limitler içerisinde olmalıdır.

Pinus mugo uçucu yağı antiseptik, antienflamatuvar, ekspektoran özelliklerinden dolayı geleneksel tedavide kullanılmaktadır (Venditti ve ark., 2013). Antiviral etkisi olduğu da bilinmektedir (Reichling ve ark., 2011).

Pinus mugo uçucu yağının kimyasal içeriği genellikle monoterpen bileşikler *α*-pinen, *β*-pinen, *δ*-3-karen, limonen, *β*-fellandren, α-terpinolen ve bornil asetat ve seskiterpen *trans*-karyofillen, germakren D, bisiklogermakren, *δ*-kadinen ve *α*-kadinol gibi maddelerden oluştuğu belirlenmiştir (Stevanovic ve ark., 2005; Kurose ve ark., 2007; Karapandzova ve ark., 2011; Venditti ve ark., 2013; Domrachev ve ark., 2012; Ioannou ve ark., 2014).



Şekil 6. ***Pinus mugo*** **uçucu yağındaki ana maddeler**

Çizelge 3. ***Pinus mugo*** **uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları**

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
Saprolongia parasitica	500 ppm	*Mikrodilüsyon, MİK	(Tampieri ve ark., 2003)
Candida albicans klinik izolat	50 ppm	Mikrodilüsyon, MİK	(Tampieri ve ark., 2005)

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Citrus reticulata Blanco. uçucu yağı (Citri reticulatae aetheroleum)



Şekil 7. *Citrus reticulata* Blanco. (http-4)

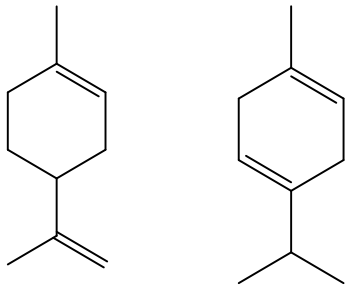
Mandalina, *Citrus reticulata* Blanco, turunçgiller familyasına ait (Rutaceae) bir meyve türüdür. Turuncu, sarı renklerde olan meyve etli ve sulu bir yapıya sahiptir. Türkiye'de daha çok Akdeniz Bölgesi'nde ve Ege Bölgesi'nin kıyı kesimlerinde yetişmektedir. Brezilya, Amerika, Çin, Meksika, Pakistan ve Akdeniz ülkelerinde üretimi yapılmaktadır (Kamal ve ark., 2011).

Mandalina uçucu yağı *C. reticulata* taze meyve kabuklarından soğukta mekanik ekstraksiyon ile elde edilir, sarımsı veya turuncu, karakteristik kokuya sahiptir.

Avrupa Farmakope standartlarındaki *C. reticulata* uçucu yağında kimyasal içerik açısından α-pinen (% 1.6-3.0), β-pinen (% 1.2-2.0), sabinen ≤ % 3.0, mirsen (% 1.5-2.0), limonen (% 65.0-75.0) **(13)**, γ-terpinen (% 16.0-22.0) **(16)** ve metil-*N* metilantranilat (% 0.3-0.6) tanımlanan limitler içerisinde olmalıdır.

C. reticulata uçucu yağının ana bileşikleri literatür bulgularında; limonen, mirsen, γ-terpinen, 3-karen, α-pinen, β-pinen, *p*-simen, sabinen, terpinolen, (*E*)-β-farnesen, linalol, metil-N-metil antranilat, geranil asetat, neril asetat, α-sinensal, oktanal, dekanal olarak gösterilmektedir (Lota ve ark., 2001; Sawamura ve ark., 2004; Fanciullino ve ark., 2006; Njoroge ve ark., 2006; Fayed, 2009; Gomes ve ark., 2013; Kırbaşlar ve ark., 2009). *C. reticulata* uçucu yağında metil-*N*-metil antranilat ve timol ayrıca β-pinen ve γ-terpinen bileşiklerinin bulunması kalitesi açısından önem taşımaktadır (Dharmawan ve ark., 2007).

Meyve kabuğu uçucu yağı içerdiği aromatik bileşiklerden dolayı ticari öneme sahiptir. Kozmetik ve halk tıbbında kullanımı yaygındır. Mandalina uçucu yağı antibakteriyal, antifungal, antioksidan, antikanser ve antiseptik özelliklere sahiptir (Mabberley, 2004; Njoroge ve ark., 2006; Chutia ve ark., 2009; Fayed, 2009; Das ve ark., 2014).



Şekil 8. *Citrus reticulata* uçucu yağındaki ana maddeler

Çizelge 4. *Citrus reticulata* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
Escherichia coli ATCC 35218,	0.19 mg/mL	*Mikrodilüsyon,	(Ayoola ve ark.,
E. coli (izolat)	1.95 mg/mL	MİK	2008)
P. aeruginosa (izolat)	0.97 mg/mL		
K. pneumoniae (izolat)	0.56 mg/mL		
S. paratyphi (izolat)	2.07 mg/mL		
P. mirabilis (izolat)	Aktif değil		
S. aureus ATCC 25923	2.46 mg/mL		
S. aureus (izolat)	0.74 mg/mL		
Enterococcus faecalis (izolat)	1.26 mg/mL		
C. albicans(izolat)	0.68 mg/mL		
Staphylococcus aureus (izolat)	2.25 mg/mL	*Mikrodilüsyon,	(Chanthap
B. cereus (izolat)	2.25 mg/mL	MİK	hon ve
L. monocytogenes (izolat)	> 2.25 mg/mL		ark., 2008)
Salmonella sp.	> 2.25 mg/mL		
S. cerevisiae var. sake (izolat)	> 2.25 mg/mL		
A. fumigatus TISTR 3180	2.25 mg/mL		
E. coli O157: H7 DMST 12743	> 2.25 mg/mL		
Lactobacillus curvatus CECT 904	15.64 ± 0.38 mm	Agar difüzyon	(Viuda-
L. sakei CECT 4808	14.29 ± 0.51 mm		Martos ve
S. carnosus CECT 4491	11.34 ± 0.32 mm		ark., 2008)
S. xylosus (CECT) 237	11.95 ± 0.62 mm		
Enterobacter gergoviae CECT 857	11.92 ± 0.39 mm		
E. amnigenus CECT 4078	14.87 ± 0.41 mm		
Alternaria alternate (izolat)	0.2 mL/100 mL	*Mikrodilüsyon, MİK	(Chutia ve
Rhizoctonia solani (izolat)	> 0.2 mL/100 mL		ark., 2009)
Curvularia lunata (izolat)	> 0.2 mL/100 mL		
Fusarium oxysporum (izolat)	> 0.2 mL/100 mL		
Helminthosporium oryzae (izolat)	> 0.2 mL/100 mL		

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Çizelge 4. (Devam) *Citrus reticulata* uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
S. aureus ATCC 6538	14 mm	Disk difüzyon	(Kırbaşlar ve ark., 2009)
B. cereus ATCC 7064	12 mm		
M. smegmatis CCM 2067	12 mm		
L. monocytogenes ATCC 15313	13 mm		
Micrococcus luteus La 2971	13 mm		
E. coli ATCC 11230	12 mm		
K. pneumoniae UC57	13 mm		
P. aeruginosa ATCC 27853	12 mm		
P. vulgaris ATCC 8427	14 mm		
C. albicans ATCC 10231	13 mm		
K. fragilis NRRL 70403	15 mm		
Debaryomyces hansenii DSM 70238,	14 mm		
Hanseniaspora guilliermondii DSM 3432	12 mm		
Aspergillus flavus izolat	100 ± 00	*Mikrodilüsyon, MİK	(Singh ve ark., 2010)
Enterococcus faecium ATCC 19434	2 µL/mL	*Mikrodilüsyon, MİK	(Espina ve ark., 2011)
S. aureus ATCC 6538	1 µL/mL		
P. aeruginosa ATCC 10145	5 µL/mL		
Salmonella enterica subsp. enterica	5 µL/mL		
serovar. enteritidis ATCC 49214	5 µL/mL		
E. coli O157:H7	1 µL/mL		
L. monocytogenes (izolat)			
S. aureus GIM1.14	8.9 ± 1.3 mm	Disk difüzyon	(Gao ve ark., 2011)
B. cereus CMCC 63302	9.3 ± 1.2 mm		
B. subtilis ATCC 9372	9.8 ± 1.6 mm		
Enterococcus faecalis ATCC 29212	6.0 ± 0.0 mm		
E. coli ATCC 25922	6.0 ± 0.0 mm		
Salmonella lignieres CMCC 50115	7.8 ± 0.4 mm		
P. aeruginosa ATCC 9027	7.8 ± 0.4 mm		
Enterobacter cloacae CMCC 4350	6.0 ± 0.0 mm		
Aspergillus flavus AS3.3950	13.6 ± 0.8 mm		
A. niger ATCC 16404	6.0 ± 0.0 mm		
Debaryomyces hansenii var. hansenii	10.5 ± 0.5mm		
E. coli (izolat)	20 mm	Disk difüzyon	(Shabnam ve ark., 2011)
Salmonella typhii (izolat)	30 mm		
Klebsiella pneumoniae (izolat)	14 mm		
E. cloacae (izolat)	10 mm		
P. fluorescence (izolat)	20 mm		
Proteus myxofaciens (izolat)	25 mm		
S. epidermidis (izolat)	30 mm		
Streptococcus sp (izolat)	22 mm		
Listeria monocytogenes 133	< 9 mm	Disk difüzyon	(Settanni ve ark., 2012)
S. aureus 473	< 9 mm		
Salmonella Newport 50404	inhibisyon yok		
E. coli (izolat)	15 mm	Agar kuyucuk difüzyon	(Sultana ve ark., 2012)
S. aureus (izolat)	16 mm		
A. flavus (izolat)	15 mm		
A. niger (izolat)	13 mm		
A. fumigatus(izolat)	15 mm		
C. albicans (izolat)	15 mm		

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

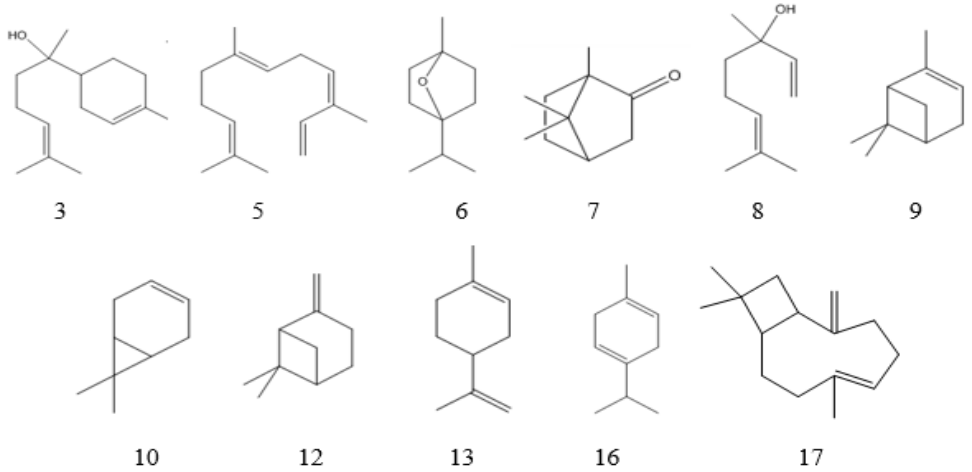
Çizelge 4. (Devam) ***Citrus reticulata*** **uçucu yağı ile ilgili yayınlanmış antimikrobiyal aktivite çalışmaları**

Mikroorganizma	Aktivite sonucu	Yöntem	Kaynak
Fusarium oxysporum CLM No. 1451 *Alternaria alternata* CLM No. 1606 *Colletotrichum musae* CLM No. 938	EK_{50}= 1521.6 µg/mL EK_{50}= 3290.5 µg/mL EK_{50}= 2176.1 µg/mL	Fumigasyon testi	(Gomes ve ark., 2013)
E. coli (izolat) *P. aeruginosa* (izolat) *S. typhi* (izolat) *S. aureus* (izolat) *C. albicans* (izolat) *E. coli* ATCC 25922 *S. aureus* ATCC 25923 *C. albicans* ATCC 90028	0.18 mg/mL 2.63 mg/mL 2.69 mg/mL 0.58 mg/mL 0.55 mg/mL 0.18 mg/mL 0.37 mg/mL 0.16 mg/mL	*Mikrodilüsyon, MİK	Johnson ve ark., 2013
Listeria monocytogenes (izolat) *Corynebacterium minutissimum* (izolat) *E. coli* (izolat) *Yersinia sp.* (izolat) *Klebsiella planticola* (izolat) *Aspergillus flavus* (izolat) *A. fumigatus* (izolat) *A. niger* (izolat)	1.9 cm 2.8 cm 4.9 cm 4.8 cm 4.8 cm 4.6 cm 3.4 cm 4.0 cm	Agar kuyucuk difüzyon	(Javed ve ark. 2014)
S. aureus RCMB 010027 *S. pyogenes* RCMB 010015 *E. faecalis* RCMB 010068, *K. pneumonia* RCMB 0010093 *E. coli* RCMB 010055 *S. typhimurium* RCMB 010072	25.4 ±0.5 mm 27.3 ±05 mm 19.6 ±0.1 mm 23.1±0.6 mm 20.6±0.3 mm 24.3±0.2 mm	Agar kuyucuk difüzyon	(Eldahshan, 2015)

*Mikrodilüsyon, MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Uçucu Yağ Bileşenleri

Materyal olarak kullanılan Farmakope kalitesindeki uçucu yağların ana bileşenlerinden bazıları antimikrobiyal etkinlik ve kombinasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Denenen terpenler; bisabolol **(3)** farnasen **(5)**, 1,8-sineol **(6)**, (±)- kafur **(7)**, (+)-linalol **(8)**, α-pinen **(9)**, (+)-δ-3-karen **(10)** (-)-β-pinen **(12)**, *R*- (+)-limonen **(13)**, γ-terpinen **(16)** ve β-karyofillen **(17)** olarak sıralanabilir:



Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Bazı Dirençli Mikroorganizmalar ve Patojeniteleri

Son yıllarda bazı insan patojeni bakterilerin metisilin, vankomisin, sefalosporin vb. gibi yaygın kullanılan antibiyotiklere; bazı maya ve mantarların azol, polien vb. grubu antifungal maddelere karşı direnç geliştirmiş olmaları antienfektif ve antimikrobiyal tedavide endişe verici ve ölümlerle sonuçlanan boyutlara ulaşmıştır (WHO, 2014). Bu bölümde tez kapsamında çalışılan Gram pozitif [Gr (+)] *Staphylococus aureus*, Gram negatif [Gr (-)] *Escherichia coli* ve maya *Candida albicans* türlerinin kısaca özellikleri ve kazandıkları antibakteriyel ve antifungal madde direnci konusunda bilgi verilmiştir.

Staphylococcus aureus ve antibiyotik direnci

Mikrobiyoloji: *Staphylococcus aureus*, Staphylococcaceae familyasından olup, hareketsiz, kok formunda Gram pozitif bakteridir. Yaklaşık 20 türü bulunur.

Patoloji: *S. aureus*'un cilt, yumuşak doku, kemik ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına kadar birçok enfeksiyona sebep olduğu gösterilmiştir. *S. aureus'*un gıda zehirlenmesine yol açtığı ve salgıladığı toksinler ile toksik şok sendromuna neden olduğu bilinmektedir (DeLeo ve ark., 2010; Stefani ve Goglio, 2010; WHO, 2014).

Epidemiyoloji: Günümüzde en çok hastane ve toplumda enfeksiyonlara MRSA'nın neden olduğu bilinmektedir. Başta Amerika Birleşik Devletleri olmak üzere bazı batı ülkelerinde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* önemli bir patojen haline gelmiştir (Stefani ve Goglio, 2010).

Escherichia coli ve antibiyotik direnci

Mikrobiyoloji: Enterobacteriaceae familyasına ait fakültatif anaerop, çubuk şeklinde olup, Gram negatif bakteridir.

Patoloji: *Escherichia coli* içinde hastalık yapan pek çok tipinin olduğu ve bu hastalıklar arasında başta üriner sistem enfeksiyonlarının ilk sırada yer aldığı, bunun dışında kan dolaşımı enfeksiyonlarına, menenjit, peritonit ve septisemi, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca dünya çapında en yaygın gıda kaynaklı patojenlerden biri olduğu bilinmektedir (WHO, 2014).

Epidemiyoloji: Beta-laktam antibiyotiklere karşı Gram negatiflerde görülen direnç tüm dünyada ve ülkemizde hızla artmaktadır. Bakteriler bu grup antibiyotiklere en sık beta laktamaz enzimlerini üreterek direnç geliştirmektedirler. Toplum kökenli enfeksiyonlarda genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (GSBL) enzimi üretiminin en sık *E.coli*'de olduğu ve 3. kuşak sefalosporinlere karşı direnç gelişimi olarak gösterilmiştir. *E. coli'*de florokinonlara da yüksek oranda direnç gelişimi bildirilmiştir (Geyik ve ark., 2002; Yetkin ve ark., 2006; WHO, 2014).

Candida albicans ve antifungal ilaçlara direnç

Mikrobiyoloji: *Candida albicans*, eşeyli çoğalan, krem ve beyaz renkli düzgün kolonilere sahip maya tipi bir mantardır.

Patoloji: İnsanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonları oluşturan tür olup en sık kandidiyazis enfeksiyonuna sebep olan türdür.

Bu enfeksiyonların yüksek morbidite ve mortaliteye neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda kan dolaşımı enfeksiyon yolu ile kandidemiye neden olmaktadır (Gow ve Hube, 2012).

***Epidemiyoloji*:** Azol türevli antifungal ilaçlar genel olarak *Candida* enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavide uzun süreli kullanım nedeniyle de bazı *Candida* türlerinde azollere karşı direnç ortaya çıktığı görülmüştür. Direncin özellikle antifungal tedavide birçok ülkede yaygın olarak kullanılan flukonazole karşı olduğu belirtilmiştir. Son yıllarda gelişmekte olan ülkelerde flukonazol ile tedavinin yerini alan yeni sınıf antifungal ilaçlardan ekinokandin'lere karşı da direnç gelişiminin ortaya çıktığı bildirilmiştir (WHO, 2014).

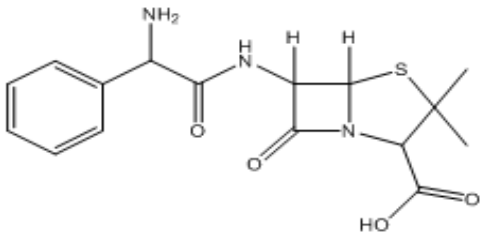
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Antibakteriyel ve Antifungal Etken Maddeler

Dünyanın ilk antibiyotiği olan penisilin, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından tesadüfen *Penicillium notatum* küfünden elde edilmiştir. Ancak ilacın endüstriyel üretimi 1941 yılında büyük bir tesiste başlatılabilmiştir (Dixon ve Walsh, 1996). Antifungal etkili maddelerin keşfi, üretilmesi antibakteriyel maddelerden çok daha sonra gerçekleşmiştir. İlk önemli antifungal ilaç olan nistatin, 1949 keşfedilmiştir. Griseofulvin, *Penicillium griseofulvum*'dan ilk kez 1939'da izole edilmiş olmasına karşın antifungal aktivitesi 1958'de keşfedilebilmiştir. Azol türevi antifungal ilaçlar ise 1969'a yılına kadar klinik kullanıma girememiştir (Dixon ve Walsh, 1996).

Tez kapsamında Farmakope kalitesinde ve standardında kullanılan antibakteriyel maddeler ampisilin, sefuroksim, tekrasiklin ile antifungal maddeler flukonazol ve nistatinin özelliklerinden, antibakteriyel ve antifungal maddelerin etki mekanizmalarından kısaca bahsedilmiştir.

Ampisilin

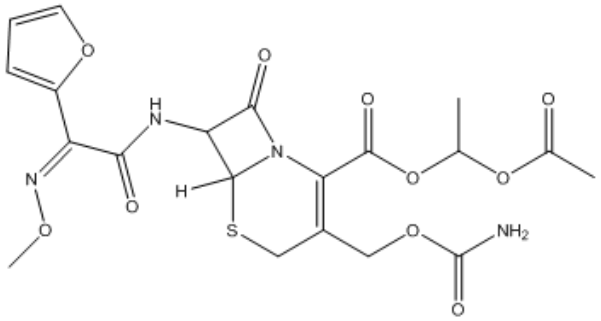
Ampisilin (*2S,5R,6R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiya-1-azabisiklo[3.2.0]heptan-2-karboksilik asit) **(17)** birçok bakteriyel enfeksiyon tedavisinde kullanılmakta olup, penisilin grubu antibiyotikler arasında yer almaktadır. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki gösteren geniş spektrumlu antibiyotiktir. Gram pozitif ve negatif birçok mikroorganizmaya karşı etkilidir. Ampisilin kulak enfeksiyonları, idrar yolları enfeksiyonu, pnömoni (zatürre), gonore (bel soğukluğu), mide-bağırsak enfeksiyonları, sinüzit, farenjit ve bronşit gibi yaygın üst solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Anderson ve ark., 2012).



17

Sefuroksim

Sefuroksim(6*R*,7*R*)-3-[(karbamoiloksi)metil]-7-[(2*Z*)-2-(furan-2-il) (metoksi-imino)asetamido]-8-okso-5-tiya-1-azabisiklo[4.2.0]okt-2-en-2 karboksilik asit) **(18)** parenteral ya da oral 2. kuşak sefalosporin antibiyotiktir. Etkisini bakteri hücre duvar sentezinde transpeptidaz enzimlerini inhibe ederek gösterir. Beta laktamaz enzimlerine dayanıklı oldukları için Gram negatif bakterilere ve B-laktamaz enzimi üretebilen diğer bakterilere karşı etkilidir. Sefuroksim; üst solunum yolları enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları ve kulak enfeksiyonlarında kullanılmaktadır (Anderson ve ark., 2012).

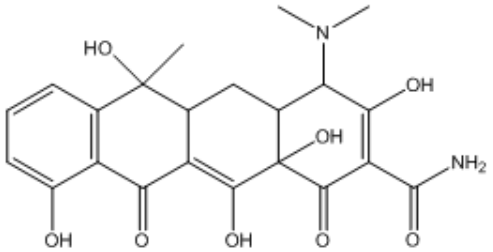


18

Tetrasiklin

Tetrasiklin [(4*S*,4a*S*,5a*S*,6*S*,12a*S*)-4-(dimetilamino)-3,6,10,12,12a-pentahidroksi-6-metil-1,11-diokzo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidrotetrasen-2-karboksamit] **(19)** *Streptomyces rimosus* isimli bakteri tarafından üretilen geniş spektrumlu antibiyotik olup hem Gram pozitif hem de Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkilidir. Ayrıca diğer riketsiya, klamidia, mikoplazma ve amip gibi türlere karşı da etkindir (Chopra ve Roberts, 2001).

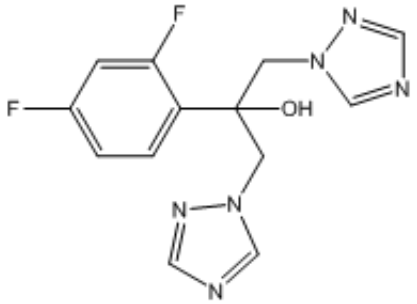
Protein sentezini engelleyerek hücre büyümesini önler. Bakteri ribozomlarının 30S alt ünitelerine bağlanır ve amino asil tRNA'nın ribozama bağlanmasının önler. Bakteriyostatik etkisi vardır. Akne tedavisinde, kronik bronşitte, bruselloz, kolera, riketsiyal enfeksiyonlar, Lyme hastalığında, kistik fibrosiz ve üriner enfeksiyonlarda kullanılmaktadır (Chopra ve Roberts, 2001; Anderson ve ark., 2012).



19

Flukonazol

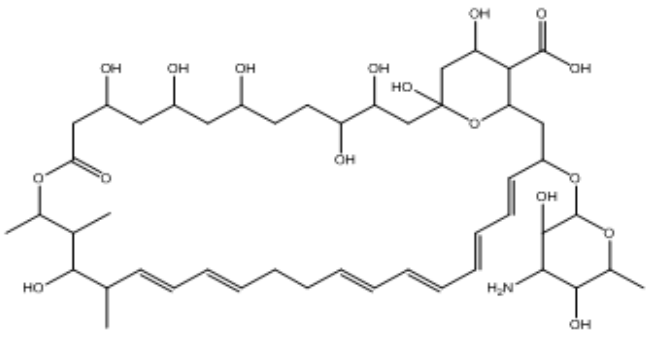
Flukonazol (2-(2,4-diflorofenil)-1,3-bis(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol) **(20)** yüzeysel ve sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan triazol antifungal ilaçtır. Sitokrom P-450 ve 14-α-demetilaz enzimini inhibe ederek ergosterol biyosentezini önlemektedir. Geniş spektrumlu antifungal ilaçlardan olup çeşitli dermatofitlere örneğin; *Candida, Crytococcus* ve ağır enfeksiyonlara neden olan diğer mantarlara karşı etkilidir. Flukonazol'ün kriptokokkal menenjitin tedavisinde kısmen etkili, *Aspergillus* türlerine ise etki göstermediği kaynaklarda belirtilmiştir (DiDomenico, 1999; Charlier ve ark., 2006; Hall, 2012).



20

Nistatin

Nistatin (*1S, 3R, 18S, 19R, 20S, 21S, 25R, 27R, 29R, 32R, 33R, 35S, 37S, 38R*)-3-(*2R, 3S, 4S, 5S, 6R*)-4-amino-3,5-dihidroksi-6-metiloksan-2-il) oksi-19, 25, 27, 29, 32,33,35,37-oktahidroksi-18,20, 21-trimetil-23-okso-22, 39-dioksabisiklo [33.3.1] nonatriaconta-4, 6, 8, 10, 14, 16-heksaen-38-karboksilik asit **(21)** polien grubu antifungal maddelerden olup ergosterole bağlanarak hücre içeriğinin sızmasına ve hücrenin ölmesine neden olarak etki gösterir. 1950 yılında *Streptomyces noursei* mantarından elde edilen ilk antifungal maddedir. Nistatin maya ve maya benzeri mantarların yaptığı yüzeyel mukoza deri enfeksiyonlarında topikal olarak uygulanır. Ayrıca deri ve mukozalarda *Candida* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlarda da kullanılmaktadır. Deri, ağız, vajinal mukoza ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır, dermatofitlere karşı etkisiz olduğu bilinmektedir (Hall, 2012).

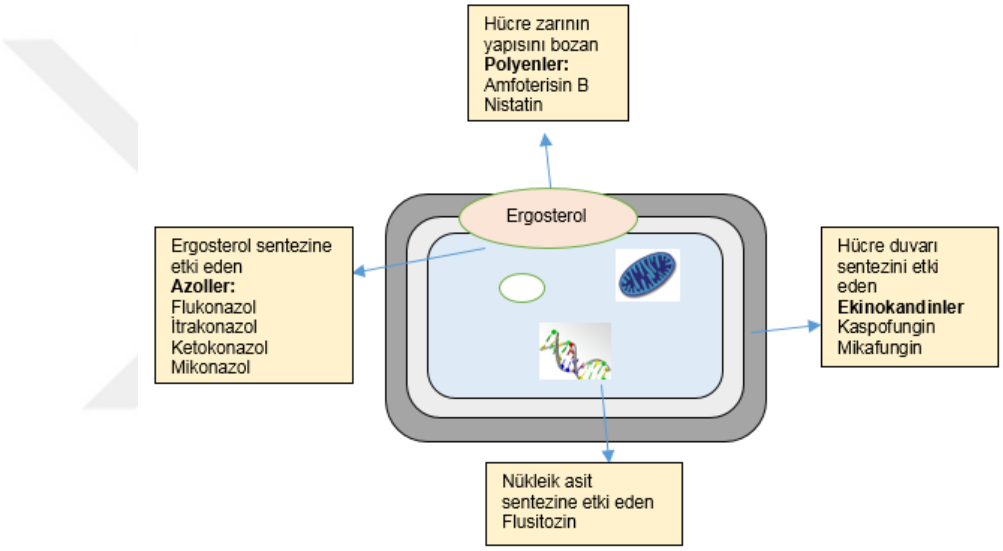


21

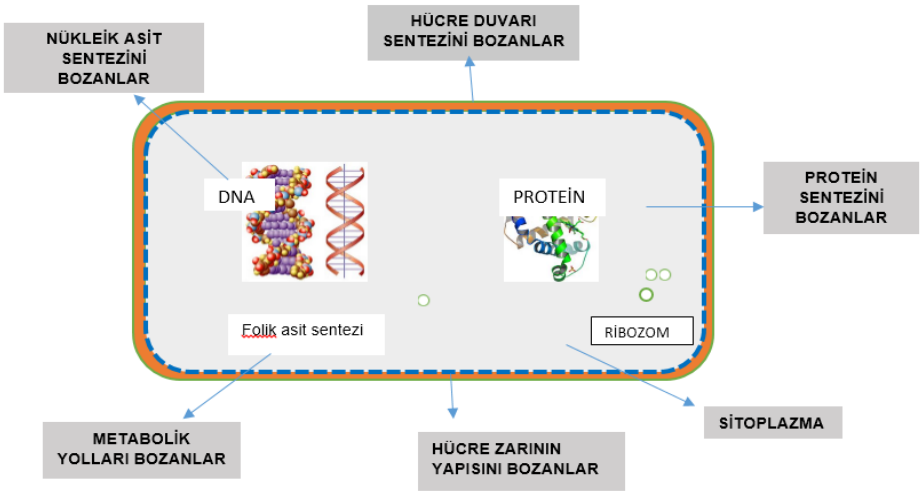
Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

1) Bakteri hücre duvarı sentezini bozanlar (Beta laktam antibiyotikler: penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler),
2) Hücre zarının yapısını bozanlar (Polimiksinler; Amfoterisin B, Nistatin, ketokonazol ve diğer imidazoller, flukonazol ve diğer triazoller),
3) Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bozanlar (Aminoglikozitler, tetrasiklinler, streptomisin, amikasin, eritromisin, klindamisin, linezolit, kloramfenikol),
4) Nükleik asit (DNA ve RNA yapılarını) sentezini bozanlar (kinolonlar, rifampisin),
5) Metabolik yolları bozanlar (Örn.: Folik asit sentezi; sülfonamit, trimetoprim) (Kohanski ve ark., 2010).



Şekil 9. Antifungal maddelerin etki mekanizmaları



Şekil 10. Antibakteriyel maddelerin etki mekanizmaları

Uçucu Yağ Bileşiklerinin Biyosentezleri ve Biyolojik Etkileri

Uçucu yağlar ve bileşikleri bitkilerden veya bitkisel droglardan distilasyon, soğukta sıkma, çözücü ekstraksiyonu ve sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon gibi yöntemler ile elde edilen özel kokulu, uçucu maddeler karışımıdır. Uçucu yağlar bitkilerin çiçek, meyve, yaprak, toprak üstü kısımları, kabuk, rizom, kök, odun gibi birçok farklı organında bulunabilirler. Uçucu yağların çözünürlüğü genellikle suda az olup, çoğu organik çözücülerde ve yağlarda daha fazladır (Başer ve Buchbauer, 2010; Raut ve Karuppayil, 2014).

Uçucu yağlar genellikle hidrokarbonlar ve hidrokarbonların oksijenli türevlerinden meydana gelirler. Yapısında alkoller, esterler, asitler, aldehitler, ketonlar, aminler ve kükürtlü bileşikler de yer alır. Uçucu yağların yapısında mono, seski ve diterpenler olmak üzere terpenoitler bulunur ve izopren birimlerinden meydana gelirler. Bunun dışında fenil propanoitler, yağ asitleri, kumarinler, ftalatlar ve parafinlerde bazı uçucu yağlarda rastlanılmaktadır (Başer ve Buchbauer, 2010).

Terpenlerin biyosentezinde mevalonik asit önemli rol oynar. 3 Mol asetik asit'in birleşmesi ile oluşan mevalonik asit, H_2O ve CO_2 kaybı ile izopren birimlerini oluşturmaktadır (Dewick, 2009).

Uçucu yağların antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuvar, antifungal, antimutajenik, antikanser, insektisit, antidiyabetik, antiprotozoal analjezik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Shaaban ve ark., 2012; Lang ve Buchbauer, 2012; Raut ve Karuppayil, 2014; Guimaraes ve ark., 2013).

Uçucu Yağ Analizi ve Kromatografisi

Uçucu yağların ve uçucu bileşenlerin analizinde ve izolasyonunda ince tabaka kromatografisi (İTK), sıvı kolon kromatografileri (SK) ve gaz kromatografisi (GK) gaz kromatografisi, kütle spektrometresi (GK/KS) gibi sistemler kullanılmaktadır.

İTK eski tekniklerden olup, uçucu yağların analizinde uzun süredir kullanılmaktadır. İTK bileşiklerin belirlenmesi ve saflığını test etmek için kullanılan hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Diğer analizler için gerekli ön bilgileri sağlayan yaygın olarak kullanılan bir ön tekniktir. Ayrıca saflaştırma tekniklerinde preperatif ince tabaka kromatografisi de kullanılmaktadır (Başer ve Buchbauer, 2010).

Kolon kromatografisi uçucu yağların fraksiyonlanmasında kullanılan yöntemlerden birisidir. Uçucu maddeler *n*-pentan, petrol eteri, *n*-hekzan gibi çözücülerle izokratik elüsyon uygulanabildiği gibi artan polariteli çözücü karışımları ile gradient elüsyon uygulanarak fraksiyonlanabilir. Uçucu yağlardan madde izolasyonu ve saflaştırma tekniklerinde kolon kromatografisine ek olarak, flash kolon kromatografisi, modern yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, vakum sıvı kromatografisi gibi teknikler de kullanılmaktadır (Kubeczka, 2010; Changming, 2012).

Gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GK/KS) uçucu yağların kimyasal analizinde yaygın olarak kullanılan tekniklerden birisidir. Uçucu madde karışımlarının kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesinde kullanılan kesin ve etkili bir tekniktir.

Uçucu Yağ Antimikrobiyal Yöntemleri

Uçucu yağların *in vitro* antibakteriyel ve antifungal etkinliğini saptamak amacıyla birçok aktivite testi kullanılmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri CLSI ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) gibi organizasyonların belirlemiş olduğu standartlar ölçüsünde veya uyarlanmış edilmiş şekillerde uygulanmaktadır. Bu kısımda uçucu yağların antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden kısaca bahsedilmiştir.

Difüzyon Testleri

Disk difüzyon testi

Uçucu yağın belli kosantrasyonunu içeren steril kağıt diskler test edilecek mikroorganizmanın inoküle edildigi katı besiyerlerine yerleştirilir. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra uçucu yağın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. İnhibisyon zonunun çapı mm cinsinden ölçülür. Uçucu yağların çözünürlük problemlerinin bulunması ve zor gelişen bazı mikroorganizma türlerinden dolayı test sonuçlarının değerlendirilmesinde bazı dezavantajlara sahiptir (Wanger, 2007; Valgas ve ark., 2007; Das ve ark. 2010).

Agar difüzyon testi

Agar difüzyon tekniğinde, besiyeri üzerine, belirli çapta açılan kuyucuklara uçucu yağ veya uçucu yağ bileşenleri konulmaktadır. İnkübasyon süresi sonunda, kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında üremenin olmadığı gösteren inhibisyon zonları oluşmaktadır. Oluşan inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirilmektedir (Wanger, 2007; Valgas ve ark., 2007; Das ve ark. 2010).

Dilüsyon Testleri

Dilüsyon testleri, bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır. Dilüsyon testleri "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır (Das ve ark. 2010).

Tüp dilüsyon

Bu yöntemle daha çok antimikrobiyal maddelerin MİK (minimum inhibisyon konsantrasyon) ve/veya MBK (minimum bakterisidal konsantrasyon) değerleri belirlenmeye çalışılır. Mikrodilüsyon ve makrodilüsyon olarak uygulanabilmektedir. Makrodilüsyonda test tüpleri kullanılırken, mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılmaktadır. Test edilecek madde uygun bir çözücüde çözündükten sonra, sıvı besiyerinde 2 kat azalan dilüsyonları yapılır. Mikroorganizmanın standart bir yoğunluğu hazırlanarak hazırlanan bu seri dilüsyonlara eşit miktarda ilave edilir. Besiyerleri 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenir. Mikroorganizmanın üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük madde konsantrasyonu, MİK olarak değerlendirilir (Das ve ark. 2010; Nasir ve ark., 2015).

Agar dilüsyon

Agar dilüsyon yönteminde, madde dilüsyonları agar içine konularak Petri plaklarına dökülür. Böylece her Petri plağında farklı madde konsantrasyonları bulunur. Bu yöntem için de genellikle önerilen besiyeri Mueller-Hinton Agar'dır. Daha sonra agar yüzeylerine mikroorganizma yoğunluğu standardize edilerek inokülasyon işlemi yapılır. İnoküle edilen plaklar 35 °C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilir. MİK değeri üremenin engellendiği en düşük madde konsantrasyonu olarak belirlenir (Das ve ark. 2010).

Biyootografi (İTK) Yöntemi

Bu yöntem, uçucu yağ veya karışımlardaki antimikrobiyal etkili bileşiklerin İTK plakları üzerinde gözlenmesi prensibine dayanır. Silikajel GF_{254} alüminyum destekli plaklar uygun ölçülerde kesilir, örnekler İTK plağına uygulanarak uygun çözücü karışımında develope edilir ve örneklerin düzgün bir şekilde ayrılması sağlanır. Plak, tabanında Nutrient agar bulunan petriye aseptik koşullar altında yerleştirilir. Bir gece önceden hazırlanan mikroorganizma kültürü, önceden hazırlanan yumuşar agar McFarland No: 0.5 tüpüne göre standardize edilir. Su banyosunda 42-45 °C arasında donması engellenen, mikroorganizma ile inoküle edilmiş erimiş agar, İTK plağının petriye yerleştirilmesinden sonra, plağın üzerine ince bir film olacak şekilde dökülür. Uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda önceden hazırlanmış ve reaktif püskürtülmüş referans plakla karşılaştırılarak, üzerinde üremenin olmadığı alanlar ve bunlara karşılık gelen lekeler incelenerek kaydedilir (Rahalison ve ark.1991; Sarker ve ark., 2006; Godal ve ark., 2013).

Antimikrobiyal Kombinasyon Çalışmaları

Antimikrobiyal maddelere karşı direnç oluşumu nedeni ile tedavide kombinasyon tedavileri uygulanmaktadır. Antimikrobiyal genel kombinasyon tedavisine örnek olarak *Helicobacter pylori* için uygulanan antibiyotik tedavi şeklini verebiliriz.

H. pylori tedavisinde kullanılan kombinasyon ürünlerine örnek olarak; Helidac 3'lü kombinasyon (bizmut subsalisilat + metronidazole + tetrasiklin), Pylera (bizmut substrat potasyum + metronidazol + tetrasiklin) ve Prevpac (klaritromisin + amoksisilin + proton pompası inhibitörü) (Chey ve ark., 2007; Malfertheiner ve ark., 2007) verilebilir.

Uçucu yağlar ve standart ilaç etken maddeleri ile kombinasyon çalışmaları çeşitli sebeplerden dolayı tercih edilmeye başlanılmıştır;

- Geniş bir antimikrobiyal spektrum sağlamak, özellikle mikroorganizma hücresinde farklı hedef bölgeleri etkilemek,
- Kombinasyonda standart ilaç etken maddelerini düşük dozda kullanarak olası toksik etkiyi azaltmak,
- Direnç geliştirmiş mikroorganizmalara karşı direnç gelişimini azaltmak, özellikle uçucu yağların mikroorganizma da spesifik resistant bölgelere etki edebilecek alternatif olarak düşünülmesi,
- Belli bir mikroorganizma üzerinde tek bir standandart ilaç etken maddesi ile sağlanan inhibitör ve bakterisit etkinin artırılması,

- Tek bir standart ilaç etken maddesinin etkili olmadığı polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde alternatif kaynaklar bulmak gibi güncel çalışmalara rastlanmaktadır (Eliopoulus and Moellering, 2000; Langeveld, 2012).

Kombinasyon çalışmalarında (Berenbaum, 1977; Eliopoulus ve Moellering, 2000; Odds, 2003) kullanılan maddeler arasında 4 farklı etkileşimden söz edilmektedir:

1) **Sinerjik etki (Artan etki)**: İlaçların veya maddelerin tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki elde edilmesidir (örn.: 1 + 1 > 2).
2) **Aditif etki (Toplam etki):** İlaçların tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamına eşit bir etki elde edilmesidir (örn.: 1 + 1 = 2).
3) **Bağımsız etki (Farksız etki, etkileşim yok):** İki ilacın kombinasyonundan elde edilen sonuç, bunlardan en etkin olan ilacın sonucundan farksız olmadığında etkileşim yok şeklinde değerlendirilir (örn.: 1 + 1 = 1).
4) **Antagonistik etki (Karşıt etki, etki azalması):** Antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha düşük etki elde edilmesidir (örn.: 1 + 1 = < 1).

Kombinasyon Yöntemleri

Dama tahtası

Kombinasyon çalışmalarının araştırılmasında birden fazla yöntem kullanılmaktadır. En çok uygulanan yöntemlerden biri dama tahtası yöntemidir. Mikrodilüsyon esasına dayanan kombinasyon testlerinden birisidir. Kombinasyon etkinlikleri araştırılacak maddelerin farklı konsantrasyonları hazırlanır ve değerlendirilir (Eliopoulos ve ark., 1988; Eliopoulos ve ark., 1982; Vuuren ve ark., 2007; Verma, 2007; Panda, 2012).

Hazırlanan maddelerden biri 96 kuyucuklu mikroplaka üzerinde yatay olarak, diğeri ise dikey yönde konulur. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu MİK değerleri baz alınır.

Dama tahtası yöntemi sonuçlarının değerlendirilmesinde isobologram ile grafiksel gösterim ya da fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu indeksi (FİKİ) hesaplanır. Antimikrobiyal maddelerin kombinasyondan elde edilen MİK değerleri ile tek başlarına olan MİK değerleri oranlanarak, fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri bulunur. Daha sonra kombinasyondaki tüm maddelerin FİK değerleri toplanarak FİK indeksi (ΣFİK) hesaplanır.

FİK indeksi (∑ FİK) için şu formül kullanılır:

∑ FİK= FİKX + FİKY **(Formül 1)**

FİKX= Kombinasyondaki (X'in MİK değeri) / X'in tek başına elde edilen MİK değeri
FİKY= Kombinasyondaki (Y'nin MİK değeri) / Y'in tek başına elde edilen MİK değeri

Bu yöntemde aşağıdaki değerler baz alınarak tanımlanmaktadır:

Sinerjik etki:	ΣFİK ≤ 0.5
Aditif etki:	ΣFİK > 0.5 ve ≤ 1
Bağımsız etki:	ΣFİK= >1-<4
Antagonist etki:	Σ FİK ≥4

Zamana bağlı öldürme eğrisi (Time kill curve)

Antimikrobiyal etkileşimi zamana bağlı olarak ortaya koyan ve test edilen kombinasyonun mikrobisidal aktivitesini ölçen bir yöntemdir. Bu yöntemde standart hücre süspansiyonu farklı zaman aralıklarında (0., 3., 6., 12. ve 24. h) ilaç kombinasyonlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılır ve belirlenen zaman aralıklarında besiyerine pasaj yapılarak inkübasyona bırakılır. Her zaman aralığı için canlı kalan hücreler hesaplanır ve test edilen her ilaç konsantrasyonu için öldürme-zaman eğrisi elde edilir (Eliopoulus and Moellering, 2000).

E-test

E-testi azalan konsantrasyonlarda standart ilaç etken maddesi içeren plastik bir şeridin belli bir yoğunlukta mikroorganizma içeren agar plakalara yerleştirilip MİK belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Plaklar 18-24 s süreyle 35 °C'de inkübe edilir. Agar yüzeyinde üreme inhibisyon zonu ile antimikrobiyal madde emdirilmiş şerit üzerindeki kesiştiği noktadan MİK değeri belirlenir (Wanger, 2007).

Uçucu Yağ ve Standart İlaç Etken Madde Kombinasyonları

Antimikrobiyal maddelerin bilinçsiz ve yanlış kullanılması mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç gelişmesine sebep olmaktadır. Dirençli mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi daha zor ve pahalı olmakta ayrıca ölüm oranlarında artışa neden olmaktadır. Antibiyotik tüketimi 2000-2010 yılları arasında dünya genelinde % 36'lık bir artış gösterdiği bildirilmiştir. Yeni kuşak antibiyotiklerin kullanımında % 45 artış olduğu ortaya konmuştur. Amerika'da her yıl 2 milyondan fazla kişinin antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara yakalandığı, bu yüzden her yıl en az 23000 kişinin hayatını kaybettiği ve yaklaşık tedavi maliyetinin de 20 milyon USD bulduğu açıklanmıştır (http-5).

Günümüzde mevcut antibiyotik ve antifungal maddelere dirençli olan mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlarda tedavi oranı düşük olmaktadır**.** Bu sebeple de kimyasal sentetik maddeler yerine yeni doğal madde arayışları önem taşımaktadır. Antimikrobiyal direncin önlenmesinde birçok yeni doğal tedavi yaklaşımları söz konusudur: Aşılar, bakteriyofajlar, sitokinler, probiyotikler, arkeosinler (Archaea grubu mikroorganizmalardan elde edilmekte), eser elementler (selenyum, çinko) kullanımları şeklindedir (Ogbodo ve ark., 2011; Upadhyay, 2011).

Bitkisel kaynaklar insanlar tarafından kullanımlarından dolayı bu anlamda avantaj taşımaktadır. Özellikle uçucu yağların çok bileşenli kimyasal içeriklerinin olması ve kompleks etki mekanizmaları ile standart ilaç etken maddelerine göre avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple antimikrobiyal dirence bağlı ciddi enfeksiyonların tedavisinde etkin ve yan etkileri daha az olarak rol oynayabilir (Farnsworth, 1990).

Antimikrobiyal etkileri ve kompleks yapıları bilinen uçucu yağların standart ilaç etken maddeleri ile ilgili kombinasyon çalışmaları son yıllarda giderek artmaktadır (Aleksic ve ark., 2014; Tejeswini ve ark., 2014; Veras ve ark., 2012).

Çizelge 6.'da uçucu yağ ve antifungal madde / uçucu yağ ve Çizelge 7.'de ise antibakteriyel madde ile güncel literatürde yapılmış kombinasyon çalışmaları derlenip listelenmiştir.

Çizelge 5. Uçucu yağ ve bileşenleri ile antifungal madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Uçucu yağ/bileşen	Antifungal madde	Maya / Mantar Türleri	Kaynak
Geraniol *Sitronellol* *Pelargonium graveolens*	Ketokonazol Amfoterisin B	*Aspergillus niger* ATCC 9029 *A. flavus* YUFE 1030	(Shin, 2003)
Agastache rugosa	Ketokonazol	*Aspergillus niger* KCCM 11239, *A. flavus* KCCM 11453, *Trichoderma viride* KCCM 11246, *C. albicans*, KCCM 11282, *C.utilis* KCCM 11356, *C. tropicalis*, KCCM1257 *Cryptococcus neoformans* KCCM 50564, *Trichosporon mucoides* KCCM50570, *Trichophyton tonsurans*, KCCM 11866, *B. capitatus* KCCM 5027	(Shin, 2004)
Pelargonium graveolens Sitronellol Geraniol	Ketokonazol	*Trichophyton erinacei* KCCM 60411 *T. mentagrophytes* KCCM11950 *T. rubrum* ATCC 6345 *T. tonsurans* KCCM 11866 *T. schoenleinii* KCCM 60477 *T. soudanense* KCCM 60448	(Shin ve ark., 2004)
Cinnamomum cassia	Amfoterisin B	*C. albicans* ATCC 90029	(Giordani ve ark., 2006)
Allium sativum for. pekinense, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*	Ketokonazol	*Trichophyton rubrum* *T. erinacei* *T. soudanense* izolat	(Pyun ve ark., 2006)
Eucalyptus globulus, 1,8-sineol	Ketokonazol	*C. albicans* KCCM 11282 *C. utilis* KCCM 11356 *C. tropicalis* KCCM 12578 *T. erinacei* KCCM 60411 *T. mentagrophytes* KCCM 11950 *T. rubrum* ATCC 6345 *T. schoenleinii* KCCM 60477 *T. soudanense* KCCM 60448 *T. tonsurans* KCCM 11866	(Lim, 2008)
Oliveria decumbens	Amfoterisin B	*C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* izolat	(Mahboubi ve ark., 2008)
Melaleuca alternifolia *Origanum vulgare* *Pelargonium graveolens*	Amfoterisin B	*C. albicans* NRRLY 27077 NRRLY 12983, NRRLY-869 *C. krusei* NRRLY 7179, *C. parapsilosis* NRRLY 22019 *C. tropicalis* NRRLY 404 *C. guillermondi* NRRLY 324 *C. glabrata* NRRLY 6, *C. albicans* ATCC 10231 *C. tropicalis* ATCC 750	(Rosato ve ark., 2008)

Çizelge 5. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antifungal madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Ligusticum chuanxiong	Ketokonazol İtrakonazol	*Trichophyton erinacei rophytes* KCCM 11950 *T. rubrum* ATCC 6345 *T. schoenleinii* KCCM 60477 *T. soudanense* KCCM 60448 *T. tonsurans* KCCM 11866	(Sim ve ark., 2008)
Origanum vulgare *Pelargonium graveolens* *Melaleuca alternifolia*	Nistatin	*C. albicans* NRRLY 417, ATCC 24433, ATCC 90028, NRRLY 27077, NRRLY 12983, ATCC 10231, ATCC 14053, *C. krusei* NRRLY 7179, *C. tropicalis* ATCC 750	(Rosato ve ark., 2009)
Melaleuca alternifolia, *Thymus vulgaris* *Mentha piperita* *Rosmarinus officinalis*	Amfoterisin B	*C. albicans* ATCC 10231	(Van Vuuren ve ark., 2009)
Öjenol Metil öjenol	Flukonazol	Flukonazol duyarlı / dirençli *Candida* klinik izolatları (*C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis C. parapsilosis C. krusei*)	(Ahmad ve ark., 2010)
Ocimum sanctum	Flukonazol Ketokonazol	*C .albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 90030	(Amber ve ark., 2010)
Myrtus communis	Amfoterisin B	Klinik izolat *Aspergillus flavus, A. niger* ATCC 16404, *A. parasiticus* ATCC 15517, Klinik izolat *C. albicans, C. albicans* ATCC 10231	(Mahboubi ve ark., 2010)
Bergamot Alman Papatyası, Roman Papatyası, Misk adaçayı, Ökaliptus, Ardıç, Lavanta, Limon, Melisa, Neroli, Portakal, Nane, Gül, Vetiver, 1,8-sineol, Sitral, Sitronellol, Sitronellal, Öjenol, Farnesol, Geraniol, Limonen, Linalol, α-Pinen	Amfoterisin B	*C. albicans* FH01, *C. albicans* IFM40009 *C. tropicalis* NA01	(Nozaki ve ark., 2010)

Çizelge 5. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antifungal madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Rosmarinus officinalis, Coriandrum sativum, Micromeria fruticosa, Cumium cyminum, Mentha piperita	Nistatin	*Saccharomyces cerevisiae* WET 136, *Kluvyeromyces fragilis* DC 98	(Toroğlu, 2011)
Cinnamomum verum	Klotrimazol	İzolatlar; *Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis, T. rubrum, T. verrucosum, Epidermophyton floccosum*	(Abdel-Aziz, 2012)
Echinophora platyloba	Amfoterisin B	*C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13801, *Rhodotorula rubra* PTCC 5076, *R. mucilaginosa* ATCC 2503	(Saei-Dehkordi ve ark., 2012)
Satureja khuzestanica	Flukonazol, Amfoterisin B	*C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13801 *Rhodotorula mucilaginosa* ATCC 2503, *R. rubra* PTCC 5076	(SiavashSaei-Dehkordi ve ark., 2012)
Otacanthus azureus	Ketokonazol Flukonazol İtrakonazol	*Microsporum gypseum, Microsporum canis, T. tonsurans LMGO 45, T. rubrum LMGO 6, T. mentagrophytes LMGO 1931*	(Houel ve ark., 2014)
Mentha suaveolens	Flukonazol Mikafungin	*C. albicans* izolat	Stringaro ve ark, 2014)
Chenopodium ambrosioides var. ambrosioides	Flukonazol	*C. albicans* CCMM L4 *C. glabrata* CCMM L7 *C. krusei* CCMM L10, *C. parapsilosis* CCMM L18	(Brahim ve ark., 2015)
Thymus magnus, T.quinquecostatus	Okzasilin, Norfloksasin Kanamisin sülfat Streptomisin	*Streptococcus pneumoniae* KCCM 49619, *S. aureus* ATCC 29213, *Salmonella enteritidis* KCCM 12201, *S. typhimurium* KCCM 11862	(Shin ve ark., 2005)

Çizelge 6. Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Uçucu yağ/bileşen	Antibakteriyel madde	Bakteri Türleri	Kaynak
Teucrium polium, *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *Ocimum basilicum*, *Foeniculum vulgare*	Gentamisin Sefalotin Seftriakson	*Micrococcus luteus* LA 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *B. brevis* FMC 3, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *E. coli* DM, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AÜ 19, *Staphylococcus aureus* Cowan1, *Streptococcus faecalis* DC 74, *S. cerevisiae* WET 136, *Kluvyeromyces fragilis* DC 98	(Toroğlu ve ark., 2005)
Laurus nobilis, *Zingiber officinale*	Gentamisin Sefalotin Seftriakson	*Micrococcus luteus* LA 2971 *Bacillus megaterium* NRS *B. brevis* FMC 3 *Enterococcus faecalis* ATCC15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *E. coli* DM, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AÜ 19, *S. aureus* Cowan1,, *Streptococcus faecalis* DC 74, *S. cerevisiae* WET 136, *Kluvyeromyces fragilis* DC 98	(Toroğlu ve ark., 2006)
Mentha piperita, Mentol	Oksasilin Norfloksasin Eritromisin	*Streptecoccus pnemoniae* KCCM 40410, *S. pnemoniae* KCCM	(Choi, 2007)
Rosmarinus officinalis *Salvia officinalis* *Origanum vulgare* *Thymus serpyllum* *Pelargonium graveolens* *Myrtus communis* Karvakrol Timol Ökaliptol Sitronellol	Norfloksasin	*Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. subtilis*, ATCC 6633, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213	(Rosato ve ark., 2007)

Çizelge 6. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

trans-Sinnamaldehit	Klindamisin	*Clostridum difficile* izolat	(Shahverdi ve ark., 2007)
Thymus eigii	Vankomisin Eritromisin	*Micrococcus luteus* LA 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *B. brevis* FMC 3, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *E. coli* DM, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AU 19, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Streptococcus faecalis* DC 74, *Saccharomyces cerevisiae*, WET 136, *Kluvyeromyces fragilis* DC	(Toroğlu, 2007)
Origanum vulgare	Seftriakson, Seftazidim, Sefotaksim Aztreonam	*E. coli* klinik izolat	(Si ve ark., 2008)
Öjenol	Penisilin Ampisilin, Oksasilin, Eritromisin, Polimisin B sülfat, Tetrasiklin, kloramfenikol Vankomisin Rifampin Norfloksasin	*E. coli* NCIM 2931, *Enterobacter aerogenes* NCIM 5139, *Proteus vulgaris* NCIM 2813, *Salmonella typhimurium* NCIM 2501, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5029	(Hemaiswarya ve ark., 2009)
Artemisia iwayomogi Vulgaron B	Oksasilin	*S. aureus* CCARM 0027, CCARM 3511, CCARM 3523, *Salmonella enteritidis* KCCM 12201, CCARM 8010, CCARM 8011, *S. typhimurium* KCCM 11862, CCARM 8007 ve CCARM 8009	(Chung ve ark., 2009)
Karvakrol	Nalidiksik asit	*E. coli*, *E. coli* 078, *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. enteritidis*, *S. minesota*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* izolat	(Choi ve ark., 2009)

Çizelge 6. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Thymus vulgaris	Ampisilin Gentamisin	*S. aureus* ssp. *aureus* DSM 799, *S. epidermidis* DSM 20044, *S. saprophyticus* DSM 20229, *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* DSM 681, *E. coli* ATCC 25922	(Iten ve ark., 2009)
Croton zehntneri	Gentamisin Tetrasiklin	*P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 12692	(Rodrigues ve ark., 2009)
Melaleuca alternifolia, Thymus vulgaris Mentha piperita, Rosmarinus officinalis	Siprofloksasin	*S. aureus* ATTC 25923, *K. pneumoniae* NCTC 9633, *C. albicans* ATCC 10231	(Van Vuuren ve ark., 2009)
Zataria multiflora	Vankomisin	MRSA ve MSSA *S. aureus*	(Mahboubi ve ark., 2010)
Rosmarinus officinalis Coriandrum sativum Micromeria fruticosa, Cumium cyminum Mentha piperita	Gentamisin Sefalotin Seftriakson	*Micrococcus luteus* LA 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *B. brevis* FMC 3, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Pseudomonas pyocyaneus* DC 127, *Mycobacterium smegmatis CCM 2067, E. coli DM, Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Yersinia enterocolitica* AU 19, *S. aureus* Cowan 1, *Streptococcus faecalis* DC 74	(Toroğlu, 2011)
Coriandrum sativum	Sefoperazon Kloramfenikol Siprofloksasin Gentamisin Tetrasiklin Piperasilin	*Acinetobacter baumannii LMG 1025,Acinetobacter baumannii LMG 1041*	(Duarte ve ark., 2012)
Thymus maroccanus, Thymus broussonetii	Siprofloksasin Gentamisin Pristinamisin Sefiksim	*E. coli* K12 W1130, *Salmonella sp.* CCMM B17, *Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Vibrio cholerae, P. aeruginosa, B. subtilis* ATCC 9524, *B. cereus* ATCC 14579, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *S. aureus* klinik izolat	(Fadli ve ark., 2012)
Citrus limon Cinnamomum zeylanicum	Gentamisin Amikasin İmipenem Meropenem	*Acinetobacter* spp.	(Guerra ve ark., 2012)

Çizelge 6. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Satureja khuzestanica	Siprofloksasin	*S. aureus* ATCC 2228, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 12711, *S. pneumoniae* ATCC 33400, *E. coli O157:H7* ATCC 43895, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumoniae* ATCC10031	(SiavashSaei-Dehkordi ve ark., 2012)
Myrtus communis	Polimiksin B Siprofloksasin	*Acinetobacter baumannii* izolat	(Aleksic ve ark., 2014)
Thymus glabrescens	Kloramfenikol	*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213	(Ilic ve ark., 2014)
Tetraclinis articulata	Amoksisilin	*Salmonella enterica* E32, *Klebsiella pneumoniae* CIP 8291, *Listeria monocytogenes* CIP 82110, *Staphylococcus aureus* CIP 7625, *P. aeruginosa* CIPA 22, *E. coli* ATTC 10536	(Djouahri ve ark., 2014)
Thyme Marjoram Sage	Piperasilin Sefepim Meropenem Gentamisin Norfloksasin	*Pseudomonas aeruginosa*	(El-Hosseiny ve ark., 2014)
Thymus riatarum	Kloramfenikol Norfloksasin	*E. coli* AG100, *E. coli* K-12, *Salmonella* CCMM B17, *Enterobacter cloacae* klinik izolat, *E. aerogenes* EAEP289, çoklu ilaç dirençli klinik izolat, *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolat, *Bacillus subtilis* ATCC 9524, *B. cereus* ATCC 14579, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *S. aureus* CCMM B3 (laboratuvar koleksiyonu)	(Fadli ve ark., 2014)

Çizelge 6. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Elletaria cardamomum 1,8-Sineol	Amoksisilin Siprofloksasin	MRSA *S. aureus* 37, *S. aureus* 4185, *S. aureus* ATCC 25923	(Gradinaru ve ark., 2014)
Thymus saturejoides	Sefiksim	*S. aureus* CCMM B3, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes ATCC* 19115, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* (klinik izolat)	(Kasrati ve ark., 2014)
Cardamom (Kakule) Fennel (Rezene) Coriander (Kişniş) Caraway(Kimyon) Ajowan (Ajovan)	Siprofloksasin Streptomisin	*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* izolat	(Mazumder ve ark. 2014)
Eucalyptus globulus	Gentamisin	*Pseudomonas aeruginosa*	(Pereira ve ark., 2014)
Lavandula angustifolia	Piperasillin	*E. coli* J53 R1	(Yap ve ark.,2014)
Chenopodium ambrosioides var. *ambrosioides*	Siprofloksasin Kanamisin Sefiksim	*S. aureus* CCMM B3, *M. luteus* ATCC 10240, *B. cereus* ATCC 14579 *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* klinik izolat, *C. albicans* CCMM L4, *C. glabrata* CCMM L7, *C. krusei* CCMM L10, *C. parapsilosis* CCMM L18	(Brahim ve ark., 2015)
Karvakrol	Eritromisin	32 adet eritromisin dirençli *Streptococcus pyogenes* izolatı	(Magi ve ark., 2015)
Alpinia zerumbet	Neomisin Amikasin Kanamisin Gentamisin	*S. aureus* ATCC 12692, *S. aureus* ATCC 12624, *S. aureus* 358, *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 27, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Vibrio colareae* ATCC 15748	(Mendes ve ark., 2015)
Thymus glabrescens Geraniol Timol	Tetrasiklin	*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 *P. mirabilis* ATCC 12453 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. aureus* ATCC 29213	(Miladinovic ve ark.2015)

Çizelge 6. (Devam) Uçucu yağ ve bileşenleri ile antibakteriyel madde kombinasyonları üzerine yapılmış çalışmalar

Salvia officinalis	Sefriakson Siprofloksasin Gentamisin	MRSA *S. aureus*	(Milenkovic ve ark., 2015)
Timol Öjenol Sinnamaldehit	Streptomisin	*L. monocytogenes* CMCC 54004, *S. typhimurium SL1344*	(Liu ve ark., 2015)

In vitro Toksisite Test Çalışmaları

Antimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde yeni, etkin ve düşük toksisiteye sahip bileşiklerin geliştirilme sürecinin erken dönemlerinde yeni aday bileşiklerin sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Genotoksik ve sitotoksik etkiler, ilaç adaylarının potansiyel olarak insanlarda kullanılabilirliklerinin en önemli basamağını oluşturmakla birlikte klinik öncesi güvenilirlik çalışmalarında belirlenmektedir. Bu etkilerin belirlenmesinde *in vitro* sistemler büyük önem taşımaktadır. *In vitro* hücre temelli toksisite testleri ile aday bileşiklerin olası güvenilirlik sorunları erken dönemde belirlenebilmektedir (Pohjala ve ark., 2007; Thybaud ve ark., 2007; Huang ve ark., 2008).

Toksisite testlerinin amacı kimyasal maddelerin biyolojik sistemlerde meydana getirdiği zararlı etkileri saptamak, toksisiteyi hangi koşullarda meydana getirdiğini belirlemek ve doz-cevap ilişkisini belirlemektir. Toksisiteyi etkileyen temel faktörler toksik maddenin dozu, veriliş yolu, temas süresi ve sıklığıdır (Vural, 2005).

Herhangi bir ilacın belli organ veya dokular üzerine zararlı etkileri, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerinin olup olmadığını saptamaya yönelik alternatif testler geliştirilmektedir. Bunun için çok sayıda insan ve hayvan hücre kültür modelleri kullanılmaktadır (Vural, 2005).

Uçucu Yağ Toksisite Çalışmaları

Bilindiği gibi, uçucu yağ ve uçucu yağ bileşenlerinin günlük hayatta kozmetik, ilaç, gıda gibi çok yaygın kullanım alanları mevcuttur. Gıda endüstrisinde aroma olarak, kozmetik endüstrisinde koku dışında fonksiyonel temizlik, saç ve cilt bakım ürünlerinde sık kullanım alanlarına sahiptir. İlaç olarak ve aromaterapide de kullanılan uçucu yağlar ve bileşenleri birçok farklı uygulama şekillerinde (özellikle inhalasyon ve dermal uygulamalar) cilt hassasiyeti, genotoksisite, nörotoksisite ve reprodüktif toksisiteye sebep olabilirler bu nedenle terapötik amaçlı olarak kullanılan uçucu yağların kimyasal kalitesi kadar güvenliliği de önem taşımaktadır (Tisserand ve Young, 2014).

Uçucu yağ bileşenlerinin kompleks kimyasal yapılarından dolayı potansiyel alerjen ve toksik etkileri olasıdır. Farklı oranlarda ve karşım halinde hidrokarbonlar, alkoller, fenoller, aldehitler, ketonlar, esterler, eterler, peroksitler, laktonlar, karboksilik asitler, sülfürlü vb. bileşikler içerirler. Uçucu yağı oluşturan bileşiklerin birbirleri ile olan aditif, sinerjik veya antagonistik etkileri farklı dokdu ve organizmalara karşı toksisite oluşturabilir (Tisserand ve Young, 2014).

WS1-XTT toksisite testi

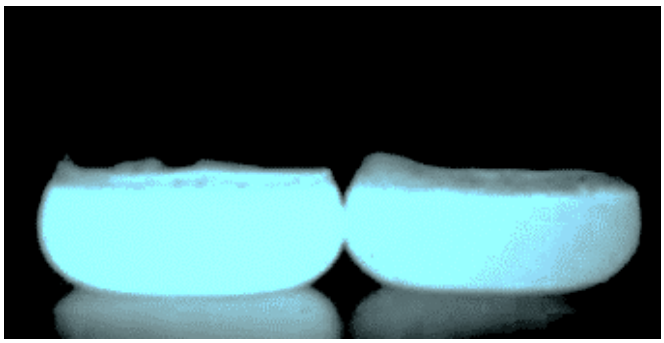
Deneysel çalışmada *in vitro* yöntemler kulanılarak toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla normal WS1 (insan cilt fibroblast) hücrelerinde XTT sitotoksisite testi uygulanmıştır.

Aliivibrio fischeri biyolüminesans toksisite testi

Biyolüminesans canlı mikroorganizmalar yoluyla ışığın emilimi sonucu ortaya çıkar. Kimyasal tepkime sonucu oluşan lüminesansın canlılar tarafından oluşturulan bir çeşidi olup, kendiliğinden ışık üretme ve yayma olayıdır. Bu geni taşıyan rekombinant mikroorganizmaların da kullanıldığı yöntemler geliştirilmektedir. Biyolüminesan organizmalar bir renk maddesi proteini olan lüsiferini ve lüsiferaz enzimini üretir. Lüsiferin oksijenle tepkimeye girerek ışık oluşturur. Bakteriyel lüminesanstan sorumlu gen lux genidir. Kimyasal tepkime hücrenin içinde ya da dışında gerçekleşebilir (Ulitzur, 1997).

Biyolüminesans inhibisyon testlerinde *A. fischeri* en çok kullanılan bakterilerden birisidir. *A. fischeri* toksisite testinin temeli bakterinin toksik maddeye karşı ışık yoğunluğunun azalmasına dayanmaktadır. Bunun sebebi tür olarak bu bakterinin birçok kimyasala karşı hassas olmasıdır. Numunedeki toksik maddeler organizmaların metabolizmasını ters yönde etkiler ve lüminesansta azalmaya neden olur ve organizma daha az ışık üretmeye başlar. Biyolüminesanstaki kalitatif ve kantitatif azalma numunenin genel toksisitesinin izlenmesinde kullanılmaktadır (Fernandez-Alba ve ark., 2002).

Hassas, duyarlı, güvenilir, hızlı sonuç vermesi, uygulanabilirliği kolay olması ve maliyeti az olmasından dolayı biyolüminesans inhibisyon toksisite testlerinin kullanımı giderek artmaya başlamıştır. *In vitro* testlerde canlı mikroorganizma veya ticari liyofilize kitler kullanılmaktadır. *A. fischeri*'nin kullanıldığı biyoluminesans inhibisyonu testinde akut zehirliliğin belirlenmesi için Microtox, Biotox, Lumistox, Toxalert gibi test kitleri kullanılmaktadır (Jennings ve ark., 2001)



Şekil 11. Biyolüminesans oluşumu

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

GEREÇLER

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Maddeler Besiyerleri, Standart Antibakteriyel ve Antifungal İlaçlar ve Cihazlar

Bu bölümde deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar, uçucu yağlar, standart antimikrobiyal maddeler ve besiyerleri hakkında bilgiler verilmektedir.

Kimyasal maddeler ve çözücüler

Bu kısımda deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler listelenmiştir.

Çizelge 7. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Adı /Markası	
Anisaldehit (Fluka)	MTT [3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] (Applichem)
Aseton (Merck)	Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth II (Merck)
Dietil eter (Merck)	Penisilin-Streptomisin (Wisent)
Dimetilsülfoksit (Merck)	Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biomatik)
Diklorometan (Merck)	Potasyum dikromat (Merck)
Etanol (Merck)	Potato Dekstroz Agar (Merck)
Gliserol (Sigma-Aldrich)	RPMI besiyeri (Sigma)
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Sigma-Aldrich)	Rezasurin sodyum tuzu (Sigma)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent)	Sodyum hidroksit (Merck)
Hazır İTK plakları (Merck)	Silikajel 60 G (Merck)
n-hekzan (Merck)	Sodyum klorür (Merck)
Metanol (Merck)	Tripsin EDTA çözeltisi (10X) (Wisent)
Mueller Hinton Agar (Fluka)	Tripan blue solüsyonu (Biorad)

Cihazlar

Bu kısımda deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar listelenmiştir.

Çizelge 8. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Adı/Modeli
Otomatik pipetleme sistemi (Beckman Coulter, Biomek 4000)
Mikrobiyolik Kabin (Laminar Flow Class Bio II-Heal Force)
pH-Metre, (WTW Inolab)
Bakteriyolojik etüv (MMM-Incucell)
Gaz-Kromatografisi / (Kütle Spektrometresi (Agilent 5975 GC-MSD)
Rota vapor (Heidolph)
Otoklav (Hirayama HV-50)
Ultra Derin dondurucu (New Brunswick Scientific)
Mikroplate okuyucu (Biotek, Synergy, H1)
CO_2 inkübatörü (HERAcell 150 Steril Thermo Scientific)
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
Hücre Sayım Cihazı (Biorad)
Ters mikroskop (Leica)
Su banyosu (Wise Clean)

Tez kapsamında kullanılan uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri

Deneysel çalışmalarda farklı ticari kaynaklardan temin edileen Farmakope kalitesinde uçucu yağlar kullanılmıştır: Papatya uçucu yağı (Matricariae aetheroleum) (Phatrade, Kahire, Mısır), sivri lavanta uçucu yağı (Spicae aetheroleum) (St. Wolfgang Apotheke, Kümmersbruck, Almanya), Bodur çam uçucu yağı (Pini pumilionis aetheroleum) (Caelo Firması, Almanya), Mandalina uçucu yağ (Citri reticulatae aetheroleum) (Caelo Firması, Almanya).

Çizelge 9. Kombinasyon çalışmalarında kullanılan uçucu yağ bileşenleri

Ana bileşenler	% Saflık
R-(+)-Limonen (Aldrich)	97 %
(+) Linalol (Polarome)	97 %
1,8-Sineol (Aldrich)	97 %
(±)-Kafur (Aldrich)	≥ 95 %
β-Karyofillen (Polarome)	95 %
α-Pinen (Aldrich)	98 %
(-)-*β*-Pinen (Aldrich)	99 %
γ-Terpinen (Aldrich)	97 %
Farnesen, isomer karışımı (Sigma)	-
Bisabolol (Aldrich)	99 %
(+) δ-3-Karen (Fluka)	≥98.5 %

Standart antibakteriyel ve antifungal ilaç etken maddeleri

Standart Farmakope kalitesinde sertifikalı analizlerine uygun olarak temin edilen Ampisilin sodyum, sefuroksim aksetil ve nistatin Deva İlaç A.Ş'den tedarik edilmiştir. Tetrasiklin ve flukonazol (Sigma) ticari kaynaklardan temin edilmiştir. Bu maddeler hem kombinasyon çalışmalarımızın ham maddesi hem de standart antimikrobiyal kontrol maddeleri olarak ilgili deneylerde kullanılmıştır.

Mikroorganizmalar

Tez kapsamında antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan klinik dirençli patojenler *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* mikroorganizma suşları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan standart suşlar *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538 ve *C. albicans* ATCC 90028 Microbiologics firmasından temin edilmiştir. Mikroorganizmalar kullanılıncaya kadar uygun koşullarda 2-8 °C'de, stok kültürleri -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

Besiyerleri

Deneysel çalışmada bakteri suşlarını aktive etmek için Mueller Hinton Agar (MHA) ve maya suşlarında ise Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ve kombinasyon testlerinde bakteri suşları için katyon ilaveli Mueller Hinton broth II (KMHBII) ve maya suşları için RPMI 1640 sıvı besiyerleri kullanılmıştır.

MHA besiyeri; toz halindeki 34 g Mueller Hinton agar (MHA) 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek 45 °C'ye soğutulup Petri kaplarına dağıtılmıştır.

PDA besiyeri; toz halindeki 39 g Potato dekstoz agar (PDA) 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek 45 °C'ye soğutulup Petri kaplarına dağıtılmıştır.

KMHB-II besiyeri; toz halindeki 22 g katyon ilaveli Mueller hinton broth II 1000 mL distile suda çözündürülerek hazırlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (CSLI, M7-A7, 2006).

RPMI 1640 besiyeri; 10.4 g toz RPMI 1640 besiyeri 900 mL distile suda çözünmüş ve son konsantrasyon 0.165 mol/L olacak şekilde 34.53 g MOPS [3-*N*-(morfolino propanosulfanik asit, Sigma)] tamponu ilave edilmiştir. 1 mol/L Sodyum hidroksit kullanılarak 25 °C'de pH 7.0'ye ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (CLSI, M27-A2, 2002).

YÖNTEMLER

Kromatografik-Spektroskopik Yöntemler

Uçucu yağların gaz kromatografisi / alev iyonlaşma dedektörü (GK/AİD) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ile analizi

Uçucu yağların eş zamanlı gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GK/KS) ile analizleri gerçekleştirilmiştir. GK sisteminde kolonda ayrılan bileşikler AİD (Alev iyonlaşma dedektörü) dedektör ile tespit edilerek bileşiklerin bağıl yüzdeleri (%) belirlenmiştir. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle spektrometrisi kısmında tek tek kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi"'nin yanı sıra Wiley GC/MS, "Adams" ve "MassFinder 3.1" kütüphane yazılımları kullanılarak yapılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Koenig ve ark., 2004).

GK/AID analiz koşulları

GK analizleri Agilent 6890N sistemi kullanılarak yapılmıştır. Agilent 6890N sisteminde AİD detektör sıcaklığı 300 °C dir. GK/KS sistemi ile uyumlu tutunma zamanları elde edilebilmesi için 60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığında HP-Innowax kolon kullanılmış ve aşağıda verilen şekilde aynı sıcaklık programı uygulanmıştır.

GK/KS analiz koşulları

GK/KS analizlerinde Agilent 5975 GC/MSD sistemi kullanılmıştır. GK sisteminde kullanılan tipte kolon kullanılarak taşıyıcı gaz akış hızı 0.8 mL/dak. olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklık programı; 60 °C'de 10 dak, 4 °C/dak artışla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dak, 1 °C/dak artışla 240 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Split oranı ise 40:1'dir. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250 °C olarak set edilmiştir. Kütle spektrumları (MS) 70 eV elektron enerjisi uygulanarak ve m/z 35-450 kütle aralığında alınmıştır**.**

Kolon Kromatografisi (KK) ile Uçucu Yağların Fraksiyonlanması

Uçucu yağların fraksiyonlanmasında özel olarak hazırlanmış vakum-kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Kromatografik adsorban olarak silikajel 60 (Meck-7734, 0.06 mm - 0.2 mm) kullanılmıştır. Silikajel kullanımdan önce 2 saat 120 °C de etüvde aktive edilmiştir.

Çalışmada alttan vakum düzeneği ve ilgili adaptörleri olan borosilikat cam kolon (1.5 x 50 cm) kullanılmıştır. Silikajel, uçucu yağ miktarının 10 katı civarında kolona öncesinde bir miktar çözücü ile dikkatli bir şekilde doldurulmuştur. Uçucu yağ doğrudan kolona uygulanarak sırası ile kolondan *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol olmak üzere 4 farklı fraksiyon toplanmıştır. Çözücüler tamamıyla alındıktan ve kuruduktan sonra, çözücüler arası fraksiyonlar İTK sistemi ile kontrol edilerek toplanan hacimler belirlenmiştir.

Fraksiyonlara ait % verimler hesaplanmış ve uçucu yağlara ait fraksiyonların kimyasal bileşenleri İTK ve GK/AİD ve GK/KS analizleri ile tespit edilmiştir.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Aluminyum destek üzerine 0.2/0.25 mm kalınlığındaki silikajel 40/60 GF_{254} kaplanmış 20 × 20 cm ebatlarında hazır plaklar kullanılmıştır. Uygun çözücü sistemlerinde develope edilip, plaklar kurutulduktan sonra UV ışık altında 254/364 nm dalga boyunda incelenmiştir. UV absorbsiyonu olmayan maddelerin belirlenmesinde ve teşhisinde renk reaktifi olarak anisaldehit-sülfürik asit ve ısı (120 °C de 3-5 dakika) kullanılmıştır.

Çizelge 10. İTK çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri

Çözücüler	Oranları (h:h)
***n*-Hekzan: etil asetat**	3:1
Toluen: etil asetat	97:3

Antimikrobiyal Aktivite Yöntemleri

Standart antibakteriyel ve antifungal ilaç etken maddeleri ve hazırlanışı

Deneysel çalışma kapsamında ampisilin, sefuroksim, tekrasiklin, nistatin ve flukonazol standart ilaç etken maddeleri kullanılmıştır. Toz halde temin edilen bazı ilaç etken hammaddeleri CLSI (2002 ve 2006)'nin önerilerine göre, analiz sertifika verileri değerlendirilerek potensleri hesaplanmış, mL'de elde edilmek istenen konsantrasyonuna göre seyreltme yapılacak sıvı hacimleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Hacim (mL)= Ağırlık (mg) x Potens (µg/mg)/Konsantrasyon (µg/mL) **(Formül 2)**

Ampisilin, tetrasiklin ve flukonazol 1280 µg/mL olacak şekilde steril distile suda; sefuroksim aksetil ise 1280 µg/mL olacak şekilde dimetil sulfoksit (DMSO)'te, nistatin ise 1600 µg/mL olacak şekilde DMSO'da çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Her birinde 1 mL olacak şekilde steril mikro tüplere dağıtılarak kullanılıncaya kadar -85 °C'de muhafaza edilmiştir.

Antifungal ilaç etken maddelerinin hazırlanması

Mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak test izolatlarına karşı her antifungal maddenin MİK değeri saptanmıştır. Flukonazol için sınır değerleri (MİK ≤ 8, duyarlı; MİK= 16-32, doza bağlı duyarlı; MİK ≥ 64, dirençli**)** olarak CLSI tarafından standardize edilmiş olmakla birlikte amfoterisin B ve nistatin için standardize bir değer yoktur. Daha önceden hazırlanmış olan stok antifungal solüsyonlardan CLSI önerileri doğrultusunda antifungaller için hazırlanan dilüsyonlar **Çizelge 11'de** verilmiştir (CLSI, M27-A2, 2002).

Çizelge 11. Standart antifungal maddeler için hazırlanan test konsantrasyonları

Antifungal maddeler	**Mikrodilüsyon Test konsantrasyonları (µg/mL)**									
Flukonazol (FLU)	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Nistatin (NS)	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16

Antibakteriyel ilaç etken maddelerinin hazırlanması

Mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak test izolatlarına karşı her antibiyotik maddenin MİK değeri saptanmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan stok antibiyotik solüsyonlardan CLSI önerileri doğrultusunda antibiyotikler için hazırlanan dilüsyonlar **Çizelge 12**'de verilmiştir (CLSI, M7-A7, 2006). **Çizelge 13** ve **Çizelge 14**'de ise CLSI'nin *Escherichia coli ve Staphylococcus aureus* için belirlediği sınır MİK değerleri olarak verilmiştir.

Çizelge 12. Antibiyotikler için hazırlanan mikrodilüsyon test konsantrasyonları

Antibiyotikler	**Mikrodilüsyon Test konsantrasyonları (µg/mL)**									
Ampisilin (AMP)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Sefuroksim (SEF)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Tetrasiklin (TCY)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128

Çizelge 13. *Escherichia coli* için sınır MİK değerleri (sınır değerleri)

Antibiyotikler	**Duyarlı**	**Orta duyarlı**	**Dirençli**
Ampisilin	≤ 8	16	≥32
Sefuroksim	≤ 4	8-16	≥32
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥16

Çizelge 14. *Staphylococcus aureus* için sınır MİK değerleri

Antibiyotikler	**Duyarlı**	**Orta duyarlı**	**Dirençli**
Ampisilin	≤ 0.25	-	≥ 0.5
Sefuroksim	≤ 4	8-16	≥ 32
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16

Uçucu yağların hazırlanması

Farmakope kalitesinde temin edilen uçucu yağlar dimetil sülfoksitte (% 50) çözülerek **Çizelge 15**'te belirtilen konsantrasyon aralığında test edilmiştir. Aynı konsantrasyon aralığı uçucu yağların fraksiyonlarında (*n*-hekzan-dietil eter-diklorometan-metanol)'da kullanılmıştır.

Çizelge 15. Uçucu yağlar için hazırlanan konsantrasyonlar

Uçucu Yağlar	**Kod**	**Mikrodilüsyon test konsantrasyonları (µg/mL)**									
M. recutita	P	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
L. latifolia	SL	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
P. mugo	BÇ	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
C. reticulata	M	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120

Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Test Yöntemi

Her bir mikrobiyal suşa karşı, öncelikle CLSI'nın belirlediği standartlar doğrultusunda, antimikrobiyal maddelerin ve uçucu yağların MİK değerleri saptanmıştır.

Bu amaçla 96 kuyucuklu steril plaklar kullanılmıştır. Her antimikrobiyal numune için plağın 1'den 10'a kadar olan bir satır kullanılmış ve 11. sütun besiyeri kontrolü, 12. sütun ise üreme kontrolü olarak ayrılmıştır. Kullanılan bu kuyucukların hepsine KMHB-II besiyerinden 100 µL eklenmiştir (Maya şuşları için 100 µL RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır). Her antimikrobiyal için kullanılan 12 kuyucuğun ilkine test edilecek antimikrobiyalin başlangıç konsantrasyonunu içeren çözeltisinden 200 µL eklenmiştir. Test edilecek en yüksek madde konsantrasyonunun eklendiği ilk kuyucuktan 100 µL alınıp maddenin çift kat seri dilüsyonları yapılmıştır.

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması: Mikroorganizma suşları testin 48 söncesinde, muhafaza edildiği -85 °C'den çıkarılıp oda ısısına geldikten sonra MHA besiyerine pasajlanan ve 35 ± 2 °C'de 24 sinkübe edilip üreyen saf kolonilerden KMHB-II besiyerine aktarılmış ve yine 35 ± 2 °C'de 24 sinkübe edilmiştir. Test edilecek bakteri kolonilerinden McFarland No: 0.5 türbidometrik olarak eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon, 1/10 oranında yine KMHB-II ile seyreltilerek, son bakteri inokulüm konsantrasyonu 5 x 10^5 cfu/mL olacak şekilde üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 5 µL eklenmiştir.

Maya süspansiyonlarının hazırlanması; Test öncesi *Candida* suşları PDA besiyerine pasajlanıp, 35 °C'de inkübe edimiş, 24 saat'lik taze kültürden koloni alınarak 5 mL steril % 0.85 sodyum klorür (NaCl) içinde süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon yaklaşık 15 saniye vortekslendikten sonra McFarland: 0.5 türbidometrik olarak ayarlanmıştır. Bu işlemle stok maya süspansiyonu her mililitrede 1-5x10^6 hücre içermektedir. Çalışma süspansiyonunun iki katının elde edilmesi için stok maya süspansiyonu RPMI 1640 besiyeri ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilerek sonuçta 1-5x10^3 hücre/mL'lik maya süspansiyonu elde edilmiştir.

Daha sonra plakların üzeri steril kapaklar ile kapatılmış ve 35 °C'de 24 (mayalar için yaklaşık 48 saat) saatlik inkübasyonun ardından MİK değerleri görsel olarak değerlendirilmiş ve üreme görülmeyen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu o maddenin çalışılan mikroorganizma için MİK değeri olarak belirlenmiştir. Daha sonra üreme kontrol reaktifi olarak hazırlanan % 0.01'lik resazurin sodyum reaktifi her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde pipetlenmiş ve plağın üstü kapatılarak 2 saat daha 35 ± 2 °C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plaklar tekrar değerlendirilmiş, indikatör olarak üreme olan kuyucuklar pembe, üreme olmayan kuyucuklar mavi renkte gözlenmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu test edilen mikroorganizma için o antimikrobiyal numunenin MİK değeri olarak belirlenmiştir (Amsterdam, 1996; CLSI, M27-A2, 2002; CLSI, M7-A7, 2006).

Üreme kontrol indikatörünün hazırlanması (Resazurin reaktifi)

Plak üzerinde üreme olan kuyucukları tespit etmek amacıyla kolorimetrik indikatör olarak resazurin sodyum tuzu (Sigma-Aldrich) % 0.01'lik kullanılmıştır. Toz halindeki indikatör, hassas terazide 10 mg olarak tartılmış, üzerine 100 mL steril distile su eklenerek % 0.01'lik solüsyon hazırlanmıştır. Reaktif çalışmanın yapıldığı gün taze olarak hazırlanmış ve günlük kullanılmıştır.

Kombinasyon Çalışmaları: Dama Tahtası Yöntemi

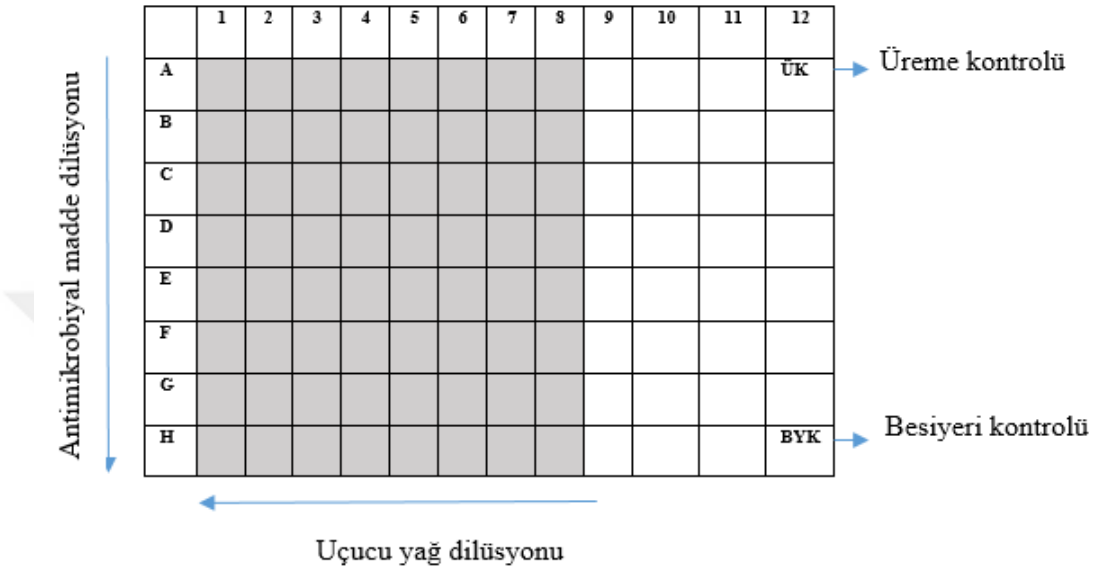
Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan standart yöntemler bulunmasına karşın antimikrobiyal kombinasyon çalışmalarında standart bir yöntem bulunmamaktadır. En sık olarak kullanılan dama tahtası ve zamana bağlı ölüm eğrisi yöntemleridir. Dama tahtası yöntemi uygulaması kolay ve değerlendirme yöntemleri basit olmasından dolayı daha fazla tercih edilmektedir. Değerlendirme ölçütlerinde basit matematiksel işlemler ile her kombinasyon için FİK indeks hesaplanır. Ancak antimikrobiyal etkileşimlerin zaman içerisindeki farmakodinamik etkileşimini ortaya koymaz. Bu nedenle zamana bağlı ölüm eğrisi yönteminde bu etkileşimlerin ortaya konulması sürekli tekrarlayan koloni sayımları ile yapıldığından oldukça yorucu ve zaman alıcıdır. Zamana bağlı ölüm eğrisi yöntemiyle bundan dolayı mikrobisidal aktivite de ölçülebilmektedir (Lewis ve ark., 2002; Mukherjee ve ark. 2005).

Aksi belirtilmedikce, çalışmamızda kullanılan her bir mikrorganizma için uçucu yağ ve standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının etkinliği dama tahtası yöntemi ile test edilmiştir.

-85 °C'de muhafaza edilen standart antimikrobiyal maddelerin stok solüsyonları oda ısısına getirildikten sonra ayrı ayrı steril tüplerde çift kat seri dilüsyonları her standart antimikrobiyal maddenin kendine özgü seyrelticisi (KMHB-II veya RPMI besiyerleri) ile yapılmıştır. Kombinasyonu yapılacak uçucu yağ ve standart antimikrobiyal maddeler MİK değerlerinin 2 kat üstü ve 4 kat altındaki konsantrasyon aralığında çalışılmıştır.

Kombinasyonda kullanılacak her iki maddenin (uçucu yağ ve antimikrobiyal madde) dilüsyonları hazırlandıktan sonra, 96 kuyucuklu steril mikroplaka alınarak, plağın A12 ve B12 çukurları üreme kontrolü (ÜK), H12 çukuru ise besiyeri kontrolü (BK) olarak işaretlenmiştir ve bu kuyucuklara antimikrobiyal konulmamıştır. Besiyeri kontrol kuyucuğuna 100 µL KMHB-II, üreme kontrol kuyucuğuna ise 50 µL KMHB-II besiyeri pipetlenmiştir. Kombinasyondaki antimikrobiyal madde için 8 yatay sıra; 1'den 8'e kadar (8. kuyucuk dahil) kullanılmış ve her yatay sırada azalan konsantrasyonları kullanılarak 25 µL olacak şekilde pipetleme yapılmıştır. Uçucu yağ için ise 8 dikey sıra kullanılmış ve aynı şekilde en düşük konsantrasyonu plağın 1 no'lu dikey sütunundan başlayarak 25'er µL olacak şekilde pipetlenmiştir. Bir sonraki konsantrasyon 2 no'lu dikey sütuna, bu şekilde çift kat artan dilüsyonları sıra ile sütunlara pipetlenmiştir. (*Candida*'lara karşı yapılan kombinasyon çalışmalarında 50'er µL pipetleme yapılmıştır). Kombinasyon plakları hazırlandıktan sonra bakteri ve maya süspansiyonları minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yönteminde olduğu gibi hazırlanmıştır. Elde edilen bakteri inokulumu, üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her kuyucuğa 50 µL olacak şekilde pipetlenmiştir. NOT: *Candida'*lara karşı yapılan kombinasyon çalışmalarında 100'er µL pipetleme yapılmıştır.

Plaklara mikroorganizma suşları pipetlendikten sonra üstleri kapatılarak 35 ± 2 °C etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (*Candida*'lar için 48 sinkübasyon gerçekleştirilmiştir). İnkübasyon sonunda üreme olan kuyucuklar gözle değerlendirilmiştir. Daha sonra reaktif olarak hazırlanan % 0.01'lik resazurin sodyum solüsyonu her kuyucuğa 20 µL olacak şekilde tüm kuyucuklara (besiyeri kontrol ve üreme kontrol kuyucuğu da dahil) pipetlenmiş ve plaklar 2 sdaha 35 ±2 °C'de inkübe edilmiştir.



Şekil 12. Dama tahtası yönteminin uygulanma şekli

Antimikrobiyal kombinasyonun sinerjik/aditif veya antagonistik etkisinin değerlendirilmesi fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) ve fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu indeksine (∑FİK) göre yapılmıştır (Van Vuuren ve ark., 2009; Stefanovic ve ark., 2011). FİK değeri üreme görülmeyen kuyudaki en düşük standart antimikrobiyal madde ya da uçucu yağ konsantrasyonunun o maddelerin tek başına aynı suşa karşı saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilmiştir. FİK indeksi (∑FİK) ise her iki antimikrobiyal maddeye ait (standart antibakteriyel/antifungal madde ve uçucu yağ) FİK değerlerinin toplanması sonucunda elde edilmiştir.

FİK indeksi (∑ FİK) için şu formül kullanılmıştır:

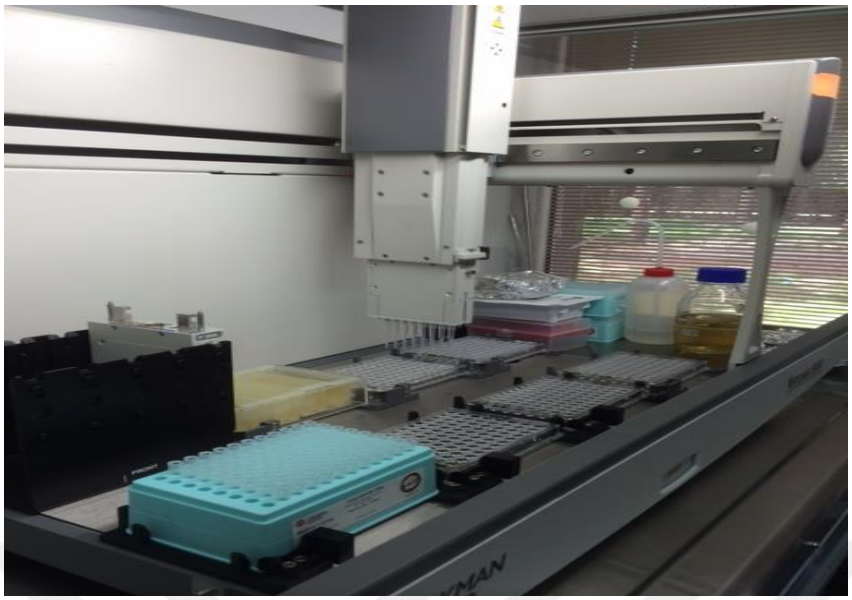
FİK X= X'in kombinasyondaki MİK değeri / X'in tek başına MİK değeri

FİK Y = Y'nin kombinasyondaki MİK değeri / Y'nin tek başına MİK değeri

$$\sum FİK = FİK\ X + FİK\ Y \qquad \textbf{(Formül 3)}$$

Sonuçlar: ΣFİK ≤ 0.5= Sinerjik etki,
ΣFİK > 0.5 ve ≤ 1= Aditif etki,
ΣFİK= > 1- < 4= Bağımsız etki,
Σ FİK ≥4= Antagonist etki,

şeklinde kabul edilmiştir.



Şekil 13. Antimikrobiyal aktivite testleri-otomatik pipetleme sistemi

In vitro Sitotoksite Çalışmaları

Antimikrobiyal aktiviteye sahip kombinasyonların etkinliklerindeki selektivite insan cilt fibroblast hücrelerinde WS1 - XTT yöntemi (Hillegass ve ark. 2010; Altıntop ve ark. 2012) ve biyolüminesan *Aliivibrio fischeri* (Perdigon-Melon ve ark., 2010) testleri ile sitotoksik etki belirlenmiştir.

WS1-XTT sitotoksisite test yöntemi
WS1 hücrelerinin çoğaltılması

Deneylerde kullanılan WS1 normal insan cilt fibroblast hücrelerinin (ATCC® CRL-1502™) çoğaltılması ve deneye hazırlanması için 2-3 günde bir rutin olarak pasajlama işlemi yapılmıştır. WS1 hücreleri için besiyeri olarak EMEM (Eagle Minimum Essential Medium); % 10 fetal bovine serum ve % 1 penisilin-streptomisin içerir) kullanılmıştır.

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlanmak için hafifçe çalkalanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ilave edilerek yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür şişesine tripsin etilendiamintetra asetik asit (EDTA) çözeltisi (1x) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde bekletilmiştir (% 5 CO_2, % 95 nem ve 37 °C). İnkübatörden alınan kültür şişelerine besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilmiş ve yeni kültür şişelerine alınmıştır. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır.

WS1 hücrelerinin plakalara ekilmesi

İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ilave edilerek yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1x) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde bekletilmiştir. İnkübatörden alınan kültür şişesinin içine besiyeri ilave edilmesiyle elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır.

Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve çöken hücreler 1 mL besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonun 10 µL'si alınarak otomatik hücre sayma cihazında sayılmıştır. Hücre süspansiyonu 1 x 10^4 hücre / kuyucuk olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plaka ters çevrilerek hücre kültürlerinin üst kısmı atılmış ve test maddeleri plakalara uygulanmıştır.

WS1 hücrelerine XTT sitotoksisite testinin uygulanması

Standart antimikrobiyal, uçucu yağ ve uçucu yağ fraksiyonlarının sitotoksisite testi için stok solüsyonları DMSO içinde hazırlanmıştır. Stok solüsyonlardan besiyeri ile 5-640 µg/mL aralığında 8 seri dilüsyon olarak hazırlanan standart antimikrobiyal madde, uçucu yağ ve uçucu yağ fraksiyonları 8 tekrarlı olacak şekilde plakalara uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saatlik inkübasyon süresinden sonra hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atılmıştır. Hücreler 200 µL/kuyucuk olacak şekilde fosfat tamponu ile yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasına 200 µL/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Sitotoksisite testi olarak hücrelerde mitokondriyal aktiviteyi ölçen Cytotox-XTT 1 Parameter Cytotoxicity Kit'i (Xenometrix AG, Gewerbertrasse 25, Switzerland) (2,3-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-karboksianilit tuzu-(XTT) kullanılmıştır. Kit uygulama talimatında belirtildiği gibi XTT1 ve XTT2 çözeltileri 1:100 oranında karıştırılmıştır. Hücre kültür plakasına 50 µL/kuyucuk olacak şekilde bu karışımından ilave edilmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakaların optik dansisite (OD) değerleri 480 ve 690 nm'de okunmuştur. Test maddelerinin her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve non-lineer regresyon analizi ile maddelerin inhibitör konsantrasyon 50 (IK_{50}) değerleri hesaplanmış ve maddelerin MİK değerlerine göre sitotoksik etkileri yorumlanmıştır.

Aliivibrio fischeri Biyolüminesans Toksisite Test Yöntemi

Deneysel çalışmalarımızda en etkili sinerjik / aditif etki alınan uçucu yağ ve antimikrobiyal madde kombinasyonları ile bazı uçucu ana bileşikleri *in vitro A. fischeri* toksisite testi ile değerlendirilmiştir.

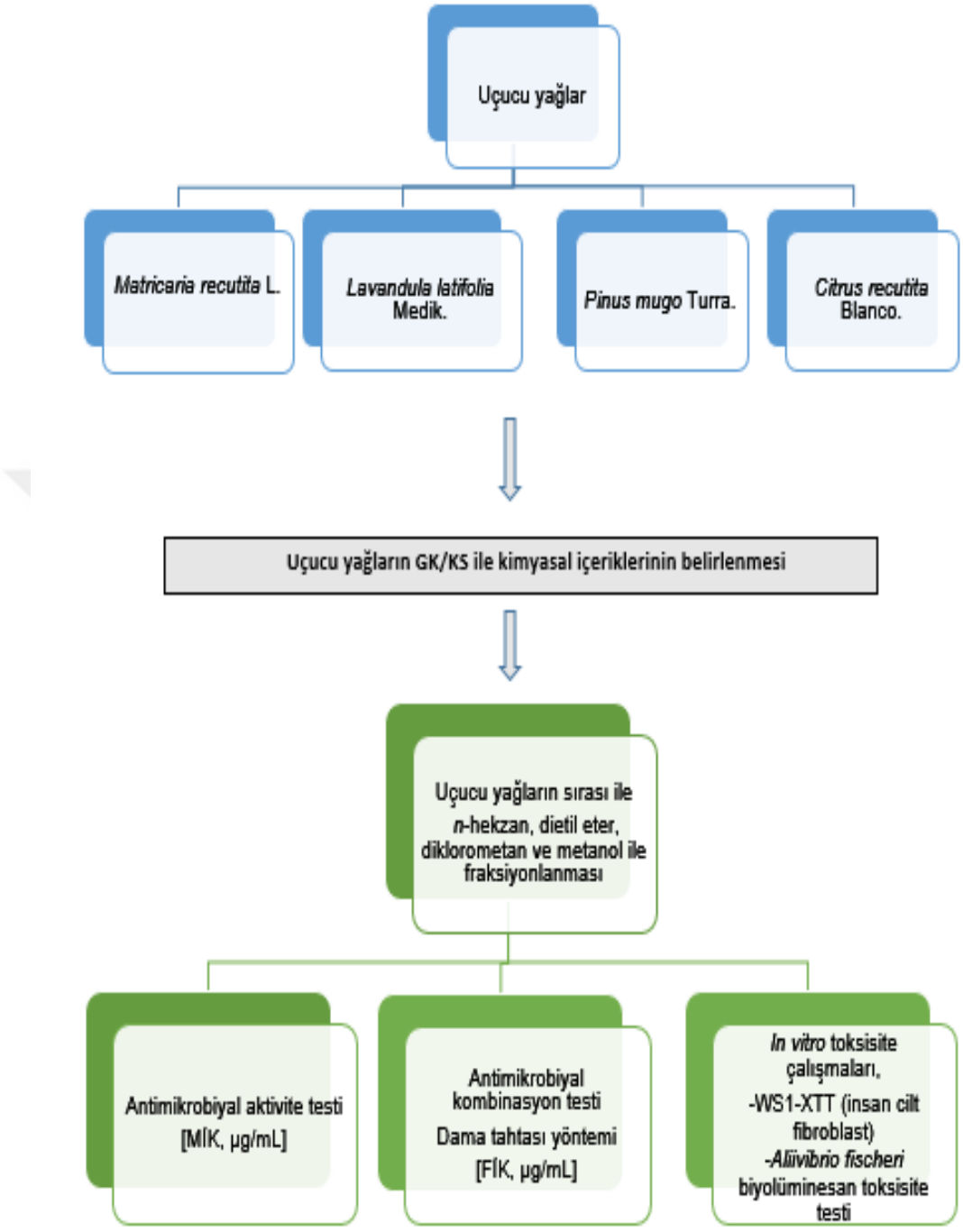
Liyofilize *A. fischeri* NRRL-B 11177 suşuna ait test kiti (Biofix Lumi test, Macherey Nagel, Almanya) kullanılmıştır. Test öncesinde bakteri suşu ve aktivasyon solüsyonu -20 °C'den çıkarılmış ve çözünmesi için 10-15 dk beklenilmiştir. Numune seyreltmeleri % 2'lik sodyum klorür (NaCl) ile yapılmıştır. Test için 96 kuyucuklu beyaz renkli mikroplakalar kullanılmıştır. Lüminesans ölçümü için Biotek Synergy H1, luminometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir **(bkz. Şekil 14)**. Ölçümler 20 °C'de yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL test numunesi konulmuş ve üzerlerine 100 µL bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir. Toksisite değerleri için ışık geçirgenliğinin zamanla azalmasına bağlı olarak 5.dk, 15.dk ve 30.dk'da ölçümler alınmıştır ve sonuçlar % inhibisyon olarak kayıt edilmiştir. Standart pozitif kontrol olarak $K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L) kullanılmıştır (Perdigon-Melon ve ark., 2010).

Kombinasyonların inhibisyon etkisi 30 dakikalık maruz kalma süresinde toksik madde içermeyen üreme kontrol numunesiyle kıyaslanarak yüzde inhibisyon eşitliğine göre hesaplanmıştır.

% İnhibisyon = $(A_K\text{-}A_N / A_K) \times 100$ **(Formül 4)**
A_K: Kontrol ışık absorbans değeri
A_N: Numune ışık absorbans değer



Şekil 14. Toksisite ölçümleri - lüminometre cihazı



Şekil 15. Çalışma şeması

BULGULAR ve TARTIŞMA

MATRICARIA RECUTITA UÇUCU YAĞI

Bu bölümde *Matricaria recutita* uçucu yağı ve uçucu yağ fraksiyonlarının kimyasal bileşikleri fraksiyonlara ait % verimler, antimikrobiyal aktivite ile antimikrobiyal kombinasyon sonuçları ve aktif kombinasyon çalışmalarının WS1-XTT sitoksisite ve *Aliivibrio fischeri* NRRL-B 11177 suşuna ait toksisite test sonuçları verilmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri

Farmasötik kalitede temin edilen *Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonları için GK/AİD ve GK/KS ile analiz sonucunda 37 uçucu madde tanımlanmıştır (**Çizelge 16**).

Çizelge 16. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri**

No	RRI	Bileşikler	Relatif %			
			P	P-H	P-DE	P-DM
1	1246	*(Z)-β*-Osimen	-	0.1	-	-
2	1255	*γ*-Terpinen	0.1	0.3	-	-
3	1266	*(E)-β*-Osimen	0.3	0.9	-	-
4	1280	*p*-Simen	-	0.4	-	-
5	1358	Artemisia keton	0.3	-	-	-
6	1497	*α*-Kopaen	-	0.2	-	-
7	1479	*β*-Elemen	0.1	0.4	-	-
8	1510	Artemisia alkol	0.1	-	-	-
9	1550	*α*-İzokomen	-	0.2	-	-
10	1612	*β*-Karyofillen	0.1	0.3	-	-
11	1661	Alloaromadendren	0.1	0.3	-	-
12	1695	*(E)-β*-Farnesen	21.5	72.0	13.2	-
13	1704	*γ*-Murolen	0.2	0.7	-	-
14	1708	Leden	0.2	0.5	-	-
15	1726	Germakren D	1.9	7.0	-	-
16	1740	α-Murolen	0.4	2.2	-	-
17	1755	Bisiklogermakren	1.2	1.8	0.7	-
18	1758	*(E-E)-α*-Farnesen	0.9	1.4	0.6	
19	1773	*δ*-Kadinen	0.3	0.9	-	-
20	1776	*ɣ*-Kadinen	0.2	0.3	-	-
21	1786	*ar*- Kurkumen	-	0.2	-	-
22	2000	Eikosan	-	0.1	-	-
23	2156	*α*-Bisabolol oksit B	6.2	-	6.8	2.5
24	2200	*α*-Bisabolon oksit A	5.7	-	6.7	-
25	2226	Metil hekzadekanoat	-	-	3.3	-
26	2232	*α* -Bisabolol	2.1	-	0.1	-
27	2144	Spatulenol	-	e	0.7	-
28	2200	Dokosan	-	0.1	-	-
29	2298	Dekanoik asit	0.5	-	-	-
30	2300	Trikosan	e	1.6	-	-
31	2400	Tetrakosan	-	0.3	-	-
32	2400	Pentakosan	1.0	3.9	-	-
33	2430	Kamazulen	4.1	-	3.4	-

Çizelge 16 (Devamı) *Matricaria recutita* uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri

34	2438	α-Bisabolol oksit A	47.7	-	57.7	50.5
35	2456	Metil oleat	-	-	5.5	47.0
36	2700	Heptakosan	-	0.1	-	-
37	2900	Nonakosan	-	0.4	-	-
		Toplam	**95.2**	**96.6**	**98.7**	**100**

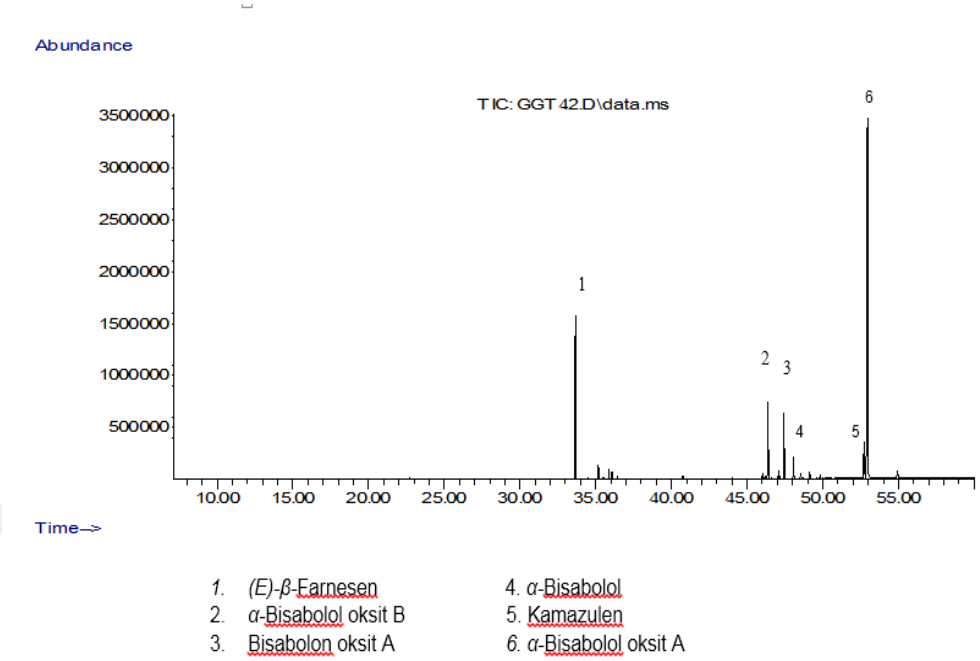
e: Eser, %<0.1; (-): analizde tespit edilmemiştir; P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P -DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları

Uçucu yağ analiz sonucunda *M. recutita* uçucu yağının ana bileşenleri α-bisabolol oksit A (% 47.7), *(E)-β*-farnesen (% 21.5) α-bisabolol oksit B (% 6.2), bisabolon oksit (% 5.7), kamazulen (% 4.1) ve α-bisabolol (% 2.1) olarak tanımlanmıştır.

Avrupa Farmakopesi'ne göre kimyasal içerik açısından 2 tip papatya uçucu yağı tanımlanmıştır; bisabolol oksitçe zengin ve (-)-*α*-bisabolol açısından zengin olan. Bisabolol oksitler açısından zengin olan *M. recutita* uçucu yağında; bisabolol oksitler (% 29-81) ve kamazulen (≥ % 1.0) tanımlanmış oranlarda olmalıdır. Spesifikasyonları sağlamak üzere (-)-*α*-Bisabolol maddesince zengin papatya uçucu yağları ise (-)-*α*-bisabolol (% 10-65), kamazulen (≥ % 1) ve bisabolol oksitlerin ve (-)-*α*-bisabolol maddelerinin toplamı oransal olarak en az % 20 olmalıdır.

Tez kapsamında çalıştığımız papatya uçucu yağı % 59.6 oranında bisabolol oksitler; bisabolol oksit A, bisabolol oksit B ve bisabolon oksit açısından zengin kimyasal içeriğe sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda yağın bileşiminde kamazulen oranı da % 4.1 olarak bulunmuştur. Bu nedenle *M. recutita* uçucu yağı Farmakope'nin önerdiği limitler içerisinde yer almaktadır. Analitik sonuçlarımız literatür bulgularıyla örtüşmektedir. *M. recutita* uçucu yağı; alkanlar (trikosan, pentakosan); monoterpenler *(E)-β*-osimen, (*Z*)-*β*-osimen, *γ*-terpinen, *p*-simen); seskiterpenler (α-bisabolol, bisabolol oksit A ve B, farnesen, germakren D, bisiklogermakren, *δ*-Kadinen, *γ*-Kadinen), seskiterpen lakton (kamazulen) ve yağ asitleri (metil hekzadekanoat ve metil oleat) gibi madde karışımlarından oluşmaktadır (Pino ve ark., 2002; Franke ve Schilcher, 2005; Pirzad ve ark., 2006; Sashidhara ve ark., 2006; Orav ve ark., 2010).

Bir sonraki aşamada, aktif fraksiyonları belirlemek amacıyla apolar, orta polarite ve polar olmak üzere vakum kolon kromatografisi kullanılarak uçucu yağ sırası ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonların kimyasal bileşeni GK/AİD ve GK/KS ile tespit edilmiştir **(Çizelge 16)**. *M. recutita* uçucu yağının *n*-hekzan fraksiyonu için *(E)-β*-farnesen (% 72.0) ve germakren D (% 7.0); dietil eter fraksiyonu *(E)-β*-farnesen (% 13.2), *α*-bisabolol oksit B (% 6.8), α-bisabolol oksit A (% 57.7), *α*-bisabolon oksit A (% 6.7) ve kamazulen (% 3.4); diklorometan fraksiyonu *α*-bisabolol oksit A (% 50.5), metil oleat (% 47.0) ve α-bisabolol oksit B (% 2.5) ana bileşikler olarak tanımlanmıştır. Metanol fraksiyonunda herhangi bir uçucu bileşik tanımlanmamıştır.



1. *(E)-β*-Farnesen
2. α-Bisabolol oksit B
3. Bisabolon oksit A
4. α-Bisabolol
5. Kamazulen
6. α-Bisabolol oksit A

Şekil 16. *Matricaria recutita* uçucu yağına ait ana maddelerin kromatogramı

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%)

Çizelge 17'de kimyasal içeriği tanımlanan *M. recutita* uçucu yağı bir sonraki aşamada vakum kolon kromatografisi kullanılarak sırası ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanmıştır. Uçucu yağ fraksiyonlandıktan sonra fraksiyonlar rotavapor'da yoğunlaştırılıp % verimleri hesaplanmıştır.

Çizelge 17. *Matricaria recutita* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri

Fraksiyon	Miktar (g)	Verim(%)
P-H	0.95	23.8
P-DE	2.3	56.0
P-DM	0.41	10.2
P-M	0.105	2.6
Toplam	**3.776**	**93.0**

P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan ; P-M: metanol fraksiyonları



Şekil 17. *Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonları

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Uçucu yağların MİK değerlerinin tespit edilmesinde konsantrasyon aralığı 5120-10 µg/mL'dır. Antibiyotikler AMP, SEF ve TCY için 128-0.125 µg/mL, antifungal maddeler için FLU 64 - 0.125 µg/mL ve NS için 16 - 0.03 µg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. MİK belirleme sonucunda CSLI'nin belirlediği sınır değerleri baz alındığında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilen klinik izolatlardan *S. aureus* ve *E. coli'*nin AMP, SEF ve TCY antibiyotiklerine karşı dirençli suş olarak bulunmuştur. Klinik izolat *Candida albicans* ise FLU'e karşı duyarlı olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız standart suşlardan *S. aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 8739 suşları için çıkan MİK değerlerine göre AMP ve SEF için dirençli, TCY için ise duyarlı suş olarak bulunmuştur. *C. albicans* ATCC 90028 suşu da FLU için duyarlı olarak tespit edilmiştir. *M. recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının *C. albicans* suşlarına karşı daha düşük MİK (320 - 160 µg/mL) aralıklarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda MİK belirleme testleri 3'er kez farklı zamanlarda çalışılmış ve klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri **Çizelge 18**'de, standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri **Çizelge 19**'da verilmiştir.

Çizelge 18. *Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı MİK değerleri (µg/mL)

Test numunesi	*S. aureus**	*E. coli**	*C. albicans***
P	1280-640	1280-640	320-160
P-H	1280-640	1280-640	320-160
P-DE	1280-640	1280-640	320-160
P-DM	1280-640	1280-640	320-160
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**> 128-64**	**> 128-32**	**-**
SEF	**128-64**	**64-32**	**-**
TCY	**64-32**	**128-64**	**-**
FLU	**-**	**-**	**4-1**
NS	**-**	**-**	**4-1**

(-) : Test edilmedi, P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin *: Ampisiline dirençli, **: Flukonazole duyarlı

Çizelge 19. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı MİK değerleri (µg/mL)**

Test numunesi	*S. aureus* ATCC 6538	*E. coli* ATCC 8739	*C. albicans* ATCC 90028
P	640-320	640-320	320-160
P-H	640-320	640-320	320-160
P-DE	640-320	640-320	320-160
P-DM	640-320	640-320	320-160
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**16-4**	**16-4**	**-**
SEF	**16-4**	**128-64**	**-**
TCY	**4-1**	**4-1**	**-**
FLU	**-**	**-**	**4-1**
NS	**-**	**-**	**4-1**

(-) : Test edilmedi, P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, AMP: Ampislin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Dama tahtası yönteminin sonuçları

Matricaria recutita uçucu yağı (P) ve her bir fraksiyonu *n*-hekzan (P-H), dietil eter (P-DE) ve dikolorometan (P-DM)'nın standart antibakteriyel AMP, SEF, TCY ve antifungal ilaç etken maddeleri FLU ve NS ile hem dirençli klinik *S. aureus, E. coli* ve *C. albicans* izolatları hem de standart *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 ve *C. albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır.

Literatür bulgusunda *M. recutita* uçucu yağının sadece Amfoterisin B ile kombinasyon çalışmasına rastlanılmıştır. Kombinasyon özellikle *Candida albicans* suşlarına karşı değerlendirilmiştir (Nozaki ve ark., 2010) (**Çizelge 5**). *M. recutita* uçucu yağı ve seçtiğimiz antimikrobiyal maddeler ile herhangi bir kombinasyon çalışmasına rastlanılmadığından sonuçların ilk olması açısından önem taşımaktadır.

M. recutita uçucu yağına ait kombinasyon sonuçları FİKİ değerleri olarak verilmiştir. Sonuçlar sinerjik, aditif ve bağımsız etki olarak ifade edilmiştir.

M. recutita uçucu yağı ve fraksiyonlarının kombinasyon sonuçları her bir mikroorganizma türüne göre uçucu yağ ve fraksiyonları arasındaki kombinasyon sonuçlarına göre **Çizelge 20**, **Çizelge 21** ve **Çizelge 22**'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. *M. recutita* uçucu yağı diklorometan fraksiyonunun verim miktarı düşük olduğu için standart antibakteriyel ve standart antifungal maddeler ile sadece klinik izolatlara karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 20. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Staphylococcus aureus*****'a karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

		Uçucu Yağ			Standart Madde				
Kombinasyon	**Bakteri**	***T**	****K**	**FİK**	**T**	**K**	**FİK**	**FİKİ**	**SONUÇ**
P+AMP	*****S.aureus* kl.izol.	1280	1280	1.0	256	8.0	0.031	1.031	BE
P+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	0.25	16	2.0	0.125	0.37	**Sinerjik**
P-H+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	40	0.06	>128	64	0.25	0.31	**Sinerjik**
P-H+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	640	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
P-DE+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	10	0.015	128	2.0	0.015	0.031	**Sinerjik**
P-DE+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	320	320	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
P-DM+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	320	0.5	128	16	0.125	0.62	**Aditif**
P+SEF	*S.aureus* kl.izol.	1280	1280	1.0	128	2.0	0.015	1.015	BE
P+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	16	4.0	0.25	0.75	**Aditif**
P-H+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	1.0	0.03	1.031	BE
P-H+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	16	16	1.0	1.015	BE
P-DE+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	1.0	0.031	1.031	BE
P-DE+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	320	40	0.125	2.0	1.0	0.5	0.62	**Aditif**
P-DM+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	1.0	0.031	1.031	BE
P+TCY	*S.aureus* kl.izol.	1280	1280	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE
P+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	4.0	1.0	0.25	0.26	**Sinerjik**
P-H+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	160	0.25	32	0.125	0.0039	0.25	**Sinerjik**
P-H+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
P-DE+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	2.5	0.0039	32	0.25	0.0078	0.011	**Sinerjik**
P-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	320	5.0	0.015	1.0	0.25	0.25	0.26	**Sinerjik**
P-DM+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	2.5	0.0039	32	0.25	0.0078	0.011	**Sinerjik**

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri, ***: ampisiline dirençli klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Çizelge 21. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Escherichia coli*****'ye karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
P+AMP	****E. coli* kl.izol.	320	20	0.06	256	256	1.0	1.06	BE
P+AMP	*E. coli* ATCC 8739	320	40	0.125	16	16	1.0	1.125	BE
P-H+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	256	4.0	0.015	1.015	BE
P-H+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
P-DE+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	256	4.0	0.015	1.015	BE
P-DE+AMP	*E. coli* ATCC 8739	320	5.0	0.015	2.0	2.0	1.0	1.015	BE
P-DM+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	256	4.0	0.015	1.015	BE
P+SEF	*E. coli* kl.izol.	320	20	0.06	64	128	2.0	2.062	BE
P+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	0.25	128	64	0.5	0.75	**Aditif**
P-H+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE
P-H+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	64	1.0	0.015	1.015	BE
P-DE+SEF	*E. coli* kl.izol.	320	40	0.125	32	32	1.0	1.125	BE
P-DE+SEF	*E. coli* ATCC 8739	320	5.0	0.015	64	64	1.0	1.015	BE
P-DM+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE
P+TCY	*E. coli* kl.izol.	320	20	0.06	128	64	2.0	2.06	BE
P+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	80	0.125	4.0	1.0	0.25	0.37	**Sinerjik**
P-H+TYC	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE
P-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
P-DE+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE
P-DE+TCY	*E. coli* ATCC 8739	320	5.0	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
P-DM+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	2.0	0.031	1.031	BE

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri***: ampisiline dirençli klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Çizelge 22. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağının** ***Candida albicans*** **suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

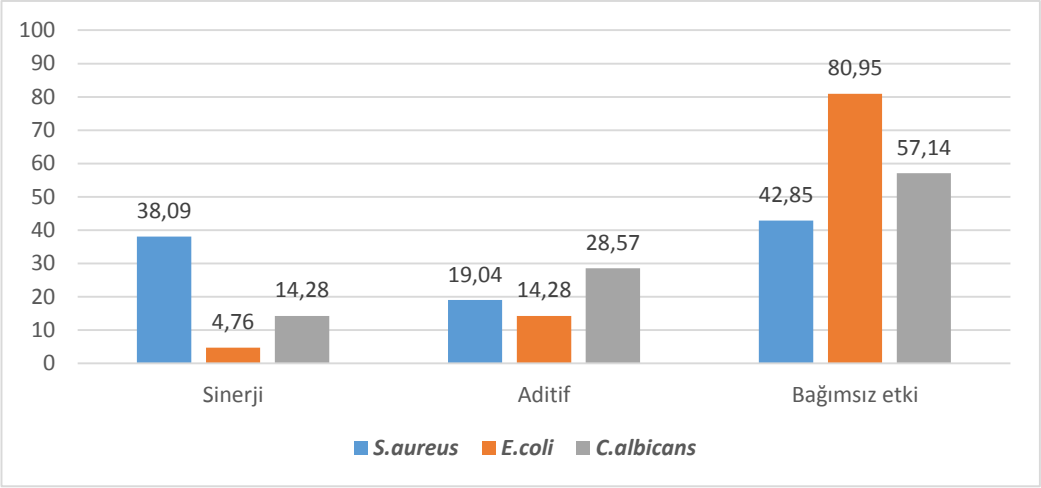
Kombinasyon	Maya	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
P+FLU	***C. albicans* kl.izolat	320	20	0.06	1.0	0.25	0.25	0.31	**Sinerjik**
P+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	40	0.125	1.0	0.25	0.25	0.37	**Sinerjik**
P-H+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	20	0.06	1.0	0.5	0.5	0.56	**Aditif**
P-H+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	0.5	0.015	0.03	1.031	BE
P-DE+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	80	0.25	1.0	0.5	0.5	0.75	**Aditif**
P-DE+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	0.5	0.015	0.03	1.03	BE
P-DM+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	20	0.06	1.0	0.5	0.5	0.56	**Aditif**
P +NS	*C. albicans* kl.izolat	320	20	0.06	1.0	0.5	0.5	0.56	**Aditif**
P+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	5.0	0.015	2.0	2.0	1.0	1.015	BE
P-H+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	1.0	0.03	0.03	1.031	BE
P-H+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	0.5	0.015	0.03	1.031	BE
P-DE+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	1.0	0.03	0.03	1.031	BE
P-DE+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	1.0	0.03	0.03	1.031	BE
P-DM+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	1.0	0.03	0.03	1.031	BE

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri, ***: Flukonazole duyarlı klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Toplam 56 adet kombinasyon çalışmasında 11 adet sinerjik, 11 adet aditif ve 34 adet bağımsız etkili sonuç bulunmuştur. Kombinasyon çalışmalarında antagonist etkiye rastlanılmamıştır.

Çizelge 23. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağına ait kombinasyonların % dağılımı**

Mikroorganizmalar	Sinerjik	Aditif	Bağımsız etki
Staphyloccoccus aureus **(21 kombinasyon)**	8	4	9
% Oran	(% 38.09)	(% 19.04)	(% 42.85)
Escherichia coli **(21 kombinasyon)**	1	3	17
% Oran	(% 4.76)	(% 14.28)	(% 80.95)
Candida albicans **(14 kombinasyon)**	2	4	8
% Oran	(% 14.28)	(28.57)	(57.14)
Genel Toplam	11	11	34



Şekil 18. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları**

Matricaria recutita uçucu yağı ve fraksiyonlarının özellikle ampisilin ve tetrasiklin standart ilaç etken maddeleri ile yapılan kombinasyon çalışmalarında *Staphylococcus aureus* standart / klinik suşlarına karşı aktif sonuçlar verdiği görülmüştür. *M. recutita* uçucu yağı *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı sinerjik etki göstermiştir (FİKİ= 0.37 µg/mL). Özellikle klinik dirençli *S.aureus* suşuna karşı *M. recutita* uçucu yağı dietil eter fraksiyonunun en etkili fraksiyon olduğu görülmüştür (FİKİ= 0.03 µg/mL, sinerjik etki). Aynı suşa karşı *n*-hekzan fraksiyonu sinerjik etki göstermiştir (FİKİ= 0.31 µg/mL). Aynı klinik suşa karşı diklorometan fraksiyonunun ise aditif etkili olduğu belirlenmiştir (FİKİ= 0.62 µg/mL).

Klinik dirençli *S. aureus* suşa karşı sinerjik etkili bulunan *M. recutita* uçucu yağı *n*-hekzan fraksiyonunun kimyasal bileşikleri *(E)*-*β*-farnesen (% 72.0) ve germakren D (% 7.0), dietil eter fraksiyonunun; *(E)*-*β*-farnesen (% 13.2), *α*-bisabolol oksit A (% 57.7), *α*-bisabolol oksit B (% 6.8), *α*-bisabolon oksit A (% 6.7), kamazulen (% 3.4), ve α-bisabolol (% 0.1) olarak belirlenmiştir. *M. recutita* uçucu yağının diklorometan fraksiyonunda; *α*-bisabolol oksit A (% 50.5), α-bisabolol oksit B (% 2.5) ve metil oleat (% 47.0) ana bileşikler olarak tanımlanmıştır ve bu fraksiyon ise ampisilin ile kombinasyon çalışmasında aditif etki göstermiştir.

Literatür bulgularında *M. recutita* uçucu yağı ile ilgili yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları **Çizelge 1**'de liste halinde verilmiştir. Antiviral aktivite ile ilgili yapılan bir çalışmada *M. recutita* uçucu yağının insan herpes simpleks virus tip 1 ve tip 2 (HSV-1 /HSV-2) virüslerine karşı antiviral etkili bulunmuştur (IK_{50}= 0.00003/0.00015%) (Reichling ve ark., 2009). *M. recutita* uçucu yağında bulunan bisabolol ve spiroeter bileşiklerinin antibakteriyel ve fungusidal etkiden sorumlu maddeler oldukları bilinmektedir (Van Zyl ve ark., 2006; Kamatou ve ark., 2010; Singh ve ark., 2011).

Ampisilin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında bu madde gruplarınının bulunduğu uçucu yağ ve dietil eter fraksiyonlarının en etkili sonuçlar verdiği görülmektedir.

M. recutita uçucu yağı ve dietil eter fraksiyonlarının sefuroksim ile yapılan kombinasyon çalışmalarında *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı aditif etki (FİKİ= 0.75 ve 0.62 µg/mL) bulunurken *M. recutita* uçucu yağına ait *n*-hekzan ve diklorometan fraksiyonları ise bağımsız etkili olarak bulunmuştur.

Bu durum uçucu yağ ve dietil eter fraksiyonlarının içerdiği kimyasal bileşiklerin hepsinin bir arada bulunduğu durumlarda iken en etkili sonuçlar verdiğini göstermektedir. Antimikrobiyal etkinin fraksiyonlarda gözlenen sadece ana bileşenlerden kaynaklanmadığını birarada iken daha güçlü etki verdiklerinin göstergesi olarak yorumlanabilir.

M. recutita uçucu yağı, *n*-hekzan, dietil eter ve dikolorometan fraksiyonlarının tetrasiklin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında (FİKİ= 0.26, 0.25, 0.011 ve 0.011) hem standart hem de klinik *S. aureus* suşlarına karşı en etkili kombinasyon sonuçlarını verdiği görülmüştür. Bu nedenle kombinasyon çalışmalarında kullanılan antibakteriyel maddeler arasından tetrasiklin ile yapılan kombinasyonlar en etkili olarak bulunmuştur.

M. recutita uçucu yağı ve fraksiyonlarının ampisilin ile yapılan tüm kombinasyon çalışmalarında *E. coli* ATCC 8739 ve klinik dirençli *E. coli* suşlarına karşı bağımsız etkili bulunmuştur. *M. recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarının sefuroksim ile yapılan kombinasyon çalışmalarında sadece uçucu yağın kendisi *E. coli* ATCC 8739'a karşı aditif etki (FİKİ= 0.75 µg/mL) göstermiştir. Uçucu yağın, *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonunun tetrasiklin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında sadece *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı sinerjik ve aditif etki gözlenirken klinik dirençli suşa karşı ise tüm kombinasyon denemelerinde bağımsız etki elde edilmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının flukonazol ile kombinasyonlarında hem standart hem de klinik *C. albicans* suşlarına karşı oldukça etkili sonuçlar vermiştir. *M. recutita* uçucu yağı ile flukonazol kombinasyonunun sonucunda sinerjik etki (FİKİ= 0.3125 ve 0.375 µg/mL) görülürken fraksiyonlarının aynı antifungal madde flukonazol ile kombinasyonu sonucunda aditif etki gözlenmiştir. Özellikle *Candida* türlerine karşı denenecek kombinasyon çalışmalarında uçucu yağın fraksiyonlarına ayrılmadan kullanılmasının daha etkili sonuçlar vermesi açısından önemli olacağı düşünülmektedir. *M. recutita* uçucu yağ ve fraksiyonlarının nistatin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında sadece *M. recutita* uçucu yağının kendisinin aditif etki (FİKİ= 0.56 µg/mL) gösterdiği, fraksiyonların ise nistatin ile kombinasyonunda bağımsız etkili sonuç verdiği görülmüştür. Sonuç olarak flukonazol ile yapılan kombinasyon denemeleri nistatin ile yapılan kombinasyon denemelerinden daha aktif bulunduğundan *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde flukonazol tercih edilebilir. Özellikle *Candida* enfeksiyonlarına karşı *M. recutita* uçucu yağının fraksiyonlanması yerine kendisinin kullanılmasının daha etkili olacağını göstermektedir.

M. recutita uçucu yağı ve fraksiyonlarının özellikle Gr (+) *S. aureus* türüne karşı Gr (-) *E. coli* türünden daha etkili olmasının nedeni hücre duvarı yapısındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Uçucu yağlar ve uçucu yağ bileşenleri genellikle içerdikleri kimyasal yapılarına göre Gr (+) bakterilere karşı daha etkilidirler. Gr (+) bakterilerin hücre duvarları daha kalın olup % 90-95 oranında peptidoglikan tabakadan oluşur. Bu yapı özellikle hidrofobik moleküllerin hücre duvarından geçişine kolaylaştırarak sitoplazmaya ulaşmasına izin verir. Gr (-) bakterilerin ise hücre duvarı yapıları daha komplekstir ve peptidoglikan tabakası incedir. Peptidoglikan tabakasını bir dış zar daha çevreler. Gr (-) bakterilerin hücre duvarları dış yapısında lipopolisakkarit ve iç tabakasındaki ise fosfolipid özellik taşır. Lipopolisakkarit hidrofob moleküllere karşı bir bariyer oluşturur.

Bu özellik Gr (-) hücreye daha fazla koruyucu ve geçirgenliği azaltıcı etki yaratmasına neden olur ve birçok molekülün hücreye girmesine engel olur (Bakkali ve ark., 2008; Nazzaro ve ark., 2013). Bu durum *E. coli* suşlarına karşı elde edilen kombinasyon sonuçlarının bağımsız etkili olarak bulunmasının bir nedeni olabilir.

Özellikle fraksiyonların sefuroksim ve tetrasiklin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında sadece standart *E. coli* ATCC 8739 üzerine etki göstermesi ise kullanılan klinik dirençli izolatın hücresel yapısında antimikrobiyal direnç mekanizmasının göstergesi olarak yorumlanabilir.

Diğer bir durum ise klinik izolat *E. coli* suşuna karşı kullanılan antibiyotikler (ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin) CSLI'nın belirlediği MİK aralıklarında dirençli olarak belirlenmişti. Bu nedenle antibiyotik ile uygulanan uçucu yağ ve fraksiyonlarının tümü oluşan kombinasyonda etki göstermemiş ve mikroorganizma yaşamaya devam etmiştir. Burada farklı antibiyotikler kullanılarak alternatif denemeler direnç oluşumuna karşı değerlendirilebilir.

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları

Tez kapsamında dama tahtası yöntemi uygulanarak belirlenen aditif ve sinerjik kombinasyonların sitotoksik etkileri sağlıklı insan fibroblast hücre dizilerinde XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. **Çizelge 24**'te her bir kombinasyon için kullanılan konsantrasyonlar verilmiştir. Uçucu yağ/uçucu yağ fraksiyonu ve standart ilaç etken madde kombinasyonlarının her bir konsantrasyonu için hesaplanan ortalama % inhibisyon değeri grafiğe aktarılmış ve hücrelerde % 50 inhibisyona neden olan ($İK_{50}$) değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 24. *Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar

Kombinasyon	←		**Etkili konsantrasyon (µg/mL)**	→	
P+ FLU	5+0.06	10+0.125	**20+ 0.25**	40+0.5	80+1
P + NS	5+0.125	10+0.25	**20 + 0.5**	40+1	80+2
P-H + AMP	10+16	20+32	**40 + 64**	80+128	160+256
P-H +FLU	5+0.125	10+0.25	**20+ 0.5**	40+1	80+2
P-H+ TCY	40+0.03	80+0.06	**160+ 0.125**	320+0.25	640+0.5
P-DE+ AMP	2.5+0.5	5+1	**10+ 2**	20+4	40+8
P-DE+TCY	0.625+0.06	1.25+0.125	**2.5 + 0.25**	5+0.5	10+1
P-DE+FLU	20+0.125	40+0.25	**80+ 0.5**	160+1	320+2

P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, AMP: Ampisilin, TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Standart ilaç etken maddelerine ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 25**'de verilmiştir. Buna göre bu maddelere ait $İK_{50}$ değerleri ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin'in farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu maddelerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin'in sitotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 25. Standart ilaç etken maddelerine ait $İK_{50}$ (µg/mL)

Madde	$İK_{50}$	Madde	$İK_{50}$
Sefuroksim	359.5	**Tetrasiklin**	383.64
Flukonazol	> 500	**Ampisilin**	> 500
Nistatin	83.95		

Uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerlerin **Çizelge 26**'da verilmiştir ve uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri bu maddelerin farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırılarak sitotoksisiteleri yorumlanmıştır. Buna göre *M. recutita* uçucu yağı ile *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonları farklı suşları öldürdükleri konsantrasyonlardan daha düşük değerlerde WS1 hücrelerini öldürmüşlerdir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdikleri dozlarda *M. recutita* uçucu yağ ile *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 26. *Matricaria recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

	$İK_{50}$		$İK_{50}$		$İK_{50}$
P	92.54	**P-H**	115.32	**P-DE**	129.52

P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter

Uçucu yağ/standart ilaç etken madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart ilaç etken madde kombinasyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 27**'de verilmiştir. Buna göre bu kombinasyonlara ait $İK_{50}$ farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu kombinasyonların aditif/sinerjik antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir.

Çizelge 27. *Matricaria recutita* uçucu yağ ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Kombinasyonlar	$İK_{50}$
P + FLU	80+1 <
P + NS	80+2 <
P-H + AMP	128+204.8
P-H +FLU	80+2 <
P-H+ TCY	320+0.25
P-DE+ AMP	160+32 <
P-DE+TCY	10+1 <
P-DE+FLU	320+2 <

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, AMP: Ampisilin, TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Kombinasyonlar kullanıldıkları en yüksek konsantrasyonlarda bile WS1 hücrelerine karşı % 50 inhibisyon oranına ulaşmamıştır. Buna bağlı olarak kombinasyonların $İK_{50}$ değerlerinin uygulandıkları en yüksek konsantrasyondan daha büyük değerler olacağı sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla aditif/sinerjik antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda uçucu yağ/standart ilaç etken madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart ilaç etken madde kombinasyonlarının sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur.

Aliivibrio fischeri Toksisite Test Sonuçları

Toplam 22 adet sinerjik + aditif etki elde edilen *M. recutita* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait kombinasyon çalışmalarında en aktif konsantrasyonlar toksisite testinde değerlendirilmiştir. Uçucu yağının ana bileşiklerinden α-bisabolol ve farnesen maddeleri de toksisite açısından değerlendirilmiştir.

Toksisite test çalışmaları liyofilize *Aliivibrio fischeri* NRRL-B 11177 suşuna ait test kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toksisite inhibisyon ölçümleri 5.dk, 15.dk ve 30.dk'da alınmış ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 28. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları**

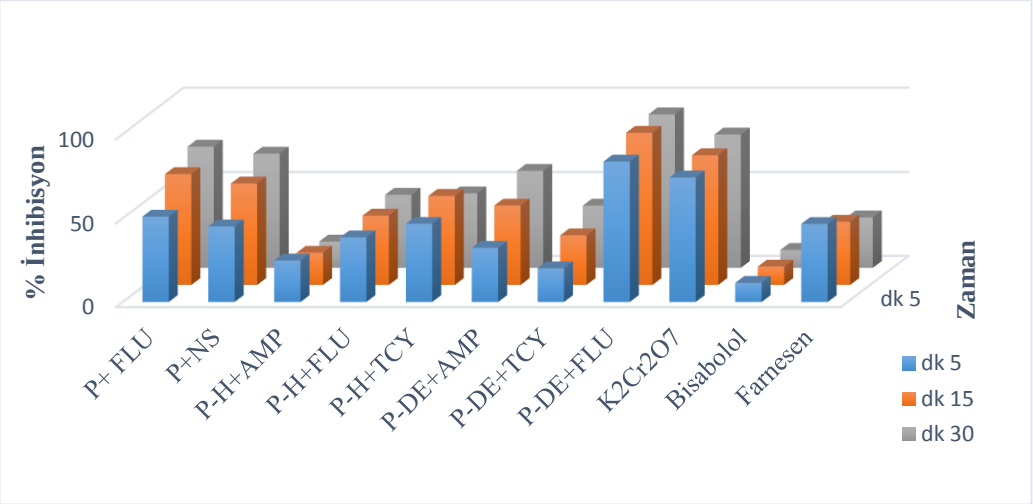
Aktif kombinasyon (µg/mL)	% İnhibisyon		
	5.dak.	**15.dak.**	**30.dak.**
P+ FLU (20 + 0.25)	51.03	66.15	72.18
P+NS (20+ 0.5)	45.16	60.55	68.05
P-H+AMP (40+64)	24.79	19.25	15.74
P-H+FLU (20+0.5)	38.6	41.44	43.66
P-H+TCY(160+0.125)	46.7	53.22	44.54
P-DE+AMP (10+2)	32.34	47.44	57.84
P-DE+TCY (2.5+0.25)	20.13	29.66	37.20
P-DE+FLU (80+0.5)	83.75	90.62	91.42
Farnesen (5 mg/mL)	46.63	37.80	30.15
α-bisabolol (5 mg /mL)	11.43	10.99	10.75
$K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L)	74.3	77.3	79.4

P: *M. recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, AMP: Ampisilin, TCY: Tetrasiklin FLU: Flukonazol, NS:Nistatin

Matricaria recutita uçucu yağı ve fraksiyonlarının *A. fischeri* suşuna karşı toksisite değerlendirilmesinde, papatya uçucu yağı *n*-hekzan fraksiyonunun ampisilin-flukonazol ve tetrasiklin ile kombinasyonlarında genel olarak düşük inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir.
Dietil eter fraksiyonunun ampisilin ve tetrasiklin ile kombinasyonunun suşa karşı düşük inhibisyona neden olduğu ancak flukonazol ile yüksek inhibisyona neden olmuştur.
M. recutita uçucu yağına ait ana bileşiklerden farnesen ve α-bisabolol'ün *A. fischeri* suşuna karşı toksisitesi düşük olarak bulunmuştur.

Literatür bulgularında *M. recutita* uçucu yağının *A. fischeri* suşuna karşı herhangi bir toksisite çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu sebeple elde edilen bulgular ilk olması açısından önem taşımaktadır.

Şekil 19'da gösterildiği üzere, zamana bağlı % inhibisyon grafiğinde kombinasyonlar ve *M. recutita* uçucu yağına ait bazı uçucu bileşenlerin karşılaştırmalı sonuçları verilmiştir.



Şekil 19. ***Matricaria recutita*** **uçucu yağ kombinasyonlarının** *A. fischeri* **% inhibisyon sonuçları**

Matricaria recutita uçucu yağı Amerika Birleşik Devlet'inde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından "genel olarak güvenilir zararsız" (GRAS) olarak değerlendirilmektedir. Literatür bulgularında, *M. recutita* uçucu yağının akut oral toksisitesi sıçanlarda, tavşanlarda da akut dermal toksisite değeri LD_{50}= >5g/kg bulunmuştur. Ayrıca sıçanlarda *M. recutita* uçucu yağı ve (-)-α-bisabolol oral akut toksisiteye sahip olmadığı belirtilmiştir (LD_{50}=10.000-20.000 ve 14.850 mg/kg) (Franke ve Schilcher, 2005).

Bir diğer literatür bulgusunda *M. recutita* uçucu yağı; PC-3 (insan prostat), A549 (insan akciğer karsinoma) ve MCF-7 (insan göğüs kanseri) kanser hücre hatlarına karşı IK_{50}= 0.070, 0.067 ve 0.072 değerlerinde inhibisyon göstermiştir (Zu ve ark., 2010).

M. recutita uçucu yağının ana bileşenlerinden α-bisabolol maddesinin aflatoksin B1 mutajenine karşı inhibitör etki gösterdiği Ames testi ile belirlenmiştir (Gomes-Carneiro ve ark., 2005).

M. recutita uçucu yağının % 0,125 konsantrasyonda *Oryzaephilus surinamensis* türüne karşı % 88,3 oranında ve *Tribolium castaneum* türlerine karşı ise % 63,3 oranında toksik etki göstermiştir (Al-Jabr, 2006).

LAVANDULA LATIFOLIA UÇUCU YAĞI

Bu bölümde *Lavandula latifolia* uçucu yağ ve fraksiyonlarının kimyasal bileşikleri, fraksiyonlara ait % verimler, antimikrobiyal aktivite ile antimikrobiyal kombinasyon sonuçları ve aktif çıkan kombinasyon çalışmalarının *Aliivibrio fischeri* toksisite inhibisyon sonuçları ve WS1-XTT sitoksisite test sonuçları verilmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri

Farmasötik kalitede temin edilen sivri lavanta uçucu yağı ve fraksiyonları için GK/AİD ve GK/KS ile analiz sonucunda 47 uçucu bileşik tanımlanmıştır **(Çizelge 29).**

Çizelge 29. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri

No	RRI	Bileşikler	Relatif %			
			SL	SL-H	SL-DE	SL-DM
1	1014	Trisiklen	-	0.1	-	-
2	1032	*α*-Pinen	2.4	22.3	-	-
3	1072	*α*-Fenken	0.1	1.0	-	-
4	1076	Kamfen	0.4	4.2	-	-
5	1118	*β*-Pinen	2.1	20.1	-	-
6	1132	Sabinen	e	0.5	-	-
7	1174	Mirsen	0.5	4.4	-	-
8	1203	Limonen	1.4	15.9	-	-
9	1213	1,8-Sineol	25.0	-	27.3	12.6
10	1218	*β*-Fellandren	-	0.4	-	-
11	1246	*(Z)-β*-Osimen	0.2	0.8	-	-
12	1255	γ-Terpinen	0.2	0.2	-	-
13	1266	*(E)-β*-Osimen	0.2	0.7	-	-
14	1280	*p*-Simen	0.4	7.4	-	-
15	1290	Terpinolen	e	0.2	-	-
16	1439	γ-Kamfolen Aldehit	e	-	0.3	0.2
17	1450	*trans*- Linalol Oksit	-	-	-	0.2
18	1466	α-Kubeben	-	0.2	-	-
19	1497	*α*-Kopaen	-	0.4	-	-
20	1532	Kafur	13.0	-	14.3	13.5
21	1535	*β*-Burbonen	-	0.1	-	-
22	1553	Linalol	45.8	-	50.1	58.0
23	1565	Linalil asetat	1.9	-	2.3	2.5
24	1568	*trans-α*-Bergamoten	-	0.3	-	-
25	1583	Junipen	-	0.2	-	-
26	1611	Terpinen-4-ol	0.2	-	0.3	0.4
27	1612	*β*-Karyofillen	1.1	11.9	-	-
28	1617	Lavandulil asetat	0.1	-	-	-
29	1668	*(Z)-β*-Farnesen	-	0.7	-	-
30	1670	*trans*-Pinokarveol	-	0.2	-	-
31	1682	*(E)*-Osimenol	-	-	-	0.2
32	1684	İzoborneol	0.1	-	0.5	0.6
33	1687	*α*-Humulen	0.2	1.1	-	-

Çizelge 29. (Devam) *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri

34	1690	*trans*-*β*-Terpineol	e	-	-	0.4
35	1741	*β*-Bisabolen	e	0.3	-	-
36	1773	*δ*-Kadinen	-	0.2	-	-
37	1776	*γ*-Kadinen	-	0.3	-	-
38	1706	*α*-Terpineol	1.3	-	1.7	3.7
39	1719	Borneol	1.0	-	0.9	2.3
40	1726	Germakren D	e	-	-	-
41	1733	Neril asetat	0.3	-	0.3	0.4
42	1784	*(E)*-*α*-Bisabolen	e	0.8	-	-
43	1808	Nerol	0.2	-	0.2	0.5
44	1857	Geraniol	0.3	-	0.4	1.2
45	1864	*p*-Simen-8-ol	e	0.1	-	0.2
46	2008	Karyofillen oksit	e	2.4	e	-
47	2071	Humulen epoksit- II	-	0.2	-	-
		Toplam	**98.3**	**97.6**	**98.6**	**97.1**

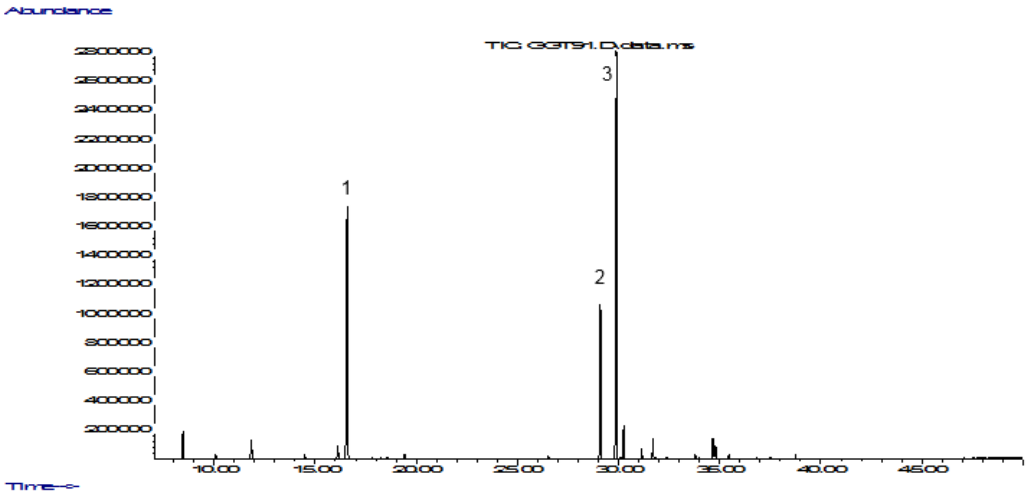
e:(eser): <0.1; (-): analizde tespit edilmemiştir. SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan fraksyonları

Analiz sonucunda *Lavandula latifolia* uçucu yağının ana bileşenleri linalol (% 45.8) ve 1,8-sineol (% 25.0) ve kafur (% 13.0) olarak tanımlanmıştır.

Bir sonraki aşamada vakum kolon kromatografisi kullanılarak uçucu yağ sırası ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanmıştır. Fraksiyonların kimyasal bileşikleri GK/AİD ve GK/KS ile tespit edilmiştir (**Çizelge 29**). *L. latifolia* uçucu yağının *n*-hekzan fraksiyonuna ait ana bileşenler; *α*-pinen (% 22.3), *β*-pinen (% 20.1), limonen (15.9) ve *β*-karyofillen (% 11.9), dietil eter fraksiyonu için; linalol (% 50.1), 1,8-sineol (% 27.3) ve kafur (% 14.3); diklorometan fraksiyonu için linalol (% 58.0), 1,8-sineol (% 12.6) ve kafur (% 13.5) olarak tespit edilmiştir. Metanol fraksiyonu için GK/AİD ve GK/KS'de madde tespit edilememiştir.

Avrupa farmakopesi (8.0)'nde *L. latifolia* uçucu yağında kimyasal içerik açısından limonen (% 0.5-3.0), 1,8-sineol (% 16.0-39.0), kafur (% 8.0-16.0), linalol (% 34.0-50.0), linalil asetat ≤ 1.6, α-terpineol (% 0.2-2.0) ve *(E)*-α-bisabolen (% 0.4-2.5) maddeleri verilen limitler içerinde olmalıdır. Ticari olarak temin ettiğimiz *L. latifolia* uçucu yağı verilen ana bileşikler doğrultusunda farmakope limitleri içerisinde yer almaktadır.

Literatür çalışmasında taze ve kuru *L. latifolia* çiçeklerinin uçucu yağlarının bileşiminde taze çiçeklerinin linalol (% 31.9), 1,8-sineol (% 18.8), borneol (% 10.1) ve kafur (% 4.4), kuru çiçekler de ise linalol (% 30.6), 1,8-sineol (% 20.9), borneol (% 8.9) ve kafur (% 4.5) bulunmuştur (Barazandeh, 2002). İspanya'nın güneyin de üç faklı bölgeden toplanan *L. latifolia* uçucu yağlarının kimyasal bileşiklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ana bileşiklerin linalol (% 27.2- 43.1), 1,8-sineol (% 28.0-34.9) ve kafur (% 10.8- 23.2), minör bileşikler ise borneol (% 0.9-3.6), *β*-pinen (% 0.8-2.6), *(E)*-*α*-bisabolen (% 0.5- 2.3), α-pinen (% 0.6- 1.9), *β*-karyofillen (% 0.5- 1.9), α-terpineol (% 0.8- 1.6) ve δ-terpineol (% 0.4- 1.2) bulunmuştur (Salido ve ark., 2004).



1. 1,8-Sineol 2.Kafur 3. Linalol

Şekil 20. *Lavandula latifolia* uçucu yağına ait ana maddelerin kromatogramı

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%)

Lavandula latifolia uçucu yağı fraksiyonlandıktan sonra fraksiyonlar rotavapor'da yoğunlaştırılıp % verimleri hesaplanmıştır.

Çizelge 30. *Lavandula latifolia* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri

Fraksiyon	Miktar (g)	Verim (%)
SL-H	0.49	8.6
SL-DE	5.01	87.9
SL-DM	0.065	1.1
SL-M	0.079	1.4
Toplam	5.64	99.0

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan; SL-M: methanol



Şekil 21. *Lavandula latifolia* uçucu yağ fraksiyonları

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Lavandula latifolia uçucu yağı (SL) ve fraksiyonları *n*-hekzan (SL-H), dietil eter (SL-DE), ve diklorometan (SL-DM) için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin tespit edilmesinde başlangıç konsantrasyon aralığı 5120-10 µg/mL'dır. Antibiyotikler ampisilin (AMP), sefuroksim (SEF) ve tetrasiklin (TCY) için 128-0.125 µg/mL olup, antifungal maddeler için flukonazol (FLU) 64- 0.125 µg/mL ve nistatin (NS) için 16- 0.03 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlar da çalışılmıştır. *L. latifolia* uçucu yağının çalışılan suşlar arasında en düşük MİK= 320 µg/mL ile *Candida* suşlarına karşı elde edilmiştir. Uçucu yağa ait en yüksek MİK= 1280 µg/mL ile ampisiline dirençli *Escherichia coli* suşuna karşı tespit edilmiştir. *L. latifolia* uçucu yağının *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan fraksiyonlarının ampisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşuna karşı MİK= 1280 µg/mL olarak tespit edilirken, ampisiline dirençli *Escherichia coli* suşuna karşı ise MİK= 640 µg/mL olarak belirlenmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının standart *S. aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 8739 suşlarına karşı MİK= 640 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 31. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test numunesi	*S. aureus**	*E. coli**	*C. albicans***
SL	640	1280	320
SL-H	1280	640	320
SL-DE	640	640	320
SL-DM	640	640	320
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**64**	**128**	**-**
SEF	**128-64**	**128**	**-**
TCY	**64-16**	**64**	**-**
FLU	**-**	**-**	**32-16**
NS	**-**	**-**	**2-1**

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H : *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin,
*: Ampisiline dirençli, ** flukonozale duyarlı

Çizelge 32. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test numune	*S. aureus* ATCC 6538	*E. coli* ATCC 8739	*C. albicans* ATCC 90028
SL	640	640	320
SL-H	640	640	320
SL-DE	640	640	320
SL-DM	640	640	320
Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**8- 4**	**16- 4**	**-**
SEF	**64**	**64**	**-**
TCY	**2-1**	**32**	**-**
FLU	**-**	**-**	**32- 16**
NS	**-**	**-**	**2**

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Dama tahtası yönteminin sonuçları

Lavandula latifolia uçucu yağı (SL) ve her bir fraksiyonu *n*-hekzan (SL-H), dietil eter (SL-DE) ve dikolorometan (SL-DM); antimikrobiyal maddeler (AMP, SEF, TCY, FLU ve NS) ile hem klinik *S. aureus, E. coli* ve *C. albicans* suşlarına, hem de standart *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 ve *C. albicans* ATCC 90028 standart suşlarına karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. *L. latifolia* uçucu yağının metanol fraksiyonunda herhangi bir madde tespit edilemediğinden kombinasyon çalışması yapılmamıştır.

Kombinasyon sonuçları FİKİ değerleri olarak verilmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının kombinasyon sonuçları mikroorganizma türlerine göre karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

L. latifolia uçucu yağının ampisilin ile kombinasyonunda klinik *S. aureus* suşuna karşı antagonist etki bulunmuştur (FİKİ= 4.03 µg/mL). Standart suşa karşı ise bağımsız etki görülmüştür (FİKİ= 1.015 µg/mL). Aynı şekilde uçucu yağın sefuroksim ve tetrasiklin ile yapılan kombinasyonlarında da bağımsız etki elde edilmiştir (FİKİ= 1.15-3.0 µg/mL) (**Çizelge 33**).

Ancak *L. latifolia* uçucu yağının *n*-hekzan, dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarının ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile kombinasyonlarında sinerjik (FİKİ= 0.28- 0.375 µg/mL) ve aditif (FİKİ= 0.51-1.0 µg/mL) etkiler gözlenmiştir. En etkili kombinasyon dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarının tetrasiklin ile yapılan kombinasyon sonucu olup sinerjik etki bulunmuştur (FİKİ= 0.017 µg /mL). Gözlenen bu etkiler bize fraksiyonlardaki bazı maddelerin bir arada iken daha etkili sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır.

n-hekzan fraksiyonunun analiz sonucunda oksijensiz bileşiklerin geldiği ve ana bileşiklerin; α-pinen (% 22.3), *β*-pinen (% 20.1), limonen (% 15.9) ve *β*-karyofillen (% 11.9) olduğu belirlenmiştir. Bu durum *n*-hekzan fraksiyonundaki bulunan bu ana bileşenlerin sinerjik etkiden sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Aynı şekilde dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarında oksijenli bileşiklerin birarada bulunduğu ve analiz sonucunda ise ana bileşenler; 1,8-sineol (% 27.3-12.6), kafur (% 14.3- 13.5) ve linalol (% 50.1- 58.0) olarak bulunmuştur.

Dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarının kimyasal bileşikleri aynı maddelere sahip olduğu ancak taşıdıkları % oranların farklı olmasından dolayı kombinasyon çalışmaları 2 fraksiyon içinde yapılmış ve aynı antimikrobiyal etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Sinerjik ve aditif etkilerin bu fraksiyonlarda da gözlenmesi bize etkiden sorumlu olan maddelerin ana bileşenler olabileceğini düşündürmektedir. Fraksiyonlarda gözlenen ana bileşiklerin etkiden sorumlu olabileceği düşünüldüğü için standart antimikrobiyal maddeler ile ana bileşiklerinde kombinasyon çalışmaları, özellikle ampisiline dirençli *S. aureus* klinik suşuna karşı yapılmıştır.

Çizelge 33. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Staphylococcus aureus*** **suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
SL+AMP	***S.aureus* kl.izol.	640	2560	4.0	64	2.0	0.031	4.03	Antagonist
SL+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	8.0	8.0	1.0	1.015	BE
SL-H+AMP	*S.aureus* kl.izol.	1280	320	0.25	64	2.0	0.031	0.28	**Sinerjik**
SL-H+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	4.0	2.0	0.5	1.0	**Aditif**
SL-DE+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	80	0.125	64	16	0.25	0.375	**Sinerjik**
SL-DE+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	640	1.0	4.0	0.06	0.015	1.015	BE
SL-DM+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	160	0.25	64	8.0	0.125	0.375	**Sinerjik**
SL-DM+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	640	1.0	4.0	0.06	0.015	1.015	BE
SL+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	1280	2.0	32	32	1.0	3.0	BE
SL+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	64	64	1.0	1.5	BE
SL-H+SEF	*S.aureus* kl.izol.	1280	640	0.5	128	2.0	0.015	0.51	**Aditif**
SL-H+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	640	1.0	>64	1.0	0.0078	1.007	BE
SL-DE+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	20	0.031	64	4.0	0.062	0.093	**Sinerjik**
SL-DE+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	0.25	>64	32	0.25	0.5	**Sinerjik**
SL-DM+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	20	0.031	64	4.0	0.062	0.093	**Sinerjik**
SL-DM+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	0.25	>64	32	0.25	0.5	**Sinerjik**
SL+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	32	1.0	2.0	BE
SL+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	640	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	BE
SL-H+TCY	*S.aureus* kl.izol.	1280	640	0.5	64	1.0	0.015	1.015	BE
SL-H+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	2.0	1.0	0.5	0.51	**Aditif**
SL-DE+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	1.25	0.0019	16	0.25	0.015	0.017	**Sinerjik**
SL-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	2.0	0.5	0.25	0.26	**Sinerjik**
SL-DM+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	1.25	0.0019	16	0.25	0.015	0.017	**Sinerjik**
SL-DM+ TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	80	0.125	2.0	0.5	0.25	0.375	**Sinerjik**

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
K: Kombinasyondaki MİK değeri, *: ampisiline dirençli klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Literatür çalışmalarında *L. latifolia* uçucu yağının herhangi bir antimikrobiyal madde ile kombinasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle lavanta uçucu yağı + ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin ile kombinasyon bulguları ilk olması açısından önem taşımaktadır. Literatür çalışmaları incelendiğinde *L. latifolia* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesinin MRSA türlerine karşı disk difüzyon yöntemi ile çalışıldığı görülmektedir (Roller ve ark., 2009). *L. latifolia* uçucu yağının *Trichophyton mentagrophytes* TIMM2789 suşuna karşı hem buhar fazı (25 µg/mL) hem de agar difüzyon testi (10 mm) ile antifungal etkinliği rapor edilmiştir (Inouye ve ark., 2006). *Haemophilus, Streptecoccus, Escherichia ve Staphylococcus* türlerini içeren mikroorganizmalara karşı buhar faz ve dilüsyon yöntemleriyle uçucu yağın antimikrobiyal etkinliği çalışılmıştır (Inouye ve ark., 2001a; Inouye ve ark., 2001b). Farklı bir çalışmada antiviral aktivite çalışmasında *L. latifolia* uçucu yağının insan herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) virüsüne karşı antiviral etkili bulunmuştur (IK_{50}= 1.0 %) (Reichling ve ark., 2009).

n-hekzan fraksiyonuna ait ana bileşiklerinin ampisilin dirençli *S. aureus* suşuna karşı standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon sonuçlarında görüldüğü üzere fraksiyonun etkisinin bu maddelerden geldiği söylenebilir. Ancak uçucu yağlar çok sayıda aktif uçucu bileşenlerden oluştukları için küçük minör bileşiklerin de etkiden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Aynı zaman da bu uçucu maddeler ile ilk kez ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile kombinasyon çalışmaları yapılmıştır.

Literatür bulgusunda α-pinen / limonen kombinasyonunun *Saccharomyces cerevisiae* suşuna karşı (+) limonen / (-) limonen kombinasyonunun ise *Moraxella catarrhalis* suşuna karşı çalışması mevcuttur (Bassole ve ark., 2012).

Çizelge 34. Klinik *S. aureus* suşuna karşı *n*-hekzan fraksiyonunun ana bileşiklerine ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu Madde			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
α-Pinen+AMP	640	1280	2.0	32	0.5	0.015	2.015	BE
α-Pinen+SEF	640	10	0.015	64	32	0.5	0.51	**Aditif**
α-Pinen+TCY	640	10	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**
***β*-Pinen +AMP**	2560	1280	0.5	32	0.5	0.015	0.51	**Aditif**
***β*-Pinen +SEF**	2560	1280	0.5	64	1.0	0.015	0.51	**Aditif**
***β*-Pinen +TCY**	2560	160	0.06	0.5	0.125	0.25	0.31	**Sinerjik**
Limonen+AMP	640	80	0.125	32	4.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
Limonen+TCY	640	10	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**
***β*-Karyofillen+AMP**	2560	640	0.25	32	1.0	0.031	0.28	**Sinerjik**
***β*-Karyofillen+TCY**	2560	40	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri, BE: Bağımsız etki

Dietil eter fraksiyonunun ana bileşenleri; 1,8-sineol (% 27.3), kafur (% 14.3) ve linalol (% 50.1) olarak bulunmuştur. Bu maddelerin etkiden sorumlu olabileceği düşünüldüğünden standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışması yapılmıştır **(Çizelge 35)**.

Kombinasyon sonuçlarında ana bileşenlerin tek başlarına da antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında sinerjik ve aditif etki sonuçları verdiği görülmektedir. Bu nedenle dietil eter fraksiyonununun standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonunda sinerjik etkinin gözlenmesi etkinin bu maddelerden olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda uçucu bileşiklerin standart antimikrobiyal maddeler ile ilk kez kombinasyon çalışması yapılmaktadır (**Çizelge 35**).

Çizelge 35. Klinik *S. aureus* suşuna karşı dietil eter fraksiyonunun ana bileşiklerine ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu Madde			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
1,8-Sineol+AMP	1280	640	0.5	32	32	1.0	1.5	BE
1,8-Sineol +SEF	1280	320	0.25	64	32	0.5	0.75	**Aditif**
1,8-Sineol+TCY	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol +AMP	2560	2560	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
Linalol +SEF	2560	1280	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol +TCY	2560	40	0.015	0.5	0.25	0.5	0.51	**Aditif**
Kafur+AMP	1280	640	0.5	32	32	1.0	1.5	BE
Kafur+SEF	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Kafur+TCY	1280	20	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri, BE: Bağımsız etki

Literatürde 1,8-sineol uçucu maddesinin limonen enantiomerleri ile kombinasyon çalışmasına rastlanılmıştır (Vuuren ve ark., 2007). 1,8-Sineol ve aromadendren ile kombinasyon çalışmaları özellikle MRSA ve vankomisin dirençli *E. faecalis* suşlarına karşı çalışılmıştır (Mulyaningsih ve ark., 2010). Linalol maddesinin timol, mentol, karvakrol ve öjenol ile *L. monocytogenes* CRBIP 13134, *E. aerogenes* CIP 104725, *E. coli* CIP 105182 ve *P. aeruginosa* CRBIP19249 suşlarına karşı kombinasyon çalışmasına rastlanılmıştır (Bassole ve ark., 2010).

Çizelge 36. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Escherichia coli*** **suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

		Uçucu Yağ			Standart Madde				
Kombinasyon	**Bakteri**	***T**	****K**	**FİK**	**Tek**	**K**	**FİK**	**FİKİ**	**SONUÇ**
SL+AMP	*****E. coli* kl.izol.	1280	2560	2.0	>64	2.0	0.015	2.015	BE
SL+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	20	0.031	16	8.0	0.5	0.53	**Aditif**
SL-H+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	>128	16	0.06	1.06	BE
SL-H+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
SL-DE+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	>64	1.0	0.0078	1.007	BE
SL-DE+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	4.0	0.06	0.015	1.015	BE
SL-DM+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	>64	1.0	0.0078	1.007	BE
SL-DM+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	4.0	0.06	0.015	1.015	BE
SL+SEF	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	>64	16	0.125	0.62	**Aditif**
SL+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	320	0.5	>64	64	0.5	1.0	**Aditif**
SL-H+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	160	0.25	128	64	0.5	0.75	**Aditif**
SL-H+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	>64	16	0.125	1.125	BE
SL-DE+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	20	0.031	64	4.0	0.062	0.093	**Sinerjik**
SL-DE+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	0.25	>64	32	0.25	0.5	**Sinerjik**
SL-DM+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	20	0.031	64	4.0	0.062	0.093	**Sinerjik**
SL-DM+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	0.25	>64	32	0.25	0.5	**Sinerjik**
SL+TCY	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	>64	32	0.25	0.75	**Aditif**
SL+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	32	32	1.0	1.015	BE
SL-H+TCY	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	64	1.0	0.015	1.015	BE
SL-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	32	2.0	0.062	1.06	BE
SL-DE+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	160	0.25	16	0.25	0.015	0.26	**Sinerjik**
SL-DE+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	>64	1.0	0.0078	1.007	BE
SL-DM+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	160	0.25	16	0.25	0.015	0.26	**Sinerjik**
SL-DM+ TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	>64	1.0	0.0078	1.007	BE

SL : *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
K: Kombinasyondaki MİK değeri, *: ampisiline dirençli klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Lavandula latifolia uçucu yağı ve fraksiyonlarının ampisilin ile kombinasyonlarında *E. coli* suşlarına karşı bağımsız etki gözlenmiştir. Sadece uçucu yağın *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı ampisilin ile kombinasyonunda aditif etki görülmüştür (FİKİ= 0.53 µg/mL).

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının en etkili olduğu kombinasyon sonuçları sefuroksim ile yapılan kombinasyon çalışmaları olmuştur. Uçucu yağın kendisi ve *n*-hekzan fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyonunda aditif etki elde edilirken, dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarında sinerjik etki bulunmuştur (FİKİ= 0.093-0.5 µg/mL). Uçucu yağ ve tetrasiklin kombinasyon çalışmalarında sadece klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etki elde edilmiştir (FİKİ= 0.75 µg/mL). *n*-hekzan fraksiyonu ve tetrasiklin kombinasyon sonuçları bağımsız etkili olarak bulunmuştur. Dietil eter ve diklorometan fraksiyonlarının tetrasiklin ile kombinasyonlarında ise sadece klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı sinerjik etki elde edilmiştir (FİKİ= 0.26 µg/mL). Genel olarak *L. latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında *E. coli* suşlarına karşı daha az etkili sonuçlar verdiği görülmüştür. Bunun nedeni Gram (-) bakterilerin yapılarında bir dış zarın olmasından kaynaklanmaktadır. Fraksiyonlarda gözlenen aditif/ sinerjik etkinin fraksiyonların içerdiği uçucu bileşiklerden kaynaklanabileceği düşünüldüğünden ana bileşikler ve standart antimikrobiyal maddelerin kombinasyon çalışmaları klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı çalışılmıştır.

Çizelge 37. Klinik *E. coli* suşuna karşı *n*-hekzan fraksiyonunun ana bileşiklerine ait FİKİ sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu bileşik			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
α-Pinen+SEF	640	10	0.015	64	64	1.0	1.01	BE
α-Pinen+TCY	640	640	1.0	128	128	1.0	2.0	BE
***β*-Pinen +AMP**	2560	1280	0.5	128	16	0.125	0.62	**Aditif**
***β*-Pinen +SEF**	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
***β*-Pinen +TCY**	1280	640	0.5	128	64	0.5	1.0	**Aditif**
Limonen+AMP	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.06	BE
Limonen+SEF	640	320	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Limonen+TCY	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.06	BE
***β*-Karyofillen+AMP**	2560	2560	1.0	32	0.5	0.015	1.01	BE
***β*-Karyofillen+SEF**	2560	2560	1.0	64	16	0.25	1.12	BE
***β*-Karyofillen+TCY**	2560	2560	1.0	128	16	0.125	1.12	BE

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

n-hekzan fraksiyonunun içerdiği ana bileşiklerden sadece *β*-pinen ve ampisilin kombinasyonunda aditif etki görülmüştür. Diğer ana bileşiklerin ampisilin ile kombinasyonunda ise bağımsız etki gözlenmiştir. Fraksiyonun kendisininde ampisilin ile kombinasyon sonucunda bağımsız etki elde edilmiştir. Bu da bize ana bileşiklerin bir arada iken bulunduğunda etkiden sorumlu olmadıklarını göstermektedir. Çalışılan ana bileşiklerden sadece *β*-pinen'nin tüm standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında aditif etki elde edilmiştir. Aktif maddenin *β*-pinen olduğu söylenebilir.

Dietil eter fraksiyonunun ana bileşikleri; 1,8-sineol, kafur ve linalol olarak bulunmuştur. Bu ana bileşiklerin de standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışması yapılmıştır. Dietil eter fraksiyonu ve ampisilin ile kombinasyon sonucu bağımsız etkili olarak bulunmuştur. Burada tek tek tüm ana bileşiklerin de ampisilin ile kombinasyon sonucu bağımsız etki olarak bulunmuştur. Dietil eter fraksiyonu ve sefuroksim kombinasyonu sinerjik etkili olarak bulunmuştu. Ana bileşenlerden linalol ve kafur uçucu bileşiklerinin de sefuroksim ile kombinasyon sonuçlarında aditif etki bulunmuştur. Bu nedenle bu iki maddenin etkiden sorumlu olabileceği söylenebilir. Dietil eter ve tetrasiklin kombinasyonunun sonucunda da sinerjik etki elde edilmişti. Ana bileşiklerin tetrasiklin ile kombinasyon çalışmalarında sadece linalol uçucu bileşiğinin tetrasiklin ile kombinasyonundan aditif etki elde edilmiştir. Kombinasyon çalışmaları sonucunda linalol maddesinin aktif bileşik olduğu söylenebilir.

Çizelge 38. Klinik dirençli *Escherichia coli* suşuna karşı dietil eter fraksiyonlarına ait ana bileşiklerinin FİKİ sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu bileşik		Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
1,8-Sineol+AMP	640	1280	2.0	32	0.5	0.015	2.01	BE
1,8-Sineol +SEF	640	320	0.5	64	64	1.0	1.5	BE
1,8-Sineol+TCY	640	80	0.125	128	128	1.0	1.12	BE
Linalol +AMP	2560	2560	1.0	32	0.5	0.015	1.01	BE
Linalol +SEF	2560	1280	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol +TCY	2560	1280	0.5	128	16	0.125	0.62	**Aditif**
Kafur+AMP	1280	1280	1.0	128	16	0.125	1.12	BE
Kafur+SEF	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Kafur+TCY	1280	160	0.125	128	128	1.0	1.12	BE

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Çizelge 39. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağının** ***Candida albicans*** **suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL)**

Kombinasyon	Maya	Uçucu Yağ		Standart Madde				FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
SL+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	160	0.5	32	16	0.5	1.0	**Aditif**
SL+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	8.0	1.0	0.125	0.62	**Aditif**
SL-H+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	80	0.25	32	8.0	0.25	0.50	**Sinerjik**
SL-H+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	40	0.125	64	8.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
SL-DE+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	40	0.125	32	8.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
SL-DE+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	40	0.125	64	8.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
SL-DM+FLU	*C. albicans* kl. izolat	320	40	0.125	64	8.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
SL +NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	160	0.5	2.0	1.0	0.5	1.0	**Aditif**
SL+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	1.0	0.031	0.031	1.031	BE
SL-H+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
SL-H+ NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
SL-DE+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	160	0.5	2.0	1.0	0.5	1.0	**Aditif**
SL-DE+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE
SL-DM+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.03	0.015	1.015	BE

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, SL-DM: diklorometan FLU: Flukonazol; NS: Nistatin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Lavandula latifolia uçucu yağı ve fraksiyonlarının flukonazol ile kombinasyon sonuçları nistatin ile yapılan kombinasyon sonuçlarına göre daha etkili sonuçlar vermiştir. Özellikle flukonazol ile yapılan kombinasyon çalışmalarında fraksiyonlar uçucu yağa göre daha etkili bulunmuştur (sinerjik etki). Bu sebeple etkiden sorumlu olabilecek uçucu bileşiklerin tek tek flukonazol ve nistatin ile kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. Uçucu ana bileşiklerin flukonazol ve nistatin ile yapılan kombinasyon çalışmaları tez kapsamında ilk kez yapılmıştır (**Çizelge 40**).

Çizelge 40. Klinik *Candida albicans* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait FİKİ sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu bileşik			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
1,8-Sineol+FLU	640	160	0.25	2.0	1.0	0.5	0.75	**Aditif**
1,8-Sineol +NS	640	320	0.5	2.0	1.0	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol +FLU	2560	640	0.25	2.0	0.06	0.03	0.28	**Sinerjik**
Linalol +NS	2560	1280	0.5	2.0	1.0	0.5	1.0	**Aditif**
Kafur+FLU	640	160	0.25	2.0	1.0	0.5	0.75	**Aditif**
Kafur+NS	640	160	0.25	2.0	1.0	0.5	0.75	**Aditif**

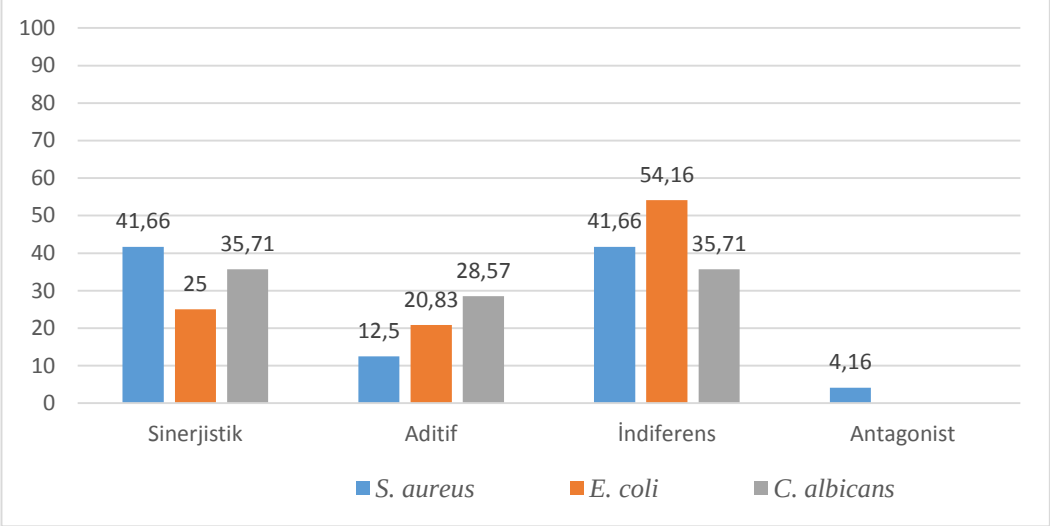
FLU: Flukonazol; NS: Nistatin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri

1,8-Sineol, kafur ve linalol uçucu maddelerinin standart antifungal maddeler ile kombinasyon sonuçlarında da etkili sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısı ile uçucu yağın flukonazol ile kombinasyonunda oldukça etkili sonuçlar göstermesi bu uçucu ana bileşiklerden kaynaklanabileceğini göstermektedir.

Toplam 62 adet kombinasyon çalışmasında 21 adet sinerjik, 12 adet aditif ve 28 adet bağımsız etki ve 1 adet antagonist sonuç bulunmuştur.

Çizelge 41. *Lavandula latifolia* uçucu yağına ait kombinasyonların % dağılımı

Mikroorganizmalar	Sinerjik	Aditif	Bağımsız etki	Antagonist
***Staphylococcus aureus* (24 kombinasyon)**	10	3	10	1
% Oran	(% 41.66)	(% 12.5)	(% 41.66)	(% 4.16)
***Escherichia coli* (24 adet kombinasyon)**	6	5	13	-
% Oran	(% 25.0)	(% 20.83)	(% 54.16)	
***Candida albicans* (14 kombinasyon)**	5	4	5	-
% Oran	(% 35.71)	(%28.57)	(%35.71)	
Genel Toplam	21	12	28	1



Şekil 22. *Lavandula latifolia* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara ait % dağılım oranları

WS1-XTT Sitotoksisite Test Sonuçları

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının aditif ve sinerjik etkili olarak bulunan kombinasyon çalışmalarından en düşük konsantrasyonda bulunan 6 kombinasyon sağlıklı insan fibroblast hücre dizilerinde XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 42'de her bir kombinasyon için kullanılan konsantrasyonlar sunulmuştur. Uçucu yağ/uçucu yağ fraksiyonu ve standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının her bir konsantrasyonu için hesaplanan ortalama % inhibisyon değeri grafiğe aktarılmış ve hücrelerde % 50 inhibisyona neden olan ($İK_{50}$) değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 42. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar

Kombinasyon	Etkili konsantrasyon (µg/mL)				
SL + FLU	40+0.125	80+0.25	**160 +0.5**	320+1	640+2
SL-H+ FLU	10+2	20+4	**40+ 8**	80+16	160+32
SL-DE+AMP	20+0.03	40+0.06	**80+0.125**	160+0.25	320+0.5
SL-DE +SEF	5+1	10+2	**20 + 4**	40+8	80+16
SL-DE +TCY	0.31+0.03	0.625+0.125	**1.25 +0.25**	2.5+0.5	5+1
SL-DE+FLU	10+2	20+4	**40+ 8**	80+16	160+32

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter, AMP: Ampisilin, SEF: Sefuroksim, TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol

Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 43**'de verilmiştir. Buna göre bu maddelere ait $İK_{50}$ değerleri ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin'in farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu maddelerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin ve flukonazol'ün sitotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 43. Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Madde	$İK_{50}$	Madde	$İK_{50}$
Sefuroksim	359.5	**Tetrasiklin**	383.64
Flukanozol	> 500	**Ampisilin**	> 500

Uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerlerin **Çizelge 44**'de verilmiştir ve uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri bu maddelerin farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırılarak sitotoksisiteleri yorumlanmıştır. Buna göre *L. latifolia* uçucu yağı ile *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonları farklı suşları öldürdükleri konsantrasyonlardan daha düşük değerlerde WS1 hücrelerini öldürmüşlerdir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdikleri dozlarda *L. latifolia* uçucu yağı ile *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 44. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Uçucu yağ/fraksiyonlar	$İK_{50}$
SL	> 500
SL-H	116.93
SL-DE	228.77

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter

Uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 45**'de verilmiştir. Buna göre bu kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu kombinasyonların aditif/sinerjik antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir.

Kombinasyonlar kullanıldıkları en yüksek konsantrasyonlarda bile WS1 hücrelerine karşı % 50 inhibisyon oranına ulaşmamıştır. Buna bağlı olarak kombinasyonların $İK_{50}$ değerlerinin uygulandıkları en yüksek konsantrasyondan daha büyük değerler olacağı sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla aditif/sinerjik antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının insan cilt fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur.

Çizelge 45. *Lavandula latifolia* uçucu yağ ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Kombinasyonlar	$İK_{50}$
SL+ FLU	640+2 <
SL-H+ FLU	80+16 <
SL-DE + AMP	320+0.5 <
SL-DE +SEF	80+16 <
SL-DE +TCY	5+1 <
SL-DE+FLU	160+32 <

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter; AMP: Ampisilin, SEF: Sefuroksim, TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol

Aliivibrio fischeri Toksisite Test Sonuçları

Toplam 33 adet sinerjik ve aditif etki elde edilen *L. latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait kombinasyon çalışmalarında aynı konsantrasyonlar elimine edilmiş ve sadece klinik dirençli suşlardan sinerjik ve aditif etki elde edilen kombinasyonlar toksisite testinde değerlendirilmiştir. *L. latifolia* uçucu yağının ve fraksiyonlarına ait ana bileşikleri; α-pinen, *β*-pinen, limonen, *β*-karyofillen, linalol, kafur ve 1,8-sineol'de toksisite açısından değerlendirilmiştir (**Çizelge 46**). Toksisite ölçümleri 5.dk, 15.dk ve 30.dk'da alınmış ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve % inhibisyon grafiği çizilmiştir **(Şekil 23).**

Çizelge 46. *Lavandula latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları

Kombinasyonlar	% inhibisyon		
	5. dak.	**15.dak.**	**30.dak.**
SL+ SEF (640+16)	94.49	95.23	98.14
SL+TCY (640+32)	93.40	92.50	89.83
SL+FLU (160+ 0.5)	70.05	71.05	70.85
SL-H+AMP (320+2)	90.50	92.61	93.69
SL-H+SEF (640+2)	96.72	98.51	98.52
SL-H+SEF (160+64)	82.82	80.10	74.92
SL-H+FLU (40+8)	51.03	53.66	57.04
SL-DE+AMP (80+0.125)	43.17	47.08	48.98
SL-DE+SEF (20+4)	45.78	50.22	58.72
SL-DE+SEF (160+32)	52.50	50.05	38.58
SL-DE+TCY (1.25+0.25)	8.26	20.11	54.54
SL-DE+FLU (40+8)	23.97	24.84	30.13
***β*-Karyofillen (5 mg/ml)**	17.29	10.86	11.33
α-Pinen (320 µg/ml)	94.83	94.13	96.97
***β*-Pinen (5 mg/ml)**	90.28	92.17	92.53
Limonen (320 µg/ml)	82.23	95.39	95.51
1,8-Sineol (5 mg/ml)	85.91	90.2	92.61
Linalol (5 mg/ml)	95.72	96.04	94.17
Kafur (5 mg/ml)	93.31	97.67	98.75
$K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L)	**74.3**	**77.3**	**79.4**

SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE: dietil eter AMP: Ampisilin, TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol

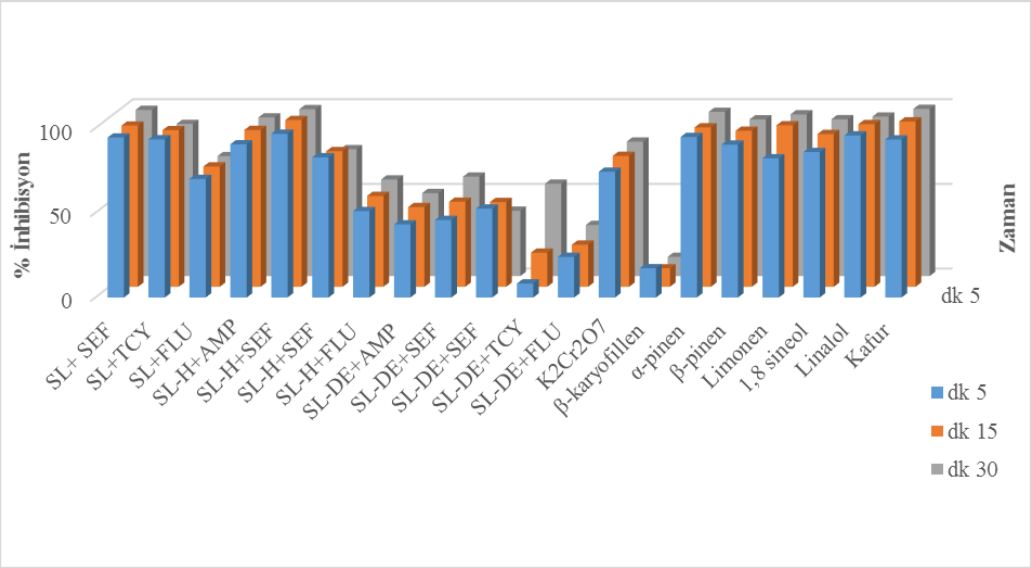
Lavandula latifolia uçucu yağının ve ana bileşiklerinin *A. fischeri* suşuna karşı toksisite çalışmalarıyla ilgili literatür de herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Bulgular ilk olması açısından önem taşımakta olup diğer *in vitro* toksisite test yöntemi için ön bulgu teşkil etmesi ve uyumlu olup olmayacağı açısından önem taşımaktadır. Buna göre:

L. latifolia uçucu yağının sinerjik /aditif etkinlik gösterdiği antimikrobiyal maddeler; sefuroksim, tetrasiklin ve flukonazol ile kombinasyonunda şusa karşı yüksek inhbisyon görülmüştür. Aynı durum uçucu yağın *n*-hekzan fraksiyonu ile antimikrobiyal maddeler, ampisilin ve sefuroksim ile kombinasyonunda da görülmüştür.

Uçucu yağın dietil eter fraksiyonunun daha düşük inhibisyona neden olduğu söylenebilir. Kombinasyonlardaki konsantrasyon miktarı yükseldikçe, inhibisyonlarında daha yüksek oranda olduğu görülmüştür.

L. latifolia uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait ana bileşiklerden *β*-karyofillen maddesinin dışındaki tüm uçucu bileşikler *A. fischeri* suşuna karşı yüksek oranda inhibisyon göstermiştir.

Şekil 23'te *L. latifolia* uçucu yağı ve fraksiyonları ile bazı uçucu bileşiklere ait inhibisyon oranları karşılaştırmalı olarak grafikte verilmiştir.



Şekil 23. ***Lavandula latifolia*** **uçucu yağ kombinasyonlarının** ***A. fischeri*** **% inhibisyon sonuçları**

Literatür bulgularında *L. angustifolia* bitkisinin uçucu yağı ile ilgili toksisite çalışması olmasına rağmen, *L. latifolia* uçucu yağına ait sitotoksik aktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak uçucu yağda bulunan bazı uçucu bileşiklerin toksisite çalışmaları mevcuttur.

Linalol ve linalil asetat bileşiklerinin insan lenfosit proliferasyonu üzerine genotoksik etkisi mikronükleus testi ile araştırılmıştır. Toksik olmayan konsantrasyonlarda (0.5-100 µg/mL) linalil asetat, anöjenik (kromozomların anafazda kutuplara gidememesi ve iğ iplikleri üzerine etkiler) ajan olarak rol oynarken, linalolün bu konsantrasyonlarda genotoksik etkisi olmadığı bildirilmiştir (Di Sotto ve ark., 2011).

Kafur ile ilgili toksisite bulgularında, 2 gr alınması durumunda yetişkinlerde, gastrointestinal sistem, böbrek ve beyinde tıkanıklıklara neden olarak toksik etkiye sebep olduğu, 3.5 gr'nın ise ölüme neden olabileceği bildirilmiştir. 2 ppm üzerindeki kafur inhalasyonunun mukoza membranının tahriş olmasına ayrıca solunum depresyonu ile apnenin oluşuma neden olmaktadır (Chen ve ark., 2013).

Diğer bir çalışmada (±)-kafur ve 1,8-sineol'ün Ames testi ile belirlenen çalışmasında mutajenik etki göstermediği bildirilmiştir (Gomes Carnerio ve ark., 1998).

PINUS MUGO UÇUCU YAĞI

Bu bölümde *Pinus mugo* uçucu yağı ve uçucu yağ fraksiyonlarının kimyasal bileşikleri, fraksiyonlara ait % verimler, antimikrobiyal aktivite ile antimikrobiyal kombinasyon sonuçları ve aktif çıkan kombinasyon çalışmalarının WS1-XTT sitoksisite test sonuçları ve *Aliivibrio fischeri* toksisite test sonuçları verilmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri

Farmasötik kalitede temin edilen *P. mugo* uçucu yağı ve fraksiyonları için GK/AİD ve GK/KS ile analiz sonucunda 59 uçucu bileşik tanımlanmıştır (**Çizelge 47**).

Çizelge 47. *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri

		Relatif %				
RRI	**Bileşikler**	**BÇ**	**BÇ-H**	**BÇ-DE**	**BÇ-DM**	**BÇ-M**
993	Santen	0.3	0.3	-	-	-
1014	Trisiklen	0.2	0.2	-	-	-
1032	*α*-Pinen	18.4	16.5	0.2	0.7	-
1076	Kamfen	1.8	1.7	-	-	-
1118	*β*-Pinen	10.5	10.5	0.1	0.7	-
1159	δ-3-Karen	18.4	19.8	0.3	1.3	-
1174	Mirsen	6.7	7.9	1.8	0.8	-
1176	*α*-Fellandren	1.3	0.9	-	-	-
1188	*α*-Terpinen	1.0	0.9	-	-	-
1203	Limonen	9.0	10.1	0.3	1.1	-
1213	1,8-Sineol	-	-	2.1	-	-
1218	*β*- Fellandren	15.2	16.5	-	1.7	-
1255	*γ*-Terpinen	0.4	0.4	-	-	-
1280	*p*-Simen	1.9	1.5	5.5	0.9	-
1290	Terpinolen	6.7	7.6	1.4	0.6	-
1374	4-hidroksi-4-metil-2 pentanon	-	-	-	-	25.0
1452	*α*-*p*-Dimetil stiren	e	-	1.0	e	
1482	Fenkil asetat	-	-	0.4	0.3	
1532	Kafur	0.1	-	2.2	1.3	-
1553	Linalol	0.3	-	3.2	2.4	-
1571	*cis*-dihidro-α-Terpineol	0.7	-	8.9	21.1	-
1583	Terpinen-1-ol	-	-	0.4	1.1	-
1583	Junipen	e	0.1	-	-	-
1590	Bornil asetat	2.4	-	24.7	16.7	-
1604	İzobornil asetat	e	-	10.9	-	-
1611	Terpinen-4-ol	e	-	1.4	1.0	-
1612	*β*-Karyofillen	2.6	3.6	2.3	e	-
1638	*cis*-*p*-ment-2-en-1-ol	-	-	0.2	0.8	-
1648	Mirtenal	-	-	0.3	-	-
1670	*trans*-Pinokarveol	e	-	1.3	1.1	-
1683	*trans*-Verbenol	-	-	0.9	4.7	-
1687	*α*-Humulen	0.2	0.1	5.0	-	-
1687	Metil kavikol	0.1	-	2.6	0.7	-

Çizelge 47 (Devam). *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının bileşikleri

1690	Kripton	e	-	0.9	1.1	-
1706	*α*-Terpineol	e	-	4.0	15.2	
1709	*α*-Terpinil asetat	0.2	-	-	-	-
1719	Borneol	e	-	3.6	3.7	-
1725	Verbenon	-	-	0.3	0.4	-
1741	*β*-Bisabolen	e	-	-	-	-
1748	Piperiton	-	-	0.7	e	-
1776	*δ*-Kadinen	e	0.1	-	-	-
1802	Kumin aldehit	e	-	0.4	-	-
1804	Mirtenol	-	-	1.0	0.9	-
1864	*p*-Simen 8-ol	e	-	0.7	1.9	-
1870	Hekzanoik asit	-	-	-	-	1.7
1949	Piperitenon	-	-	-	3.3	-
2008	Karyofillen oksit	-	-	0.6	-	-
2030	Metil öjenol	-	-	0.2	-	-
2045	Humulen epoksit-I	-	-	0.1	-	-
2050	*E*-Nerolidol	-	-	0.1	-	-
2071	Humulen epoksit-II	-	-	0.1	-	-
2073	*β*-Karyofillen alkol	-	-	0.3	-	-
2126	4-hidroksi-4-metil siklohekz-2-enon	-	-	-	-	6.7
2184	*cis*-p-ment-3-en-1,2- diol	-	-	-	-	8.1
2186	Öjenol	-	-	0.2	-	-
2219	Dimirsen II-a	0.1	0.1	1.4	0.7	-
2255	*α*-Kadinol	-	-	0.1	-	-
2269	Dimirsen II-b	e	-	0.6	-	-
2503	Dodekanoik asit	-	-	-	-	1.0
	Toplam	**98.5**	**98.8**	**93.6**	**86.0**	**42.5**

e:Eser, < %0.1; (-): analizde tespit edilmemiştir. BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-DM: diklorometan; BÇ-M: metanol

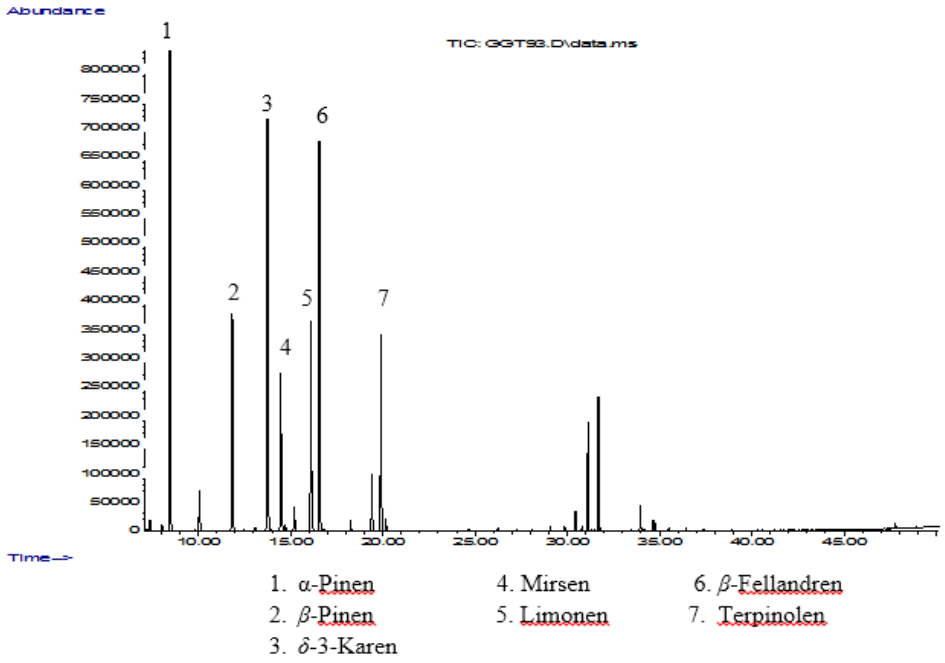
Uçucu yağ analiz sonucunda *P. mugo* uçucu yağının ana bileşikleri; *α*-pinen (% 18.4), δ-3-karen (% 18.4), *β*-fellandren (% 15.2), *β*-pinen (% 10.5), limonen (% 9.0) mirsen (% 6.7) ve terpinolen (% 6.7) olarak bulunmuştur.

n-hekzan fraksiyonu; δ-3-karen (% 19.8), *α*-pinen (% 16.5), *β*-fellandren (% 16.5) *β*-pinen (% 10.5), limonen (% 10.1), dietil eter fraksiyonu; Bornil asetat (% 24.7) ve izobornil asetat (% 10.9), diklorometan fraksiyonu; *cis*-dihidro-α-terpineol (% 21.1), bornil asetat (% 16.7) ve α-terpineol (% 15.2), metanol fraksiyonu; 4-hidroksi-4-metil-2 pentanon (% 25) cis-p-ment-3-en-1,2-diol (% 8.1) ve 4-hidroksi-4-metil siklohekz-2-enon (% 6.7) ana bileşikler olarak tanımlanmıştır.

Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde *P. mugo* uçucu yağında kimyasal içerik açısından *α*-pinen (% 10-30), kamfen ≤ 2.0, *β*-pinen (% 3-14), δ-3-karen (% 10-20), mirsen (% 3-12), limonen (% 8-14), %), *β*-fellandren (% 10-19), *p*-simen ≤ 2.5, terpinolen ≤ 8, bornil asetat (% 0.5-5) ve *β*-karyofillen (% 0.5-5) maddeleri verilen limitler içerinde olmalıdır. Ticari olarak temin ettiğimiz *P. mugo* uçucu yağı farmakope limitleri içerisinde yer almaktadır.

Tampieri ve arkadaşlarının (2005) yaptığı bir çalışmada *P. mugo* uçucu yağının ana bileşikleri; δ-3-karen (% 17.1), α-pinen (% 13.4), *β*-fellandren (% 10.4), mirsen (% 8.81), limonen (% 8.1), *β*-karyofillen (% 7.26) ve *β*-pinen (% 6.88) olarak bulunmuştur (Tampieri ve ark., 2005). Diğer bir çalışmada *P. mugo* uçucu yağının kimyasal kompozisyonun ana bileşikleri, δ-3-karen (% 23.9), *α*-pinen (% 17.9), *β*-pinen (% 7.8) ve *β*-fellandren (% 7.2) olarak tespit edilmiştir (Stevanovic ve ark., 2005). Bir diğer literatür bulgusunda *P. mugo* uçucu yağının kimyasal kompozisyonu yüksek oranda *α*-pinen (% 33.3), *δ*-kadinen (% 9.0), *α*-fenken (% 6.4) ve karyofillen oksit (% 6.1) içerdiği görülmüştür (Tsitsimpikou ve ark., 2001).

Pinus mugo uçucu yağının ana bileşiklerine ait kromatogramı **Şekil 24**'te gösterilmiştir.



Şekil 24. *Pinus mugo* uçucu yağına ait ana bileşiklerin kromatogramı

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%)

Çizelge 47'de kimyasal içeriği tanımlanan *P. mugo* uçucu yağı vakum kolon kromatografisi ile fraksiyonlanarak sırası ile kolondan *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol olmak üzere 4 farklı fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar rotavapor'da yoğunlaştırılmış ve % verimleri hesaplanmıştır.

Çizelge 48. *Pinus mugo* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri

Fraksiyon	Miktar(g)	Verim (%)
BÇ-H	4.90	81.2
BÇ-DE	0.67	11.1
BÇ-DM	0.031	0.5
BÇ-M	0.41	6.8
Toplam	**6.024**	**99.6**

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-DM: diklorometan; BÇ-M: metanol



Şekil 25. *Pinus mugo* uçucu yağına ait fraksiyonlar

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Pinus mugo uçucu yağı (BÇ) ve fraksiyonları *n*-hekzan (BÇ-H), dietil eter (BÇ-DE) ve metanol (BÇ-M) için MİK değerlerinin tespit edilmesinde başlangıç konsantrasyon aralığı 5120-10 µg/mL'dır. Antibiyotikler; ampisilin (AMP), sefuroksim (SEF) ve tetrasiklin (TCY) için 128-0.125 µg/mL olup, antifungal maddeler için flukonazol (FLU) 64-0.125 µg/mL ve nistatin (NS) için 16-0.03 µg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. *P. mugo* uçucu yağının çalışılan klinik suşlar arasında en düşük MİK=320 µg/mL ile *Candida* suşuna karşı elde edilmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait en yüksek MİK=2560 µg/mL ile ampisiline dirençli *Escherichia coli* suşuna karşı tespit edilmiştir.

P. mugo uçucu yağının ampisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşuna karşı MİK=1280 µg/mL olarak tespit edilirken, *n*-hekzan, dietil eter ve metanol fraksiyonları için MİK= 640 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Uçucu yağın standart *S.aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 8739 suşlarına karşı MİK =1280-640 µg/mL değerlerinde tespit edilirken, *C. albicans* ATCC 90020 suşuna karşı MİK=640-320 µg/mL değerlerinde bulunmuştur.

Uçucu yağ fraksiyonlarının standart suşlar arasında en düşük MİK=320 µg/mL ile *Candida* suşuna karşı elde edilmiştir. Diğer suşlara karşı MİK=640 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Çizelge 49. *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test Numunesi	*S. aureus	*E. coli	**C. albicans
BÇ	1280	2560-1280	320
BÇ-H	640	2560	320
BÇ-DE	640	2560	320
BÇ-M	640	1280	320
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**64**	**64-32**	**-**
SEF	**128**	**64**	**-**
TCY	**64-32**	**32**	**-**
FLU	**-**	**-**	**1**
NS	**-**	**-**	**2**

(-): Test edilmedi; BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-DM: diklorometan; BÇ-M: metanol; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin, *: Ampisiline dirençli, **: flukonazole duyarlı

Çizelge 50. *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test numunesi	*S. aureus* ATCC	*E. coli*	*C. albicans*
BÇ	1280-640	1280-640	640-320
BÇ-H	640	640	320
BÇ-DE	640	640	320
BÇ-M	640	640	320
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**8**	**4-2**	**-**
SEF	**8**	**64**	**-**
TCY	**2-1**	**1**	**-**
FLU	**-**	**-**	**2-1**
NS	**-**	**-**	**2**

(-): Test edilmedi, BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-DM: diklorometan; BÇ-M: metanol; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Dama tahtası yönteminin sonuçları

Pinus mugo uçucu yağı (BÇ), *n*-hekzan (BÇ-H), dietil eter (BÇ-DE) ve metanol (BÇ-M) fraksiyonları, antimikrobiyal maddeler (AMP, SEF, TCY, FLU ve NS) ile hem klinik dirençli; *S. aureus, E. coli* ve *C. albicans*; hem de standart suşlara; *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 ve *C. albicans* ATCC 90028 karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. *P. mugo* uçucu yağının diklorometan fraksiyonunun verim miktarı çok az olduğundan bu fraksiyon için kombinasyon çalışmaları yapılamamıştır. Uçucu yağ ana bileşenleri ve antimikrobiyal maddelerin kombinasyon çalışmaları sadece klinik dirençli suşlara karşı çalışılmıştır.

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının kombinasyon sonuçları mikroorganizma türlerine göre karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 51. ***Pinus mugo*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Staphylococcus aureus*** **suşlarına FİKİ sonuçları (µg/mL)**

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
BÇ+AMP	***S.aureus kl.izol.	1280	640	0.5	2.0	0.06	0.031	0.53	**Aditif**
BÇ+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	1280	640	0.5	4.0	0.06	0.015	0.51	**Aditif**
BÇ-H+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	10	0.015	64	4.0	0.062	0.078	**Sinerjik**
BÇ-H+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	8.0	4.0	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	160	0.25	64	32	0.5	0.75	**Aditif**
BÇ-DE+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	0.25	8.0	4.0	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-M+AMP	*S.aureus* kl.izol	640	160	0.25	64	4.0	0.062	0.31	**Sinerjik**
BÇ-M+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	8.0	4.0	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ+SEF	*S.aureus* kl.izol.	1280	10	0.0078	>64	8.0	0.062	0.070	**Sinerjik**
BÇ+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	1280	160	0.125	8.0	4.0	0.5	0.62	**Aditif**
BÇ-H+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	160	0.25	128	32	0.25	0.50	**Sinerjik**
BÇ-H+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	8.0	8.0	1.0	1.015	BE
BÇ-DE+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	10	0.015	128	64	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	16	8.0	0.5	1.0	**Aditif**
BÇ-M+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	128	16	0.125	1.12	BE
BÇ-M+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	8.0	8.0	1.0	1.5	BE
BÇ+TCY	*S.aureus* kl.izol.	1280	640	0.5	32	8.0	0.25	0.75	**Aditif**
BÇ+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	1280	640	0.5	2.0	0.06	0.031	0.53	**Aditif**
BÇ-H+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	80	0.125	64	4.0	0.06	0.18	**Sinerjik**
BÇ-H+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	80	0.125	64	8.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
BÇ-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-M+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	320	0.5	64	4.0	0.06	0.56	**Aditif**
BÇ-M+ TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	1.0	0.5	1.0	0.51	**Aditif**

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-M: metanol AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri, ***: ampisiline dirençli klinik izolat, BE: Bağımsız etki

Klinik dirençli *S.aureus* suşuna karşı *P. mugo* uçucu yağının ampisilin ve tetrasiklin ile kombinasyon sonuçlarında aditif etki bulunurken (FİKİ= 0.53 µg/mL), tetrasiklin ile kombinasyonunda sinerjik etki bulunmuştur (FİKİ= 0.070 µg/mL).

Etkiden sorumlu fraksiyon veya madde gruplarını belirlemek için uçucu yağ sırası ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanarak, fraksiyonların antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışması yapılmıştır. Fraksiyonların antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon sonucunda aditif ve sinerjik etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Burada yağın tamamında ve fraksiyonlarında elde edilen aktif sonuç bulguları etkiden sadece bir maddenin değil madde gruplarının sorumlu olduğunu göstermiştir.

Literatür çalışmalarında *P. mugo* uçucu yağının herhangi bir antimikrobiyal madde ile kombinasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu nedenle elde edilen bu bulgular ilk olması açısından önem taşımaktadır. Tek başına yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkinlik gösteren uçucu yağ ve uçucu yağ fraksiyonlarının aditif ve sinerjik etki gösteren kombinasyonlarında uçucu yağ ve fraksiyonlarının 10 µg/mL konsantrasyonlara inilmesi önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde dirençli mikroorganizmalarda tek başına yüksek konsantrasyonda antimikrobiyal etkinlik gösteren ampisilin için 0.06 µg/mL, sefuroksim için 8 µg/mL, tetrasiklin için 4 µg/mL konsantrasyonda olması önemli bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde *P. mugo* uçucu yağı ile ilgili birkaç antimikrobiyal, antiviral ve antiparazit ile ilgili aktivite çalışmalarına rastlanılmıştır (**Çizelge 3**).

Pinus mugo bitkisinin hekzan (MİK= 64 µg/mL), etil asetat (MİK= 256 µg/mL) ve metanol (MİK= >512 µg/mL) ekstrelerinin *Mycobacterium aurum* CIP 10482 ve *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294 suşlarına karşı aktiviteleri belirlenmiştir (Gordien ve ark., 2010).

Pinus mugo uçucu yağı ve ana bileşiklerinin balıklarda hastalığa neden olan *Saprolegnia parasitica* türüne karşı aktivitesi mikrodilüsyon metodu ile çalışılmıştır (Tampieri ve ark., 2003).

Antiviral aktivite ile ilgili yapılan bir çalışmada, *P. mugo* uçucu yağının HSV-1 ve HSV-2 virüslerini IK_{50}= 0.0007 % ppm'de inhibe ettiği bildirilmiştir (Reichling ve ark., 2009).

Uçucu yağ analiz sonucunda bodur çam uçucu yağının ana bileşenleri; α-pinen (% 18.4), δ-3-karen (% 18.4), β-fellandren (% 15.2), β-pinen (% 10.5), limonen (% 9.0) mirsen (% 6.7) ve terpinolen (% 6.7) olarak bulunmuştur. Etkinin bu ana bileşiklerden kaynaklı olabileceği düşüncesinden bazı ana bileşiklerin antimikrobiyal maddeler ile özellikle dirençli klinik türler üzerinde kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. Kombinasyon sonuçlarında ana bileşiklerin tek başlarına da etkili sonuçlar verdiği görülmüştür.

Çizelge 52. Klinik *S. aureus* suşuna karşı bazı uçucu ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu Madde		Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
α-Pinen+AMP	640	1280	2.0	32	0.5	0.015	2.015	BE
α-Pinen+SEF	640	10	0.015	64	32	0.5	0.51	**Aditif**
α-Pinen+TCY	640	10	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**
***β*-Pinen +AMP**	2560	1280	0.5	32	0.5	0.015	0.51	**Aditif**
***β*-Pinen +SEF**	2560	1280	0.5	64	1.0	0.015	0.51	**Aditif**
***β*-Pinen +TCY**	2560	160	0.06	0.5	0.125	0.25	0.31	**Sinerjik**
Limonen+AMP	640	80	0.125	32	4.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
Limonen+TCY	640	10	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**
Δ-3-Karen+AMP	2560	1280	0.5	32	0.5	0.015	0.51	**Aditif**
Δ-3-Karen+SEF	2560	1280	0.5	64	64	1.0	1.5	BE
Δ-3-Karen+TCY	2560	1280	0.5	0.5	0.015	0.03	0.53	**Aditif**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Çizelge 53. ***Pinus mugo*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Escherichia coli*** **suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
BÇ+AMP	****E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	32	4.0	0.125	0.62	**Aditif**
BÇ+AMP	*E. coli* ATCC 8739	1280	640	0.5	2.0	0.06	0.031	0.53	**Aditif**
BÇ-H+AMP	*E. coli* kl.izol.	2560	640	0.25	64	4.0	0.06	0.31	**Sinerjik**
BÇ-H+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	4.0	0.125	0.031	1.031	BE
BÇ-DE+AMP	*E. coli* kl.izol.	2560	1280	0.5	64	1.0	0.015	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	4.0	0.125	0.031	1.031	BE
BÇ-M+AMP	*E. coli* kl.izol.	1280	1280	1.0	64	1.0	0.015	1.015	BE
BÇ-M+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	4.0	4.0	1.0	1.015	BE
BÇ+SEF	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	64>	16	0.125	0.62	**Aditif**
BÇ+SEF	*E. coli* ATCC 8739	1280	640	0.5	64>	1.0	0.0078	0.50	**Aditif**
BÇ-H+SEF	*E. coli* kl.izol.	2560	10	0.0039	64	16	0.25	0.25	**Sinerjik**
BÇ-H+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	1.0	64	0.015	1.015	BE
BÇ-DE+SEF	*E. coli* kl.izol.	2560	1280	0.5	64	1.0	0.015	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	64	32	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-M+SEF	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	64	32	0.5	0.5	**Aditif**
BÇ-M+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	640	1.0	64	32	0.5	1.5	BE
BÇ+TCY	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	32	8.0	0.25	0.75	**Aditif**
BÇ+TCY	*E. coli* ATCC 8739	1280	10	0.0078	1.0	1.0	1.0	1.007	BE
BÇ-H+TCY	*E. coli* kl.izol.	2560	640	0.25	32	1.0	0.031	0.28	**Sinerjik**
BÇ-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	1.0	0.25	0.25	0.26	**Sinerjik**
BÇ-DE+TCY	*E. coli* kl.izol.	2560	1280	0.5	32	0.5	0.015	0.51	**Aditif**
BÇ-DE+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	1.0	0.5	0.5	0.51	**Aditif**
BÇ-M+TCY	*E. coli* kl.izol.	1280	1280	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
BÇ-M+ TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	1.0	0.5	1.0	0.51	**Aditif**

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-M: metanol; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin; *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri***: ampisiline dirençli klinik izolat; BE: Bağımsız etki

Pinus mugo uçucu yağının *E. coli* suşlarına karşı ampisilin (FİKİ= 0.53 µg/mL), sefuroksim (FİKİ= 0.62 µg/mL) ve tetrasiklin (FİKİ= 0.53 µg/mL) ile kombinasyonların da aditif etki bulunmuştur. Ampisilin ile yapılan kombinasyon çalışmasında sadece *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonları klinik suşlara karşı etkili bulunmuştur. Metanol fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyon çalışmasında bağımsız etki görülmüştür. Sefuroksim ve tetrasiklin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında *n*-hekzan fraksiyonu sinerjik etki (FİKİ= 0.25-0.28 µg/mL) gösterirken diğer fraksiyonlar aditif etkili bulunmuştur. Tetrasiklin ile yapılan kombinasyonda her iki *E. coli* suşuna karşı en etkili fraksiyon *n*-hekzan olmuştur (FİKİ= 0.26 µg/mL).

Uçucu yağ /uçucu yağ fraksiyonları ile yapılan kombinasyon çalışmalarında tek başına iken özellikle dirençli klinik suşlara karşı daha yüksek konsantrasyonda antimikrobiyal etkinlik gösteren ampisilin ve sefuroksim için 1 µg/mL, tetrasiklin için 0.5 µg/mL'ye kadar inilmesi önemli bir bulgudur.

Uçucu yağa ait ana bileşenlerin antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon sonuçlarında klinik dirençli *E. coli* suşlarına karşı genel olarak aditif etki görülmüştür. *α*-pinen'nin sefuroksim ve tekrasiklin ile limonen'nin ampisilin ve tetrasiklin ile kombinasyonlarında sonuç bağımsız etkili olarak bulunmuştur. Aditif etki veren kombinasyonlar *β*-pinen ve δ-3 karen maddelerin de bulunmuştur. Aynı madde gruplarının klinik dirençli *S. aureus* suşuna karşı elde edilen aktivite bulgularının daha etkili olarak bulunmasının nedeni Gr (-) mikroorganizmaların dış membran özelliği taşımalarından kaynaklanmaktadır. Literatür çalışmalarında *P. mugo* uçucu yağının antimikrobiyal maddeler ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile *E. coli* suşuna karşı herhangi bir kombinasyon çalışmasına rastlanılmamıştır**.**

Çizelge 54. Klinik *Escherichia coli* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu Madde			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	[1]FİK	T	K	FİK		
α-pinen+SEF	640	10	0.015	64	64	1.0	1.015	BE
α-pinen+TCY	640	640	1.0	128	128	1.0	2.0	BE
***β*-pinen +AMP**	2560	1280	0.5	128	16	0.125	0.62	**Aditif**
***β*-pinen +SEF**	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
***β*-pinen +TCY**	1280	640	0.5	128	64	0.5	1.0	**Aditif**
Limonen+AMP	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.062	BE
Limonen+SEF	640	320	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Limonen+TCY	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.062	BE
Δ-3-Karen+AMP	2560	1280	0.5	128	32	0.25	0.75	**Aditif**
Δ-3-Karen+SEF	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Δ-3-Karen+TCY	2560	1280	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri;
**K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Çizelge 55. *Pinus mugo* uçucu yağının *Candida albicans* suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL)

Kombinasyon	Maya	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
BÇ+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	640	320	0.5	2.0	0.5	0.25	0.75	**Aditif**
BÇ+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	1.0	0.5	1.5	BE
BÇ-H+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	640	2.0	2.0	0.03	0.015	2.015	BE
BÇ-H+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	BE
BÇ-DE+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	1.0	0.03	0.03	1.003	BE
BÇ-DE+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	1.0	1.0	1.0	1.5	BE
BÇ-M+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	1.0	0.5	1.5	BE
BÇ-M+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	640	2.0	1.0	0.03	0.03	2.003	BE
BÇ +NS	*C. albicans* ATCC 90028	640	320	0.5	2.0	0.062	0.031	0.53	**Aditif**
BÇ+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.062	0.031	1.031	BE
BÇ-H+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	0.5	0.25	1.25	BE
BÇ-H+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	2.0	2.0	1.0	1.5	BE
BÇ-DE+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	1.0	2.0	2.0	3.0	BE
BÇ-DE+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.06	0.03	1.003	BE
BÇ-M+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	1.0	0.5	1.5	BE
BÇ-M+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	BE

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-M: metanol; FLU; Flukonazol, NS: Nistatin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Candida suşlarına karşı etkinliği araştırılan uçucu yağ ve fraksiyonlarının flukonazol ve nistatin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında sadece uçucu yağın kendisi aditif etkili bulunmuştur (FİKİ=0.75-0.53 µg/mL). Fraksiyonlar *Candida* suşlarına karşı etkili sonuç vermemiştir.

Kombinasyon sonuçlarına göre *Candida* suşlarına karşı uçucu yağın kendisinin standart antifungal maddeler ile yapılan kombinasyonlarının kullanılmasının daha etkili sonuçlar vereceğini göstermiştir.

Literatür çalışmalarında *P. mugo* uçucu yağı ve standart antifungal maddeler flukonazol ve nistatin ile ile herhangi bir kombinasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Uçucu yağa ait antimikrobiyal aktivite çalışması da az sayıdadır.

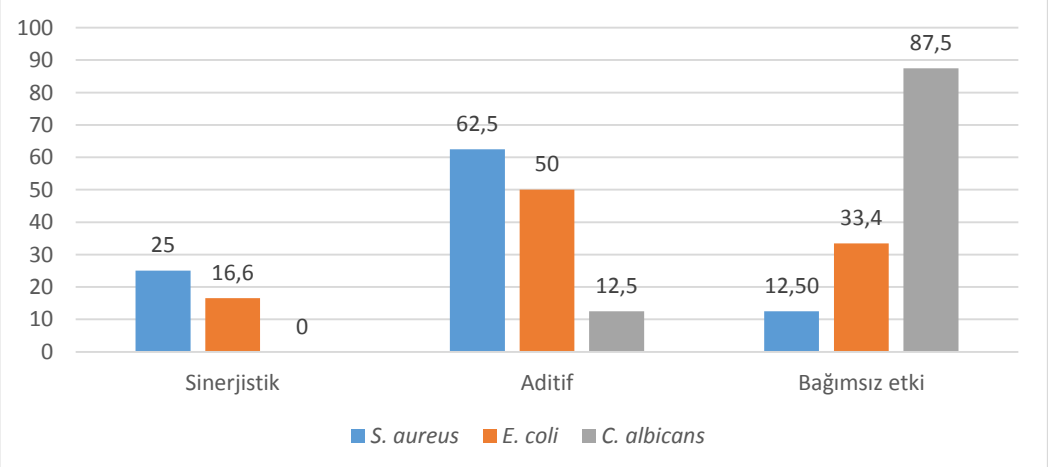
Tampieri ve arkadaşlarının 2005 yılında *Candida albicans* klinik izolatına karşı bodur çam uçucu yağı (MİK= 5000 ppm) ve ana bileşikleri; α-pinen (MİK= >1000 ppm), δ-3-karen (MİK= >1000), β-fellandren (MİK=50 ppm), β-pinen (MİK=100 ppm), limonen (MİK=1000 ppm) ve β-karyofillenin (MİK=>1000 ppm) mikrodilüsyon metodu ile antikandidal aktivitesi araştırılmıştır (Tampieri ve ark., 2005).

Fraksiyonlar da herhangi bir etki bulunmadığından uçucu yağa ait ana bileşiklerin antifungal maddeler ile kombinasyonları *Candida* suşuna karşı çalışılmamıştır.

Pinus mugo uçucu yağ ve fraksiyonları ile toplam 64 adet kombinasyon çalışması yapılmıştır. Bu kombinasyonlarda 10 adet sinerjik, 29 adet aditif ve 25 adet bağımsız etkili sonuç bulunmuştur. Kombinasyonlara ait % dağılım oranları **Çizelge 56**'da gösterilmiştir. *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarının en etkili olduğu suşun *Staphylococcus aureus* olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon çalışmalarında *P. mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Candida* suşlarına karşı etkinliği zayıf bulunmuştur.

Çizelge 56. *Pinus mugo* uçucu yağına ait kombinasyonların suşlara göre % dağılım oranı

Mikroorganizma	Sinerjik	Aditif	Bağımsız etki
***Staphylococcus aureus* (24 kombinasyon)**	6	15	3
% Oran	(% 25)	(% 62.5)	(% 12.5)
***Escherichia coli* (24 adet kombinasyon)**	4	12	8
% Oran	(% 16.6)	(% 50)	(% 33.4)
***Candida albicans* (16 kombinasyon)**	-	2	14
% Oran	-	(% 12.5)	(% 87.5)
Genel Toplam	**10**	**29**	**25**



Şekil 26. *Pinus mugo* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının aktif ve sinerjik etkili olarak bulunan kombinasyon çalışmalarından en düşük konsantrasyonda bulunan 6 kombinasyon sağlıklı insan fibroblast hücre dizilerinde XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 57'de her bir kombinasyon için kullanılan konsantrasyonlar sunulmuştur. Uçucu yağ/uçucu yağ fraksiyonu ve standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının her bir konsantrasyonu için hesaplanan ortalama % inhibisyon değeri grafiğe aktarılmış ve hücrelerde % 50 inhibisyona neden olan ($İK_{50}$) değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 57. *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar

	Etkili Konsantrasyon Aditif/Sinerjik (µg/mL)				
BÇ + SEF	2.5+2	5+4	**10 + 8**	20+16	40+32
BÇ-H +AMP	2.5+1	5+2	**10 + 4**	20+8	40+16
BÇ-H+ SEF	2.5+4	5+8	**10+ 16**	20+32	40+64
BÇ-H + TCY	20+1	40+2	**80 +4**	160+8	320+16
BÇ-DE+SEF	2.5+16	5+32	**10 + 64**	20+128	40+256
BÇ-DE +TCY	20+0.25	40+0.5	**80 + 1**	160+2	320+4

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; AMP: Ampisilin, Sefuroksim (SEF), TCY: Tetrasiklin

Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 58**'de verilmiştir. Buna göre bu maddelere ait $İK_{50}$ değerleri ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu maddelerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklinin sitotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 58. Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Maddeler	$İK_{50}$
Ampisilin	> 500
Sefuroksim	359.5
Tetrasiklin	383.64

Uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerlerin **Çizelge 59**'da verilmiştir ve uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri bu maddelerin farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırılarak sitotoksisiteleri yorumlanmıştır. Buna göre *P. mugo* uçucu yağı ile *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonları farklı suşları öldürdükleri konsantrasyonlardan daha düşük değerlerde WS1 hücrelerini öldürmüşlerdir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdikleri dozlarda *Pinus mugo* ve *Pinus mugo* uçucu yağının *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 59. *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Uçucu yağ ve fraksiyonları	$İK_{50}$
BÇ	64.75
BÇ-H	116.73
BÇ-DE	229.28

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter

Uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 60**'da verilmiştir. Buna göre bu kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu kombinasyonların aditif veya sinerjik antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir.

Çizelge 60. *Pinus mugo* uçucu yağı ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlarana ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Kombinasyonlar	$İK_{50}$
BÇ + SEF	40+32 <
BÇ-H +AMP	40+16 <
BÇ-H+ SEF	40+64 <
BÇ-H + TCY	240+12
BÇ-DE +SEF	40+256 <
BÇ-DE +TCY	320+4 <

BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter, AMP: Ampisilin, SEF: Sefuroksim, TCY: Tetrasiklin

Kombinasyonlar kullanıldıkları en yüksek konsantrasyonlarda bile WS1 hücrelerine karşı % 50 inhibisyon oranına ulaşmamıştır. Buna bağlı olarak kombinasyonların $İK_{50}$ değerlerinin uygulandıkları en yüksek konsantrasyondan daha büyük değerler olacağı sonucuna varılmıştır.

Çalışılan 6 kombinasyonun aditif/sinerjik antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda uçucu yağ / standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının insan cilt fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur.

Aliivibrio fischeri Toksisite Test Sonuçları

Toplam 39 adet sinerjik ve aditif etki elde edilen *P. mugo* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait kombinasyon çalışmalarında aynı konsantrasyonlar elimine edilmiş ve sadece klinik dirençli suşlardan sinerjik ve aditif etki elde edilen bazı kombinasyonlar *A. fischeri* suşuna karşı değerlendirilmiştir. Metanol fraksiyonunda verim az olduğundan toksisite testi açısından değerlendirilmemiştir.

Pinus mugo uçucu yağının bazı ana bileşiklerinden α-pinen, β-pinen, δ-3-karen ve limonen maddeleri de toksisite açısından değerlendirilmiştir. Biyolüminesans inhibisyon ölçümleri 5.dk, 15.dk ve 30.dk'da alınmış ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve % inhibisyon grafiği çizilmiştir (**Şekil 27**).

Çizelge 61. *Pinus mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları

Kombinasyonlar	% inhibisyon		
	5. dk	**15.dk**	**30.dk**
BÇ+AMP (640+0.06)	22.8	14.96	21.76
BÇ+SEF (10+8)	4.2	4.33	11.32
BÇ+SEF (640+16)	15.14	14.94	16.76
BÇ+TCY (640+0.06)	26.2	28.63	26.05
BÇ-H+AMP (10+4)	6.2	8.18	4.42
BÇ-H+AMP (640+0.5)	47.01	45.55	46.1
BÇ-H+SEF (160+32)	10.34	8.77	11.19
BÇ-H+SEF (10+16)	5.22	5.69	6.42
BÇ-H+TCY (80+4)	13.5	8.36	11.70
BÇ-H+TCY (640+1)	45.22	38.11	22.37
BÇ-DE+AMP (160+32)	79.38	79.47	74.44
BÇ-DE+AMP (1280+1)	95.96	96.77	97.13
BÇ-DE+SEF (10+64)	27.87	26.97	29.38
BÇ-DE+SEF (1280+1)	95.73	96.63	96.83
BÇ-DE+TCY (80+1)	69.24	70.29	66.86
BÇ-DE+TCY (1280+0.5)	95.15	96.23	96.28
α-pinen (320 µg/mL)	94.83	94.13	96.97
***β*-pinen (5 mg/mL)**	90.28	92.17	92.53
Limonen (320 µg/mL)	82.23	95.39	95.51
δ-3-karen (5 mg /mL	91.5	92.61	87.92
$K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L)	**74.3**	**77.3**	**79.4**

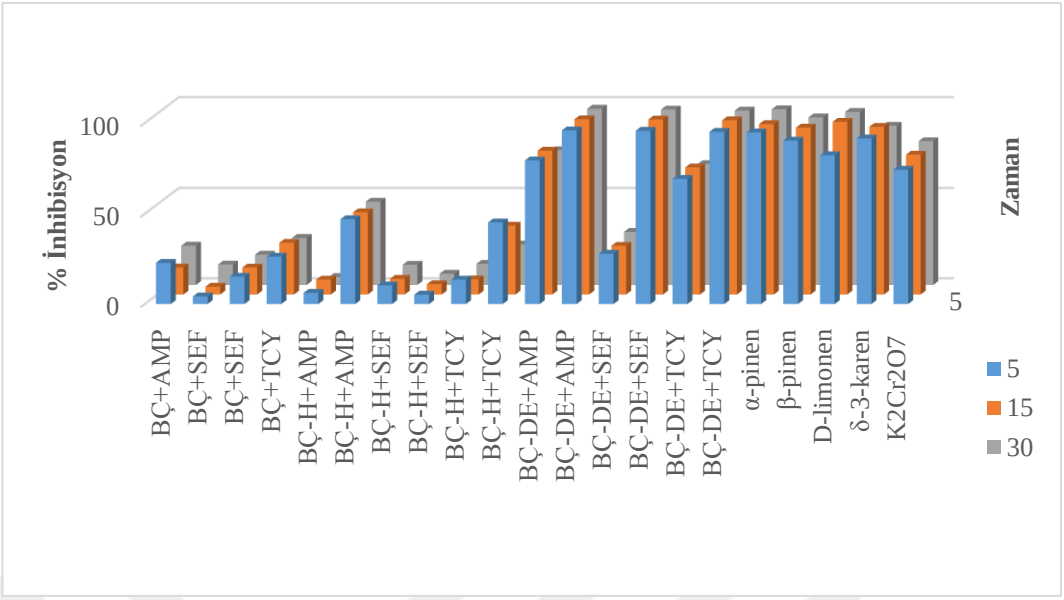
BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; AMP: Ampisilin, Sefuroksim (SEF), TCY: Tetrasiklin

Pinus mugo uçucu yağı ve ana bileşiklerinin *A. fischeri* suşuna karşı toksisite çalışmalarıyla ilgili literatürde herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Bulgular ilk olması açısından önemlidir.

Aliivibrio fischeri toksisite test sonuçlarında *P. mugo* uçucu yağının standart maddeler ampisilin, sefuroksim ve tekrasiklin ile kombinasyonlarında suşa karşı yüksek inhibisyon gözlenmemiştir. *P. mugo* uçucu yağının *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında inhibisyon oranlarının arttığı görülmektedir.

Sonuç olarak *P. mugo* uçucu yağı ve *n*-hekzan fraksiyonun antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarının *A. fischeri* suşunu daha düşük oranlarda inhibe ettiği söylenebilir.

Uçucu yağa ait ana bileşenlerden; *α*-pinen, *β*-pinen, limonen ve δ-3-karen maddelerinin *A. fischeri* suşuna karşı % 90 üzerinde inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Tek başlarına bu uçucu bileşenlerin suşu yüksek oranda inhibe ettiği görülmüştür.



Şekil 27. *Pinus mugo* uçucu yağ kombinasyonlarının *A. fischeri* % inhibisyon sonuçları

Genel olarak literatür bulgularında uçucu yağa ait toksisite çalışması yetersiz sayıdadır. Bu sebeple gerek WS1 hücrelerine karşı gerekse de *A. fischeri* suşuna karşı elde edilen toksisite bulguları bize uçucu yağın toksisite özelliği ile ilgili bilgiler vermiştir. Bu anlamda literatüre de yeni bulgular sağlaması açısından önem taşımaktadır.

WS1 toksisite test sonuçlarında $İK_{50}$ değerleri incelendiğinde *Pinus mugo* uçucu yağı > *n*-hekzan fraksiyonu > dietil eter fraksiyonu şeklinde 64.75 > 116.73 > 229.28 µg /ml'de toksisite değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu sebeple uçucu yağlarda toksik etkiden uçucu yağı oluşturan maddelerin sorumlu olduğu görülmektedir. Farklı fraksiyonlarda elde edilen uçucu maddelerin farklı toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. 2001 yılında yapılan bir araştırmada *Spodoptera litura* larvalarına karşı bodur çam uçucu yağının insektisidal etkisi araştırılmıştır. Uçucu yağın bu canlı türüne karşı toksik etkisinin % 6.7 olduğu görülmüştür (Isman ve ark., 2001). *Pinus mugo* uçucu yağının RC-37 (maymun böbrek hücresi) hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada CC_{50} değeri 40 µg/mL olarak bulunmuştur (Reichling ve ark., 2009).

Uçucu yağa ait bazı ana maddeleri ile ilgili toksisite bulgularında, α-pinen maddesinin düşük tahrişe sahip olduğu ve genel olarak güvenli kabul edildiği bildirilmiştir (Mercier ve ark., 2009). Farelerdeki akut toksisiste değeri 5 g/kg olarak rapor edilmiştir (Menezes ve ark., 2007). Kobaylarda yapılan akut dermal irritasyon toksisite testinde *α*-pinen ve *β*-pinen maddelerinin 20 % ve 100 % konsantrasyonlarda 24 saat sonunda hayvanların karınlarında tahrişe, kızarıklığa neden olduğu bildirilmiştir (Wei ve ark., 2006).

3-Karen ile ilgili bulgularda, inhalasyonunun bronkokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiş ayrıca güçlü cilt hassasiyetine yol açtığı bildirilmiştir (Lastbom ve ark., 2000). 0.13 mg/m^3 Konsantrasyonda üst solunum yollarında hafif inflamasyona neden oduğu rapor edilmiştir (Rosenberg ve ark., 2002). İnflamasyon oluşturmasının dışında, 3-karen'nin güçlü asetilkolinesteraz inhibitörü olduğu bildirilmiştir (Miyazawa ve Yamafuji, 2005).

CITRUS RETICULATA UÇUCU YAĞI

Bu bölümde *Citrus reticulata* uçucu yağı ve uçucu yağ fraksiyonlarının kimyasal bileşikleri, fraksiyonlara ait % verimler, antimikrobiyal aktivite ile antimikrobiyal kombinasyon sonuçları ve aktif çıkan kombinasyon çalışmalarının WS1-XTT sitoksisite test ve *Aliivibrio fischeri* biyolüminesans inhibisyon toksisite sonuçları verilmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonların bileşikleri

Farmasötik kalitede temin edilen *C. reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonları için GK/AİD ve GK/KS ile analiz sonucunda 48 uçucu madde tanımlanmıştır (**Çizelge 62**). Uçucu yağ analiz sonucunda mandalina uçucu yağının ana bileşenleri; limonen (% 70.1) ve γ-terpinen (% 20.0) olarak bulunmuştur.

Çizelge 62. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri**

		Relatif %				
RRI	**Bileşikler**	**M**	**M-H**	**M-DE**	**M-DM**	**M-M**
1032	*α*-Pinen	2.5	1.5	-	-	-
1035	*α*-Tuyen	0.3	0.2	-	-	-
1076	Kamfen	e	e	-	-	-
1118	*β*-Pinen	1.8	1.5	-	-	-
1132	Sabinen	0.2	0.2	-	-	-
1174	Mirsen	1.6	1.1	-	-	-
1176	α-Fellandren	e	0.3	-	-	-
1188	α-Terpinen	e	0.1	-	-	-
1203	Limonen	71.1	71.3	-	-	-
1218	*β*-Fellandren	0.4	0.4	-	-	-
1255	*γ*-Terpinen	20.0	21.3	-	-	-
1266	*(E)-β-Osimen*	-	0.1	-	-	-
1280	*p*-Simen	1.0	1.1	-	-	-
1290	Terpinolen	0.4	0.5	-	-	-
1432	Oktil format	-	-	1.5	-	-
1468	*trans* -1,2 Limonen epoksit	-	-	1.8	-	-
1474	*trans*-Sabinen hidrat	-	-	1.2	-	-
1477	4,8 Epoksiterpinolen	-	-	1.4	-	-
1487	Sitronellal	-	-	0.9	-	-
1506	Dekanal	-	-	5.9	-	-
1553	Linalol	0.2	-	18.0	-	-

Çizelge 62. (Devam) *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının bileşikleri

RRI	Bileşikler	M	M-H	M-DE	M-DM	M-M
1556	*cis*-Sabinen hidrat	-	-	0.7	-	-
1562	Oktanol	-	-	1.8	-	-
1571	8,9-Limonen epoksit-II	-	-	0.9	-	-
1611	Terpinen-4-ol	-	-	0.8	-	-
1678	*cis*-*p*-Menta-2,8-dien-1-ol	-	-	0.4	-	-
1700	Limonen-4-ol	-	-	0.8	-	-
1706	*α*-Terpineol	-	-	4.0	-	-
1722	Dodekanal	-	-	0.8	-	-
1725	*trans*-Verbenon	-	-	0.6	-	-
1726	Germakren D	e	e	-	-	-
1733	Neril asetat		-	0.6	-	-
1751	Karvon	-	-	1.2	-	-
1758	*(E,E)*-α-Farnesen	e	e	-	-	-
1807	Peril aldehit	-	-	1.6	-	-
1845	*trans*-Karveol	-	-	1.0	-	-
2084	Oktanoik asit	-	-	-	13.2	21.0
2104	Dimetil antranilat	0.3	-	30.1	-	-
2184	*cis*-*p*-Menta-3-en 1,2-diol	-	-	-	4.0	-
2192	Nonanoik asit	-	-	-	6.7	-
2226	Metil palmitat	-	-	-	-	5.3
2251	*β*-Sinensal	-	-	1.4	-	-
2255	Limonen glikol	-	-	2.9	20.4	3.7
2298	Dekanoik asit	-	-	-	19.5	15.0
2309	*α*-Sinensal	e	-	7.7	-	-
2456	Metil oleat	-	-	-	-	3.4
2458	Metil elaidat	-	-	-	-	1.8
2931	Hekzadekanoik asit	-	-	-	4.3	-
	Toplam	**99.8**	**99.6**	**88.0**	**68.1**	**50.2**

e:Eser, < %0.1; (-): analizde tespit edilmemiştir. M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol

n-hekzan fraksiyonu; limonen (% 71.3) ve *γ*-terpinen (% 21.3); dietil eter fraksiyonu için dimetil antranilat (% 30.1) ve linalol (% 18.0), diklorometan fraksiyonu için limonen glikol (% 20.4), dekanok asit (% 19.5) ve oktanoik asit (% 13.2) metanol fraksiyonu için oktanoik asit (% 21.0) ve dekanoik asit (% 15.0) ana bileşikler olarak tanımlanmıştır.

Avrupa Farmakopesi (8.0)'nde *C. reticulata* uçucu yağında kimyasal içerik açısından *α*-pinen (% 1.6-3.0), *β*-pinen (% 1.2-2.0), sabinen ≤ 3.0, mirsen (% 1.5-2.0), limonen (% 65.0-75.0), γ-terpinen (% 16.0-22.0) ve dimetil antranilat (% 0.3-0.6) maddeleri verilen limitler içerinde olmalıdır. Ticari olarak temin ettiğimiz *C. reticulata* uçucu yağı farmakope limitleri içerisinde yer almaktadır.

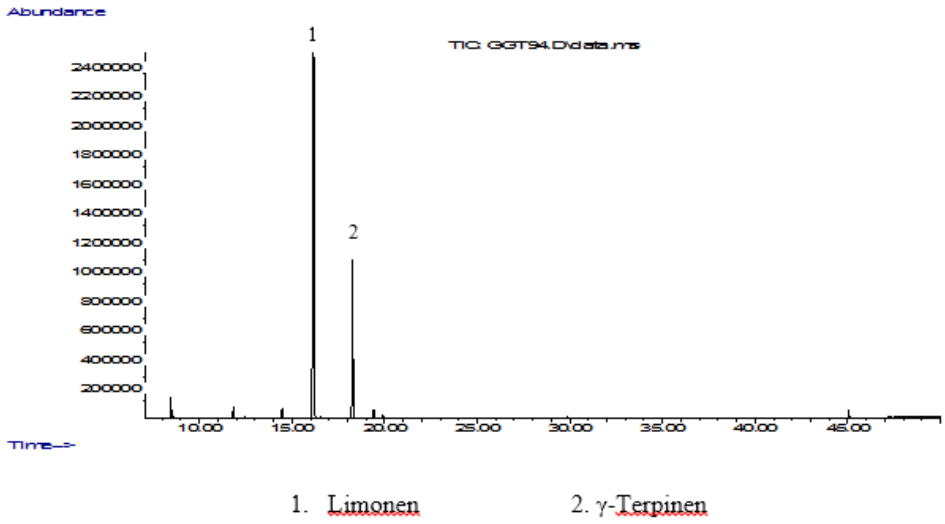
Yapılan bir çalışmada *C. reticulata* uçucu yağının uzun saklama sürelerine göre kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir. D-limonen ana bileşik olarak tanımlanırken, terpenik hidrokarbonlar, alkoller, aldehitler, ketonlar ve esterleri içeren 53 bileşik tanımlanmıştır (Gao ve ark., 2011). Türkiye'de *C. reticulata* uçucu yağlarının analizi ile yapılan bir çalışmada, limonen (% 90.7), *γ*-terpinen (% 3.9), mirsen (% 2.1), *α*-pinen (% 0.5), sabinen (% 0.3), *(E)-β*-farnesen (% 0.1), oktanal (% 0.2), dekanal (% 0.1), linalol (% 0.4), *α*-terpineol (% 0.1), geranil asetat (% 0.2) ve neril asetat (% 0.1) olarak bulunmuştur (Kırbaşlar ve ark., 2009).

Sawamura ve arkadaşlarının (2004) yaptığı bir çalışmada *C. reticulata* uçucu yağının kimyasal bileşikleri limonen (% 80.3) ve γ-terpinen (% 4.7) bulunmuş ve uçucu yağın aroma bileşikleri belirlenmiştir (Sawamura ve ark., 2004).

Citrus reticulata uçucu yağının % 88 oranında analizi tanımlanan ve 23 bileşik belirlenen bir çalışmada limonen (% 74.7), *γ*-terpinen (% 15.7), *p*-simen (% 2.0) ve mirsen (% 1.4) ana bileşik olarak bulunmuştur. Ayrıca oktil aldehit, α-fellandren, linalil asetat, nonanal, *trans*-limonen oksit, α-farnesen, desil aldehit, *β*-karyofillen ve bergamoten maddeleri de eser miktarda uçucu yağda tespit edilmiştir (Manuel Viuda-Martos ve ark., 2009).

Literatür bulgularına göre coğrafi konum, ekstraksiyon metodu, bitkinin kullanılan kısmı gibi çeşitli faktörler nedeniyle uçucu yağ kompozisyonlarında farklılıklar görülmektedir.

Citrus reticulata uçucu yağının ana bileşiklerine ait kimyasal kromatogramı **Şekil 28**'de gösterilmiştir.



1. Limonen 2. γ-Terpinen

Şekil 28. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağına ait ana bileşiklerin kromatogramı**

Uçucu yağ ve fraksiyonların miktarları ve verimleri (%)

Citrus reticulata uçucu yağı vakum kolon kromatografisi ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol olmak üzere 4 farklı fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyonlar rotavapor'da yoğunlaştırılmış ve verimleri hesaplanmıştır.



Şekil 29. *Citrus reticulata* uçucu yağına ait fraksiyonlar

Çizelge 63. *Citrus reticulata* uçucu yağının fraksiyon miktarları ve verimleri

Fraksiyon	Miktar (g)	Verim (%)
M-H	4.399	73.0
M-DE	0.736	12.2
M-DM	0.151	2.5
M-M	0.710	11.77
Toplam	**5.998**	**99.47**

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol

Antimikrobiyal Etkinlik Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon sonuçları

Citrus reticulata uçucu yağı (M) ve fraksiyonları *n*-hekzan (M-H), dietil eter (M-DE), diklorometan (M-DM) ve metanol (M-M) için MİK değerlerinin tespit edilmesinde başlangıç konsantrasyon aralığı 5120-10 µg/mL'dır. Antibiyotikler; ampisilin (AMP), sefuroksim (SEF) ve tetrasiklin (TCY) için 128-0.125 µg/mL olup, antifungal maddeler için flukonazol (FLU) 64-0.125 µg/mL ve nistatin (NS) için 16-0.03 µg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

C. reticulata uçucu yağının çalışılan klinik suşlar arasında en düşük MİK=320 µg/mL ile *Candida* suşlarına karşı elde edilmiştir. Mandalina uçucu yağı ve fraksiyonları: *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol için ampsiline dirençli *S. aureus* ve ampisiline dirençli *E. coli* için MİK= 640 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *C. albicans* izolatına karşı MİK= 320 µg/mL olarak belirlenmiştir. Mandalina uçucu yağının ve fraksiyonlarının standart *S. aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 8739 suşlarına karşı MİK= 640 µg/mL değerlerinde tespit edilirken, *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı MİK= 640-320 µg/mL değerlerinde bulunmuştur.

Çizelge 64. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının klinik suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test numunesi	*S. aureus	*E. coli	**C. albicans
M	640	640	320
M-H	640	640	320
M-DE	640	640-320	320
M-DM	640	640	320
M-M	640	640	320
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**32**	**128>**	**-**
SEF	**32**	**64**	**-**
TCY	**128-64**	**128>**	**-**
FLU	**-**	**-**	**2**
NS	**-**	**-**	**8**

(-): Test edilmedi, M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol, AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin, *: Ampisiline dirençli, **: flukonazole duyarlı

Çizelge 65. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının standart suşlara karşı elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

Test numuneleri	*S. aureus* ATCC 6538	*E. coli* ATCC 8739	*C. albicans* ATCC 90028
M	640	640	320
M-H	640	640	320
M-DE	640	640	320
M-DM	640	640	640
M-M	640	640	640
St. Antimikrobiyal maddeler			
AMP	**16**	**16**	**-**
SEF	**128**	**128**	**-**
TCY	**4**	**4**	**-**
FLU	**-**	**-**	**2**
NS	**-**	**-**	**8**

(-): Test edilmedi, M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol**,** AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Tez kapsamında seçilen *C. reticulata* uçucu yağı ile ilgili olarak **Çizelge 4**'te özetlenen antimikrobiyal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Literatür bulgularında *C. reticulata* uçucu yağının birçok bakteri, maya ve fungus türlerine karşı antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir. Ancak tez kapsamında çalışmayı hedeflediğimiz kombinasyon bulgularına literatürde rastlanılmamıştır. Bu nedenle mandalina uçucu yağının standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışması ilk kez tez kapsamında değerlendirilmiştir.

Dama tahtası yönteminin sonuçları

Citrus reticulata uçucu yağı (M) ve fraksiyonları *n*-hekzan (M-H), dietil eter (M-DE) ve metanol (M-M), antimikrobiyal maddeler (AMP, SEF, TCY, FLU ve NS) ile hem klinik (*S. aureus, E. coli* ve *C. albicans*); hem de standart suşlara (*S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 ve *C. albicans* ATCC 90028) karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır.

C. reticulata uçucu yağının diklorometan ve metanol fraksiyonunun verim miktarı çok az olduğundan sadece klinik dirençli *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. *Candida* suşlarına karşı diklorometan fraksiyonunun kombinasyon çalışması yapılamamıştır.

Uçucu yağ ana bileşikleri limonen ve γ-terpinen'nin antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışmaları sadece klinik dirençli suşlara karşı çalışılmıştır.

Kombinasyon sonuçları FİKİ değerleri olarak verilmiştir. Sonuçlar; sinerjik, aditif veya bağımsız etki olarak ifade edilmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının kombinasyon sonuçları mikroorganizma türlerine göre karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Literatür bulgularında *C. reticulata* uçucu yağının ana bileşiği olan limonen'in Amfoterisin B ile *Candida* türlerine karşı bir çalışması mevcuttur (Nozaki ve ark., 2010). Aynı zamanda limonen enantiomerlerinin 1,8-sineol ile kombinasyon çalışması yapılmıştır (Vuuren ve Viljoen, 2007).

Çizelge 66. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Staphylococcus aureus*** **suşlarına FİKİ sonuçları (µg/mL)**

		Uçucu Yağ			Standart Madde				
Kombinasyon	**Bakteri**	***T**	****K.**	**FİK**	**T**	**K**	**FİK**	**FİKİ**	**SONUÇ**
M+AMP	*****S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	8.0	0.25	1.25	BE
M+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	16	8.0	0.5	1.0	**Aditif**
M-H+AMP	*S.aureus* kl.izol.	1280	640	0.5	32	0.5	0.015	0.51	**Aditif**
M-H+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.31	16	8.0	0.5	0.51	**Aditif**
M-DE+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
M-DE+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	16	8.0	0.5	0.51	**Aditif**
M-DM+AMP	*S.aureus* kl.izol.	640	40	0.062	32	16	0.5	0.56	**Aditif**
M-M+AMP	*S.aureus* kl.izol	2560	640	0.25	>64	128	1.0	1.25	BE
M+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
M+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	0.25	128	64	0.5	0.75	**Aditif**
M-H+SEF	*S.aureus* kl.izol.	1280	80	0.06	32	8.0	0.25	0.31	**Sinerjik**
M-H+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	320	0.5	128	64	0.5	1.0	**Aditif**
M-DE+SEF	*S.aureus* kl.izol.	640	640	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
M-DE+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	128	128	1.0	1.015	BE
M-DM+SEF	*S.aureus* kl.izol	640	160	0.25	128	128	1.0	1.25	BE
M-M+SEF	*S.aureus* kl.izol.	2560	20	0.007	>64	128	1.0	1.007	BE
M+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	320	0.5	128	64	0.5	1.0	**Aditif**
M+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	4.0	0.5	0.125	0.14	**Sinerjik**
M-H+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	160	0.25	64	32	0.5	0.75	**Aditif**
M-H+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	80	0.125	4.0	0.5	0.125	0.25	**Sinerjik**
M-DE+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	80	0.125	64	16	0.25	0.37	**Sinerjik**
M-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	0.015	4.0	0.5	0.125	0.14	**Sinerjik**
M-DM+TCY	*S.aureus* kl.izol.	640	40	0.062	64	32	0.5	0.56	**Aditif**
M-M+TCY	*S.aureus* kl.izol.	2560	20	0.007	64	128	2.0	2.007	BE

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri***: ampisiline dirençli klinik izolat; BE: Bağımsız etki

Citrus reticulata uçucu yağının ampisilin ile kombinasyonunda standart *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı aditif etki bulunmuştur (FİKİ= 1.0 µg/mL). Klinik dirençli suşuna karşı ise sonuç bağımsız etkili bulunmuştur (FİKİ= 1.25 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağının sefuroksim ile kombinasyonunda standart *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı aditif etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.75 µg/mL). Klinik dirençli suşuna karşı ise sonuç bağımsız etki etkili bulunmuştur (FİKİ= 1.015 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağının tetrasiklin ile kombinasyonunda ise klinik dirençli *S. aureus* suşuna karşı aditif etki (FİKİ= 1.0 µg/mL) standart *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı sinerjik etki görülmüştür (FİKİ= 0.14 µg/mL).

n-Hekzan fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyon çalışmasında hem klinik dirençli hem de standart *S. aureus* suşlarına karşı aditif etki bulunmuştur (FİKİ= 0.51 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağı ise sadece standart suşa karşı etkili bulunmuştur. Bu nedenle bu fraksiyonun uçucu yağa göre daha etkili sonuç verdiği görülmüştür.

n-Hekzan fraksiyonunun sefuroksim ile kombinasyonun da klinik dirençli *S. aureus* şuşuna karşı sinerjik etkili (FİKİ= 0.31 µg/mL) ve standart *S. aureus* suşuna karşı aditif etkili (FİKİ= 1.0 µg/mL) bulunmuştur. *C. reticulata* uçucu yağı ise klinik dirençli suşa karşı bağımsız etkili bulunmuştur. Bu nedenle bu fraksiyonun uçucu yağa göre daha etkili sonuç verdiği görülmüştür.

n-Hekzan fraksiyonunun tetrasiklin ile kombinasyon çalışmasında klinik dirençli *S. aureus* şuşuna karşı aditif etkili (FİKİ= 0.75 µg/mL) ve standart *S. aureus* suşuna karşı sinerjik etkili (FİKİ= 0.25 µg/mL) bulunmuştur. *C. reticulata* uçucu yağı ile aynı etki sonuçlarını vermiştir.

Dietil eter fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyon çalışmasında *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı aditif etkili (FİKİ= 0.51 µg/mL), klinik dirençli suşa karşı ise sonuç bağımsız etkili bulunmuştur (FİKİ= 1.015 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağı ile aynı etki sonuçlarını vermiştir.

Dietil eter fraksiyonunun sefuroksim ile kombinasyon çalışmasında hem klinik dirençli hem de standart *S. aureus* suşlarına karşı bağımsız etkili sonuç alınmıştır (FİKİ= 1.015 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağı ise standart *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı aditif etkili bulunmuştur. Bu nedenle bu fraksiyonun uçucu yağdan daha düşük etkiye sahip olduğu görülmüştür. Dietil eter fraksiyonunun tetrasiklin ile kombinasyon çalışmasında ise hem klinik dirençli suşa karşı sinerjik (FİKİ= 0.37 µg/mL), hem de standart *S. aureus* suşuna karşı sinerjik etkili (FİKİ= 0.14 µg/mL) bulunmuştur. *C. reticulata* uçucu yağı ile aynı oranda etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Diklorometan fraksiyonunun ampisilin ve tetrasiklin ile kombinasyon çalışmalarında klinik dirençli *S. aureus* suşuna karşı aditif etki görülmüştür. Metanol fraksiyonu ile kimyasal içerik açısından birkaç uçucu madde ve uçucu maddelerin yüzdeleri ile farklı olan diklorometan fraksiyonu antimikrobiyal kombinasyon çalışmasında etki açısından farklılık göstermiştir. Kombinasyon sonuçlarında uçucu yağa ait minor bileşiklerin ve yağdaki bulunma yüzdelerinin de sonuçlar açısından farklılık oluşturabileceği görülmüştür.

Metanol fraksiyonunun standart maddeler ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile yapılan kombinasyon çalışmalarında klinik dirençli *S. aureus* suşuna karşı bağımsız etkili elde edilmiştir.

Citrus reticulata uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait bazı ana bileşiklerin standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında etkili sonuçlar limonen ve linalol maddelerinde görülmüştür. Uçucu yağın ana bileşiklerinden γ-terpinen ise sadece sefuroksim ile aditif etki vermiştir.

Aditif ve sinerjik etkinliklerde minör bileşiklerinde etkili olabileceği ve aynı zamanda maddelerin de birbirleri ile etkileşimi konusunda daha fazla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 67. Klinik dirençli *Staphylococcus aureus* suşuna karşı bazı ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

	Uçucu Madde			Standart Madde				
Kombinasyon	***T**	****K**	**FİK**	**T**	**K**	**FİK**	**FİKİ**	**Sonuç**
Limonen+AMP	640	80	0.125	32	4.0	0.125	0.25	**Sinerjik**
Limonen+SEF	640	160	0.25	64	32	0.5	0.75	**Aditif**
Limonen+TCY	640	10	0.015	0.5	0.125	0.25	0.26	**Sinerjik**
γ-Terpinen+AMP	1280	1280	1.0	>64	128	1.0	2.0	BE
γ-Terpinen +SEF	1280	20	0.015	>64	64	0.5	0.51	**Aditif**
γ-Terpinen+TCY	1280	20	0.015	64	128	2.0	2.015	BE
Linalol + AMP	2560	2560	1.0	32	0.5	0.015	1.015	BE
Linalol +SEF	2560	1280	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol+TCY	2560	40	0.015	0.5	0.25	0.5	0.51	**Aditif**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Çizelge 68. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağı ve fraksiyonlarının** ***Escherichia coli*** **suşlarına karşı FİKİ sonuçları (µg/mL)**

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		**T	**K	FİK	T	K	FİK		
M+AMP	***E. coli* kl.izol.	640	320	0.5	>128	128	1.0	1.5	BE
M+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	16	8.0	0.5	0.51	**Aditif**
M-H+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	>128	32	0.125	1.12	BE
M-H+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	16	16	1.0	1.015	BE
M-DE+AMP	*E. coli* kl.izol.	640	320	0.5	>128	32	0.125	0.62	**Aditif**
M-DE+AMP	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	16	8.0	0.5	0.51	**Aditif**
M-DM+AMP	*E. coli* kl.izol	640	320	0.5	128	128	1.0	1.5	BE
M-M+AMP	*E. coli* kl.izol.	1280	1280	1.0	>64	1.0	0.007	1.007	BE
M+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	320	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
M+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	0.25	128	64	0.5	0.75	**Aditif**
M-H+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	640	1.0	64	16	0.25	1.25	BE
M-H+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	80	0.125	128	64	0.5	0.62	**Aditif**
M-DE+SEF	*E. coli* kl.izol.	320	160	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
M-DE+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	128	128	1.0	1.015	BE
M-DM+SEF	*E. coli* kl.izol	640	40	0.062	64	32	0.5	0.56	**Aditif**
M-M+SEF	*E. coli* kl.izol.	1280	640	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
M+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	320	0.5	>128	64	0.25	0.75	**Aditif**
M+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	160	0.25	4.0	0.5	0.125	0.37	**Sinerjik**
M-H+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	320	0.5	>128	128	0.5	1.0	**Aditif**
M-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	20	0.31	4.0	0.5	0.125	0.15	**Sinerjik**
M-DE+TCY	*E. coli* kl.izol.	320	160	0.5	128	32	0.25	0.75	**Aditif**
M-DE+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	0.015	4.0	0.5	0.125	0.15	**Sinerjik**
M-DM+TCY	*E. coli* kl.izol	640	320	0.5	64	64	1.0	1.5	BE
M-M+TCY	*E. coli* kl.izol.	1280	80	0.06	>64	128	1.0	1.06	BE

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-DM: diklorometan; M-M: metanol; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Citrus reticulata uçucu yağının ampisilin ile kombinasyon sonucunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı bağımsız etki bulunurken (FİKİ= 1.5 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı aditif etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.51 µg/mL). Mandalina uçucu yağının sefuroksim ile kombinasyonu sonucunda hem klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etkili (FİKİ= 1.0 µg/mL) hem de standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı aditif (FİKİ= 0.75 µg/mL) olarak bulunmuştur. Uçucu yağın tetrasiklin ile kombinasyonu sonucunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etkili bulunurken (FİKİ= 0.75 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı sinerjik etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.37 µg/mL).

n-Hekzan fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyonunda hem klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı bağımsız etkili (FİKİ= 1.12 µg/mL) hemde standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı bağımsız etkili (FİKİ= 1.015 µg/mL) olarak bulunmuştur. Dolayısı ile bu fraksiyonun uçucu yağa göre etkisi daha az bulunmuştur. *n*-Hekzan fraksiyonunun sefuroksim ile kombinasyonunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı bağımsız etki bulunurken (FİKİ= 1.25 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı aditif etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.62 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağının her iki türe karşı da sonucu aditif etkili bulunmuştur. Bu sebeple bu fraksiyonun etkisi uçucu yağa göre daha az etkili bulunmuştur. *n*-Hekzan fraksiyonunun tetrasiklin ile kombinasyonunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etkili bulunurken (FİKİ= 1.0 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı sinerjik etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.15 µg/mL). Uçucu yağın kendisi ile benzer oranda etkiyi göstermiştir.

Dietil eter fraksiyonunun ampisilin ile kombinasyonunda hem klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı (FİKİ= 0.62 µg/mL) hem de standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı aditif etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.51 µg/mL). Dietil eter fraksiyonunun sefuroksim ile kombinasyonunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etkili bulunurken (FİKİ= 1.0 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı bağımsız etkili bulunmuştur (FİKİ= 1.015 µg/mL). Bu nedenle uçucu yağın kendisinden daha az etkiye sahiptir. Dietil eter fraksiyonunun tetrasiklin ile kombinasyonunda klinik dirençli *E. coli* suşuna karşı aditif etkili bulunurken (FİKİ= 0.75 µg/mL), standart *E. coli* ATCC 8739 suşuna karşı sinerjik etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.15 µg/mL). Uçucu yağın kendisi ile benzer oranda etki göstermiştir. Diklorometan ve metanol fraksiyonu ise sadece sefuroksim ile aditif etki göstermiştir (FİKİ= 0.56 ve 1.0 µg/mL).

C. reticulata uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait ana maddelerin dirençli *E. coli* suşuna karşı sadece limonen ile sefuroksim kombinasyonu ve linalol'ün sefuroksim ile tetrasiklin kombinasyonlarında aditif etki görülmüştür.

Uçucu yağın ana maddelerinden *γ*-terpinen ise tüm standart antibakteriyel maddeler ile kombinasyonlarında bağımsız etkili sonuç vermiştir.

Çizelge 69. Klinik *Escherichia coli* suşuna karşı bazı uçucu ana bileşiklere ait kombinasyon sonuçları (µg/mL)

Kombinasyon	Uçucu Madde		Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
Limonen+AMP	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.062	BE
Limonen+SEF	640	320	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Limonen+TCY	640	640	1.0	128	8.0	0.06	1.062	BE
γ-Terpinen+AMP	1280	1280	1.0	>64	1.0	0.007	1.007	BE
γ-Terpinen +SEF	1280	10	0.007	64	64	1.0	1.007	BE
γ-Terpinen+TCY	1280	10	0.007	128	128	1.0	1.007	BE
Linalol + AMP	2560	2560	1.0	32	0.5	0.015	1.01	BE
Linalol +SEF	2560	1280	0.5	64	32	0.5	1.0	**Aditif**
Linalol+TCY	2560	1280	0.5	128	16	0.125	0.62	**Aditif**

AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri

Çizelge 70. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağının** ***Candida albicans*** **suşlarına karşı FİKİ değerleri (µg/mL)**

Kombinasyon	Maya	Uçucu Yağ			Standart Madde			FİKİ	SONUÇ
		*T	**K	FİK	T	K	FİK		
M+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	0.06	0.03	1.03	BE
M+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	320	1.0	2.0	0.06	0.03	1.03	BE
M-H+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	0.06	0.03	1.03	BE
M-H+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	2.0	0.06	0.03	0.53	**Aditif**
M-DE+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	320	1.0	2.0	0.06	0.03	1.03	BE
M-DE+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	2.0	0.06	0.03	0.53	**Aditif**
M-M+FLU	*C. albicans* kl.izolat	640	320	0.5	2.0	0.5	0.25	0.75	**Aditif**
M +NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	10	0.31	8.0	2.0	0.25	0.28	**Sinerjik**
M+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	10	0.31	8.0	2.0	0.25	0.28	**Sinerjik**
M-H+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	10	0.31	8.0	2.0	0.25	0.28	**Sinerjik**
M-H+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	10	0.31	8.0	2.0	0.25	0.28	**Sinerjik**
M-DE+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	160	0.5	8.0	0.25	0.031	0.53	**Aditif**
M-DE+NS	*C. albicans* kl.izolat	320	160	0.5	8.0	0.25	0.031	0.53	**Aditif**
M-M+NS	*C. albicans* kl.izolat	640	10	0.015	2.0	4.0	2.0	2.015	BE

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; M-M: metanol; FLU: Flukonazol, NS: Nistatin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Citrus reticulata uçucu yağının flukonazol ile kombinasyonun da hem klinik *C. albicans* hem de standart *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı bağımsız etki görülmüştür (FİKİ=1.03 µg/mL). *C. reticulata* uçucu yağının nistatin ile kombinasyonun da ise hem klinik *C. albicans* hem de standart *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı sinerjik etkili bulunmuştur (FİKİ= 0.28 µg/mL).

n-Hekzan fraksiyonu ve dietil eter fraksiyonunun flukonazol ile kombinasyonlarında klinik *C. albicans* izolatına karşı aditif etki bulunmuştur. Bu nedenle uçucu yağın kendisine göre bu fraksiyonun daha etkili olduğu görülmüştür.

C. reticulata uçucu yağının ve fraksiyonlarının (*n*-hekzan ve dietil eter) nistatin ile daha etkli kombinasyon sonuçları verdiği görülmüştür. Uçucu yağın ana bileşiklerinden *γ*-terpinen'nin nistanin ile kombinasyon çalışması sonucunda bağımsız etki görülmüştür.

Uçucu yağın kendisinin nistatin ile kombinasyonunda sinerjik etki gözlenmiştir. Bu sebeple sinerjik aktiviteden *γ*-terpinen'nin sorumlu olmadığı söylenebilir.

Çizelge 71. Klinik *Candida albicans* suşuna karşı γ-terpinen ve nistatin kombinasyon sonucu (µg/mL)

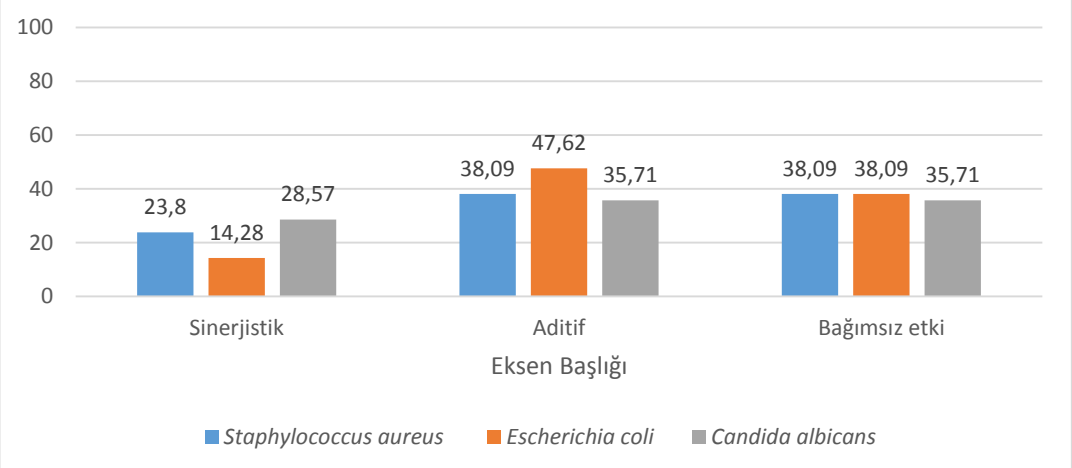
Kombinasyon	Uçucu bileşik		Standart Madde				FİKİ	SONUÇ
	*T	**K	FİK	T	K	FİK		
γ-terpinen+NS	640	10	0.015	2.0	4.0	2.0	2.015	BE

*T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri; BE: Bağımsız etki

Citrus reticulata uçucu yağ ve fraksiyonları ile toplam 56 adet kombinasyon çalışması yapılmıştır. Bu kombinasyonlarda 12 adet sinerjik, 23 adet aditif ve 21 adet bağımsız etkili sonuç bulunmuştur. Kombinasyonlara ait % dağılım oranları **Çizelge 72**'de gösterilmiştir. *C. reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının en etkili olduğu suşlar *Staphlococcus aureus ve Candida albicans* olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon çalışmalarında mandalina uçucu yağı ve fraksiyonlarının *E. coli* suşlarına karşı etkinliği zayıf bulunmuştur.

Çizelge 72. *Citrus reticulata* uçucu yağına ait kombinasyon sayısı ve aktivite sonuçlarının % dağılımı

	Sinerjik	Aditif	Bağımsız etki
***Staphylococcus aureus* (21 kombinasyon)**	5	8	8
% Oran	% 23.80	% 38.09	% 38.09
***Escherichia coli* (21 adet kombinasyon)**	3	10	8
% Oran	% 14.28	% 47.62	% 38.09
***Candida albicans* (14 kombinasyon)**	4	5	5
% Oran	% 28.57	% 35.71	% 35.71
Genel Toplam	**12**	**23**	**21**



Şekil 30. *Citrus reticulata* uçucu yağ kombinasyon antimikrobiyal etki sonuçlarının patojen suşlara göre % dağılım oranları

WS1-XTT Sitoksisite Test Sonuçları

Uçucu yağ ve fraksiyonlarının aktif ve sinerjik etkili olarak bulunan kombinasyon çalışmalarından en düşük konsantrasyonda bulunan 5 kombinasyon sağlıklı insan cilt fibroblast hücre dizilerinde XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. **Çizelge 73**'te her bir kombinasyon için kullanılan konsantrasyonlar sunulmuştur. Uçucu yağ/uçucu yağ fraksiyonu ve standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının her bir konsantrasyonu için hesaplanan ortalama % inhibisyon değeri grafiğe aktarılmış ve hücrelerde % 50 inhibisyona neden olan ($İK_{50}$) değerler hesaplanmıştır.

Çizelge 73. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait aktif kombinasyonlar için sitotoksisite testinde kullanılan konsantrasyonlar

Kombinasyon	← Etkili Konsantrasyon Aditif/Sinerjik (µg/mL) →				
M + NS	2.5+0.5	5+1	**10+ 2**	20+4	40+8
M-H+ NS	2.5+0.5	5+1	**10+ 2**	20+4	40+8
M-H +SEF	2.5+2	5+4	**10 + 8**	20+16	40+32
M-DE+ FLU	40+0.015	80+0.03	**160+0.06**	320+0.125	640+0.25
M-DE+ NS	40+0.06	80+0.125	**160+0.25**	320+0.5	640+1

M: Mandalina uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter, SEF: Sefuroksim, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 74**'de verilmiştir. Buna göre bu maddelere ait $İK_{50}$ değerleri sefuroksim, nistatin ve flukonazol'ün farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu maddelerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda sefuroksim, nistatin ve flukonazol'ün sitotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 74. Standart antimikrobiyal maddelere ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Maddeler	$İK_{50}$
Sefuroksim	359.5
Nistatin	83.95
Flukonazol	> 500

Uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerlerin **Çizelge 75**'te verilmiştir ve uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri bu maddelerin farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırılarak sitotoksisiteleri yorumlanmıştır. Buna göre mandalina ve mandalina uçucu yağının *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonları farklı suşları öldürdükleri konsantrasyonlardan daha düşük değerlerde WS1 hücrelerini öldürmüşlerdir. Dolayısıyla antimikrobiyal etkinlik gösterdikleri dozlarda mandalina uçucu yağı ve fraksiyonlarının sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur.

Çizelge 75. *Citrus reticulata* uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Uçucu yağ ve fraksiyonları	$İK_{50}$
M	100.07
M-H	138.14
M-DE	327.41

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter

Uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 76**'da verilmiştir. Buna göre bu kombinasyonlara ait $İK_{50}$ değerleri uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının farklı suşlara ait MİK değerleri ile karşılaştırıldığında bu kombinasyonların aditif veya sinerjik antimikrobiyal aktivite gösterdiği konsantrasyonlardan daha yüksek değerlerde WS1 hücrelerini öldürdüğü belirlenmiştir. Kombinasyonlar kullanıldıkları en yüksek konsantrasyonlarda bile WS1 hücrelerine karşı % 50 inhibisyon oranına ulaşmamıştır. Buna bağlı olarak kombinasyonların $İK_{50}$ değerlerinin uygulandıkları en yüksek konsantrasyondan daha büyük değerler olacağı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 76. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonları ile yapılan kombinasyonlarana ait $İK_{50}$ değerleri (µg/mL)

Kombinasyonlar	$İK_{50}$
M + NS	40+8 <
M-H+ NS	40+8 <
M-H +SEF	40+32 <
M-DE+ FLU	640+0.25
M-DE+ NS	512+0.8

M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; SEF: Sefuroksim, NS: Nistatin, FLU: Flukonazol

Çalışılan 5 kombinasyonun aditif/sinerjik antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda uçucu yağ / standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının insan cilt fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur.

Aliivibrio fischeri Toksisite Test Sonuçları

Toplam 35 sinerjik ve aditif etki elde edilen *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarına ait kombinasyon çalışmalarında aynı konsantrasyonlar elimine edilmiş ve sadece klinik dirençli suşlardan sinerjik ve aditif etki elde edilen bazı kombinasyonlar *A. fischeri* suşuna karşı değerlendirilmiştir. Metanol fraksiyonunda verim az olduğundan toksisite testi açısından değerlendirilmemiştir. *C. reticulata* uçucu yağının ana bileşikleri limonen ve *γ*-terpinen maddeleri de toksisite açısından değerlendirilmiştir (**Çizelge 77**).

Toksisite ölçümleri 5., 15. ve 30. dk'da alınmış ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır ve % inhibisyon grafiği çizilmiştir (**Şekil 31**).

Çizelge 77. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının toksisite % inhibisyon sonuçları

Kombinasyonlar (µg/ml)	% inhibisyon		
	5. dk	**15.dk**	**30.dk**
M+SEF (320+32)	28.59	18.17	27.44
M+TCY (320+64)	37.02	37.37	36.48
M+NS (10+2)	8.24	9.33	9.34
M-H+AMP (640+0.5)	25.17	26.54	42.60
M-H+SEF (10+8)	51.17	37.55	45.37
M-H+TCY (320+128)	38.59	29.34	29.03
M-H+NS (10+2)	15.54	14.83	14.53
M-H+FLU (160+0.06)	47.97	41.82	48.71
M-DE+SEF (160+32)	54.08	40.86	31.75
M-DE+TCY (160+64)	45.03	34.16	17.91
M-DE+FLU (160+0.06)	45.69	35.15	39.24
M-DE+NS (160+0.25)	48.18	42.75	47.22
Limonen (320 µg/mL)	94.04	95.39	95.51
***γ*-terpinen (320 µg/mL)**	97.83	98.42	98.84
$K_2Cr_2O_7$ (4 mg/ L)	**74.3**	**77.30**	**79.40**

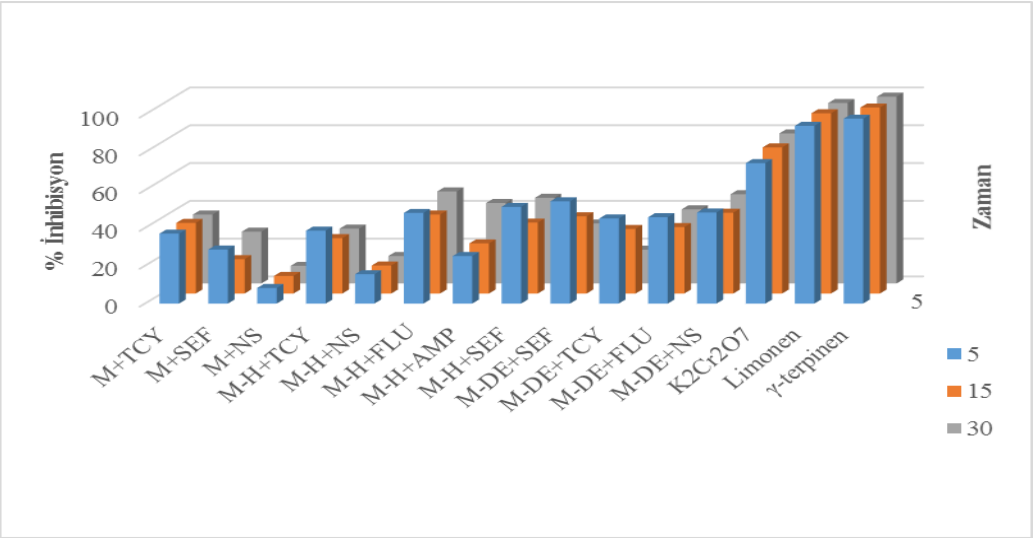
M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; SEF:Sefuroksim, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin

Citrus reticulata uçucu yağı ve ana bileşiklerinin *Aliivibrio fischeri* suşuna karşı toksisite çalışmalarıyla ilgili literatürde herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Elde edilen bulgular *A. fischeri* şusuna karşı ilk kez çalışılmasının yanısıra uçucu yağ kombinasyonlarının ve bazı uçucu ana bileşiklerin toksisiteleri ile ilgili bilgi vermesi açısından önem taşımaktadır.

C. reticulata uçucu yağının antimikrobiyal maddeler ile sinerjik /aditif etkinlik gösterdiği konsantrasyonlarda genel olarak *A. fischeri* suşunu düşük oranda inhibe etmiştir.

C. reticulata uçucu yağının *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının antimikrobiyal maddeler ile kombinasyonlarında orta derecede inhibisyonlara neden olduğu görülmüştür (% 14.53-48.71). Uçucu yağa ait ana bileşikler; limonen ve *γ*-terpinen'nin ise tek başlarına % 90'nın üzerinde inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir.

Şekil 31'de uçucu yağ ve fraksiyonlarının antimikrobiyal maddeler ile yapılan kombinasyonlarının *A. fischeri* suşuna karşı karşılaştırmalı ve grafiksel gösterimi yer almaktadır.



Şekil 31. ***Citrus reticulata*** **uçucu yağ kombinasyonların** ***A. fischeri*** **% inhibisyon sonuçları**

C. reticulata uçucu yağına ait literatürdeki toksisite bulgularında, uçucu yağın ve ana bileşiği limonen, insan akciğer adenokarsinoma A549 ve hepatokarsinoma HepG2 tümor hücrelerine karşı MTT yöntemi sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Uçucu yağ ve limonen her iki hücre türüne karşı büyümeyi güçlü oranda doza bağımlı olarak inhibe etmiştir. Uçucu yağın A549 hücrelerine karşı HepG2 hücrelerinden daha etkili olduğu aynı şekilde etkisinin limonenden daha fazla olduğu bildirilmiştir (Manassero ve ark., 2013).

C. reticulata uçucu yağının *Tetranychus urticae* Koch ve *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot türlerinin yumurta ve erginlerine karşı kağıt difüzyon yöntemiyle toksisite testi yapılmıştır. Uçucu yağın *T. urticae* türüne karşı 19 x10^3 µl/ml havada 60 % ölüme neden olduğu bildirilmiştir. *P. persimilis* türüne karşı orta derecede toksik etki göstermiştir (Choi ve ark., 2004). Bir diğer çalışmada uçucu yağın fumigasyon testi ile *Lycoriella ingenua* (Dufour) (Diptera: Sciaridae) türünün larvalarına karşı insektisidal etkisi araştırılmıştır, yağın % 90 oranında insektisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (Park ve ark., 2008).

Uçucu yağın böcek kovucu etkisi *Sitophilous oryzae* ve *Tribolium castaneum* türleri üzerine araştırılmış, iki türe karşı da düşük kovucu etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Mishra ve Tripathi, 2011).

D-limonen ile ilgili olarak akut ve sub-akut toksisite çalışmalarında şu bilgilere ratlanılmıştır: 1990 yılında Ulusal Toksikoloji Programı, 413-6600 mg /kg arasında değişen günlük dozlarda d-limonenin sıçan ve farelerde 3 hafta boyunca 5 gün uygulama suretiyle toksisitesi incelenmiştir. Madde ile ilgili günlük <1650 mg /kg alınan dozlarda toksisite belirtisine rastlanılmadığı rapor edilmiştir (National Toxicology Program, 1990).

D-limonen için oral LD_{50} değeri erkek ve dişi farelerde 5.6 ve 6.6 g/kg, vücut ağırlığı olarak belirlenirken; sıçanlarda LD_{50} değerinin dişilerde 4.4 g/kg, erkeklerde 5.1 g/kg olduğu rapor edilmiştir (Sun, 2007).

Melanoma hücrelerinde D-limonenin IK_{50}= 450 μM olarak bulunmuştur (He ve ark.,1997).

D-limonen ile ilgili kronik toksisite çalışmalarında ise, 2 yıl süre ile dişi sıçanlara günlük 600 mg/kg verildiğinde kontrol gruplarına göre önemli ölçüde daha az yaşadıkları gözlenmiş, erkek sıçanlarda ise mikroskobik bulgularda madde ile ilgili olarak nefropatinin oluştuğu rapor edilmiştir (National Toxicology Program, 1990).

D-limonenin *Salmonella typhimurium* 4 farklı suşuna karşı TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 mutajenik etki gözlenmemiştir (Sun, 2007).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Uçucu yağların birçok farklı mikroorganizma türüne karşı farklı etki mekanizmalarına sahip olmaları içermiş oldukları kompleks madde karışımlarının herbirinin hücrede farklı etki oluşturabilmesinden kaynaklanabilmektedir. Bu özellik uçucu yağlara, standart antimikrobiyal maddelere göre avantaj sağlayabilmektedir. Aynı zamanda mikroorganizmaların bu şekilde kompleks karışımlara karşı direnç geliştirmesi de zor olmaktadır. Bu sebeple uçucu yağ ve antibiyotik/antifungal madde kombinasyonları aktivitenin artmasına olanak sağlayacağı gibi mikroorganizmalarda meydana gelen çoklu ilaç direnç gelişimlerine karşı alternatif uygulama olması açısından önem taşımaktadır (Kon ve Rai, 2013).

Bu tez kapsamında Farmakope kalitesinde *Matricaria recutita, Lavandula latifolia, Pinus mugo* ve *Citrus reticulata* uçucu yağ, fraksiyonları ve limonen, (+) linalol, 1,8-sineol, (±)-kafur, *β*-karyofillen, *α*-pinen, (-)-*β*-pinen, *γ*-terpinen ve (+)-3-karen ile birlikte standart maddelerden ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatinin antimikrobiyal kombinasyon çalışmaları araştırılmıştır. Kombinasyon çalışmaları standart ve dirençli klinik suşları içeren *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve duyarlı *Candida albicans* olmak üzere 6 farklı mikroorganizmaya karşı yapılmıştır.

Uçucu yağların ana bileşiklerine göre daha güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Burt, 2004). Fakat aynı zamanda uçucu yağların içeriğindeki minör bileşiklerin de ana bileşikler gibi kombinasyon çalışmalarında kritik öneme sahip oldukları bu nedenle ana bileşiklerin ve minör bileşiklerin birlikte kullanımının sinerjik etkiyi arttıracağı belirtilmiştir (Burt, 2004). Bu sebeple tez kapsamında bir sonraki aşamada, aktif fraksiyonları belirlemek amacıyla apolar, orta polarite ve polar olmak üzere vakum kolon kromatografisi kullanılarak uçucu yağlar sırası ile *n*-hekzan, dietil eter, diklorometan ve metanol ile fraksiyonlanmıştır. İlk kez bir uçucu yağa ait fraksiyonların standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışmaları yapılmış ve aktif fraksiyonlar belirlenmiştir.

Sinerjik etki elde edilen kombinasyon sonuçları çalışılan farklı mikroorganizmalara **Çizelge 78**, **Çizelge 79** ve **Çizelge 80**'de karşı listelenmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının kombinasyonunun yapıldığı standart maddeler ampisilin, sefuroksim, tetrasiklin, flukonazol ve nistatin ile farklı suşlara karşı antimikrobiyal etkinlikleri de farklı şekillerde olmuştur. Kombinasyon sonuçlarında sinerjik etki daha çok *S. aureus* türüne karşı elde edilmiştir. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının özellikle Gr (+) *S. aureus* türüne karşı Gr (-) *E. coli* türünden daha etkili olmasının nedeninin hücre duvarı yapısındaki farklılıktan kaynaklandığı söylenebilir.

Çizelge 78'de görüldüğü üzere tez kapsamında çalışılan *L. latifolia* uçucu yağ fraksiyonlarının standart maddeler ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile kombinasyonlarında *S. aureus* suşuna karşı sinerjik etki göstermesi açısından en etkili fraksiyonlar olarak belirlenmiştir. *L. latifolia* uçucu yağı ampisilin, sefuroksim ve tekrasiklin ile kombinasyonlarında *S. aureus* suşlarına karşı ise bağımsız etkili sonuç vermiştir. Yani uçucu yağın fraksiyonlanması ile birlikte kombinasyonlardaki etkinin arttığı söylenebilir.

Uçucu yağ fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivite sonuçlarında tek başına elde edilen MİK değerleri 640 ve 1280 µg/mL iken, kombinasyon çalışmalarında MİK değerlerinin 1.25, 10, 20 ve 80 µg/mL konsantrasyonlara inmesi önemli bir bulgu olarak görülmüştür.

Çizelge 78. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu yağ		Standart madde		
		*T	**K	T	K	FİKİ
P+AMP	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	16	2.0	0.37
P+TCY	*S. aureus*ATCC 6538	640	10	4.0	1.0	0.26
P-H+AMP	*S. aureus* kl.izol.	640	40	>128	64	0.31
P-H+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	160	32	0.125	0.25
P-DE+AMP	*S. aureus* kl.izol.	640	10	128	2.0	0.031
P-DE+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	2.5	32	0.25	0.011
P-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	320	5.0	1.0	0.25	0.26
P-DM+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	2.5	32	0.25	0.011
SL-H+AMP	*S. aureus* kl.izol.	1280	320	64	2.0	0.28
SL-DE+AMP	*S. aureus* kl.izol.	640	80	64	16	0.375
SL-DE+SEF	*S. aureus* kl.izol.	640	20	64	4.0	0.093
SL-DE+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	>64	32	0.5
SL-DE+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	1.25	16	0.25	0.017
SL-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	2.0	0.5	0.26
SL-DM+AMP	*S. aureus* kl.izol.	640	160	64	8.0	0.375
SL-DM+SEF	*S. aureus* kl.izol.	640	20	64	4.0	0.093
SL-DM+SEF	*S. aureus* ATCC 6538	640	160	>64	32	0.5
SL-DM+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	1.25	16	0.25	0.017
SL-DM+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	80	2.0	0.5	0.375
BÇ+SEF	*S. aureus* kl.izol.	1280	10	>64	8.0	0.070
BÇ-H+AMP	*S. aureus* kl.izol.	640	10	64	4.0	0.078
BÇ-H+SEF	*S. aureus* kl.izol.	640	160	128	32	0.50
BÇ-H+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	80	64	4.0	0.18
BÇ-DE+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	80	64	8.0	0.25
BÇ-M+AMP	*S. aureus* kl.izol	640	160	64	4.0	0.31
M+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	4.0	0.5	0.14
M-H+SEF	*S. aureus* kl.izol.	1280	80	32	8.0	0.31
M-H+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	80	4.0	0.5	0.25
M-DE+TCY	*S. aureus* kl.izol.	640	80	64	16	0.37
M-DE+TCY	*S. aureus* ATCC 6538	640	10	4.0	0.5	0.14

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *n*-hekzan, P-DE: dietil eter, P-DM: diklorometan fraksiyonları, SL : *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H: *n*-hekzan, SL-DE : dietil eter, SL-DM : diklorometan, BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan, BÇ-DE: dietil eter; BÇ-M: methanol; M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri

Matricaria recutita uçucu yağının ve fraksiyonlarının ise standart maddeler ampisilin ve tetrasiklin ile kombinasyon sonuçlarında *S. aureus* suşuna karşı benzer sinerjik etki verdiği görülmüştür. Bu nedenle uçucu yağın fraksiyonlarına ayrılmadan da kullanılabileceği görülmektedir. *Pinus mugo* uçucu yağı *n*-hekzan fraksiyonunun ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile kombinasyonlarında en etkili fraksiyon olarak bulunmuştur. *Citrus reticulata* uçucu yağı ile uçucu yağın *n*-hekzan ve dietil eter fraksiyonlarının tetrasiklin ile kombinasyonunda benzer antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle uçucu yağın fraksiyonlarına ayrılmadan da kullanılabileceği görülmektedir.

Çizelge 79'da tez materyallerinin *E. coli* suşlarına karşı elde edilen kombinasyon sonuçları verilmiştir. *M. recutita* uçucu yağının sadece tetrasiklin ile kombinasyonunda *E. coli* standart suşuna karşı sinerjik etki elde edilmiştir. *L. latifolia* uçucu yağ fraksiyonlarının *E. coli* suşlarına karşı en etkili sonuçlar verdiği görülmektedir. *P. mugo* uçucu yağının özellikle *n*-hekzan fraksiyonunun tüm standart maddeler ile kombinasyonunda *E. coli* suşlarına karşı sinerjik etki görülmüştür. *Citrus reticulata* uçucu yağı ve fraksiyonlarının ise benzer etkiyi gösterdiği görülmektedir. Kombinasyon çalışmalarında genel olarak uçucu yağların tek başlarına MİK değerlerinin 2560 µg/mL ve 640 µg/mL iken, kombinasyonlarda MİK dğerlerinin 10 µg/mL kadar inmesi önemli bir bulgudur. Aynı şekilde standart maddelerin dirençli klinik izolatta gözlenen yüksek MİK değerlerinin ampisilin ve sefuroksim için 64 µg/mL'den, 4 µg/mL'ye ve tetrasiklin için 32 µg/mL'den 1 µg/mL'ye düşmesi önemli bir bulgu olarak görülmektedir.

Çizelge 79. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Escherichia coli* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri

Kombinasyon	Bakteri	Uçucu yağ		Standart Madde		
		*T	**K	T	K	FİKİ
P+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	80	4.0	1.0	0.37
SL-DE+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	20	64	4.0	0.093
SL-DE+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	>64	32	0.5
SL-DE+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	160	16	0.25	0.26
SL-DM+SEF	*E. coli* kl.izol.	640	20	64	4.0	0.093
SL-DM+SEF	*E. coli* ATCC 8739	640	160	>64	32	0.5
SL-DM+TCY	*E. coli* kl.izol.	640	160	16	0.25	0.26
BÇ-H+AMP	*E. coli* kl.izol.	2560	640	64	4.0	0.31
BÇ-H+SEF	*E. coli* kl.izol.	2560	10	64	16	0.25
BÇ-H+TCY	*E. coli* kl.izol.	2560	640	32	1.0	0.28
BÇ-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	1.0	0.25	0.26
M+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	160	4.0	0.5	0.37
M-H+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	20	4.0	0.5	0.15
M-DE+TCY	*E. coli* ATCC 8739	640	10	4.0	0.5	0.15

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı, SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H : *n*-hekzan, SL-DE : dietil eter, SL-DM : diklorometan, BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *n*-hekzan; M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, M-DE: dietil eter; AMP: Ampisilin; SEF: Sefuroksim; TCY: Tetrasiklin, *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri

Çizelge 80'de tez materyallerinin *C. albicans* suşlarına karşı elde edilen kombinasyon sonuçları verilmiştir. *Candida* suşlarına karşı *M. recutita* uçucu yağı flukonazol ile kombinasyonunda fraksiyonlarına göre daha güçlü etki göstermiştir. Özellikle *Candida* türlerine karşı denenecek kombinasyon çalışmalarında uçucu yağın fraksiyonlanmadan daha etkili sonuçlar verdiği görülmektedir. *P. mugo* uçucu yağ ve fraksiyonlarının standart flukonazol ve nistatin ile kombinasyonlarında sinerjik etki gözlenmemiştir. *C. reticulata* uçucu yağ ve *n*-hekzan fraksiyonunun özellikle nistatin ile kombinasyonunda sinerjik etki elde edilmiştir. *M. recutita, L. latifolia* ve *P. mugo* uçucu yağları ise flukonazol ile sinerjik etkiyi vermiştir.

Çizelge 80. Uçucu yağ ve fraksiyonlarının *Candida albicans* suşlarına karşı sinerjik etki FİKİ değerleri

Kombinasyon	Maya	Uçucu yağ		Standart Madde		
		*T	**K	T	K	FİKİ
P+FLU	*C. albicans* kl. izolat	320	20	1.0	0.25	0.31
P+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	40	1.0	0.25	0.37
SL-H+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	80	32	8.0	0.50
SL-H+FLU	*C. albicans* kl. izolat	320	40	64	8.0	0.25
SL-DE+FLU	*C. albicans* ATCC 90028	320	40	32	8.0	0.25
SL-DE+FLU	*C. albicans* kl.izolat	320	40	64	8.0	0.25
SL-DM+FLU	*C. albicans* kl. izolat	320	40	64	8.0	0.25
M +NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	10	8.0	2.0	0.28
M+NS	*C. albicans* kl. izolat	320	10	8.0	2.0	0.28
M-H+NS	*C. albicans* ATCC 90028	320	10	8.0	2.0	0.28
M-H+NS	*C. albicans* kl. izolat	320	10	8.0	2.0	0.28

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı, SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı, SL-H : *n*-hekzan, SL-DE : dietil eter, SL-DM : diklorometan, M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *n*-hekzan, FLU: Flukonazol, NS: Nistatin; *T: Tek başına MİK değeri; **K: Kombinasyondaki MİK değeri

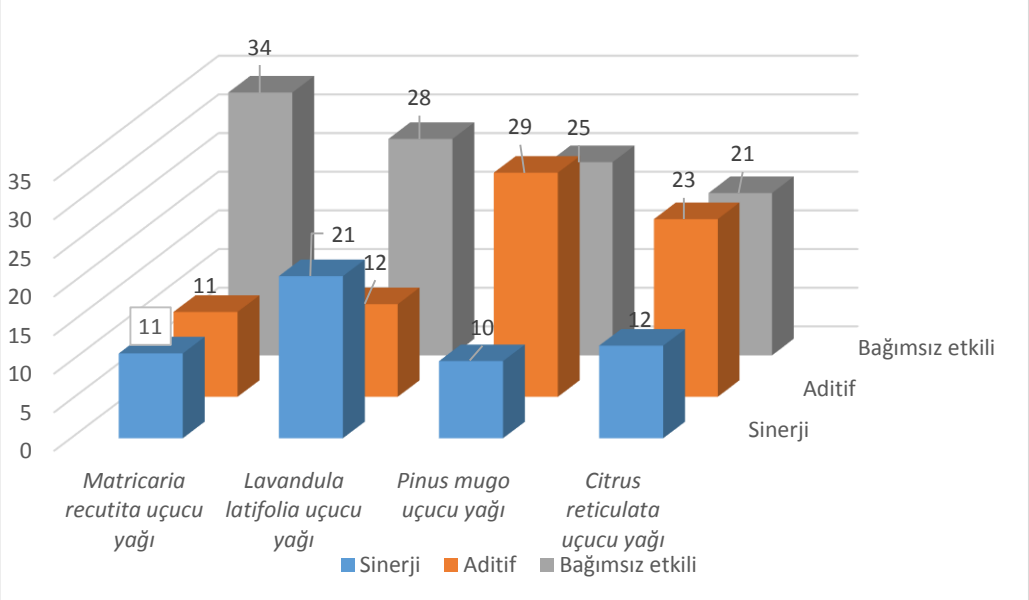
α-Pinen, *β*-pinen, limonen ve *β*-karyofillen uçucu bileşikleri sadece klinik dirençli *S. aureus* ve *E. coli* suşlara karşı kombinasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu maddelerin özellikle *S. aureus* suşuna karşı sinerjik etkili sonuçlar verdikleri gözlenmiştir (**Çizelge 81**). *E. coli* suşuna karşı kombinasyonlarında daha çok bağımsız etkili sonuçlar elde edilmiştir. 1,8-sineol, kafur ve linalol ile standart maddeler ampisilin, sefuroksim ve tetrasiklin ile kombinasyon çalışmalarının aditif etkili oldukları bulunmuştur.

Çizelge 81. Uçucu bileşiklerin klinik *Staphylococcus aureus* suşlarına FİKİ değerleri

Kombinasyon	Uçucu bileşik		Standart Madde		
	*T	**K	T	K	FİKİ
α-Pinen+TCY	640	10	0.5	0.125	0.26
β-Pinen +TCY	2560	160	0.5	0.125	0.31
Limonen+AMP	640	80	32	4.0	0.25
Limonen+TCY	640	10	0.5	0.125	0.26
β-Karyofillen+AMP	2560	640	32	1.0	0.28
β-Karyofillen+TCY	2560	40	0.5	0.125	0.26
Kafur+TCY	1280	20	0.5	0.125	0.26

Dört uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait toplam 258 adet kombinasyon çalışması deneysel olarak yapılmıştır. Sonuç olarak 55 adet sinerjik, 75 adet aditif ve 108 adet bağımsız etkili kombinasyon elde edilmiştir. Kombinasyon çalışmalarında sadece *L. latifolia* uçucu yağının ampisilin ile kombinasyonunda klinik *S. aureus* suşuna karşı antagonist etki gözlenmiştir. Genel olarak uçucu yağlarda antagonist etkiye rastlanılmaması günümüzde direnç gösteren mikroorganizmalara karşı doğal ilaç hammaddesi ve kombinasyon olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Tez çalışmaları kapsamında çucu yağlara ait antimikrobiyal kombinasyon çalışmalarının dağılımı **Şekil 32'**deki grafik ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 32. Uçucu yağlara ait karşılaştırmalı genel antimikrobiyal kombinasyon dağılımı

Kaynak taramalarımızda rastladığımız 2003 yılından bugüne çeşitli uçucu yağlar ve saf monoterpen yapısındaki bileşikler ile antibiyotik ve antifungal olarak kullanılan ilaç hammaddelerinin kombinasyon çalışmaları 58 kadardır. Bu çalışmalar **Çizelge 5** ve **Çizelge 6**'da özetlenmiş ancak sonuçlar çok fazla sayısal değerle ifade edilebileceğinden çizelgelerde sonuçlara yer verilmemiştir. Bu tez kapsamında materyal olarak kullanılan uçucu yağ ve terpenik bileşikler ile benzer kombinasyonlara kaynaklarda rastlanılmadığından **Çizelge 5** ve **Çizelge 6** ile karşılaştırma yapılamamıştır.

Tez kapsamında uçucu yağ ve fraksiyonlarının aktif ve sinerjik etkili olarak bulunan kombinasyonları ilk kez sağlıklı insan cilt fibroblast hücre dizilerinde XTT yöntemi ile değerlendirilmiştir (**Çizelge 27-45-60-76**). Buna göre uçucu yağ ve fraksiyonlarına ait $İK_{50}$ değerleri **Çizelge 82'**de verilmiştir.

Çizelge 82 Uçucu yağ ve fraksiyonlarının WS1 hücrelerine ait $İK_{50}$ değerleri

Uçucu yağ ve fraksiyonları	$İK_{50}$
P	92.54
P-H	115.32
P-DE	129.52
SL	> 500
SL-H	116.93
SL-DE	228.77
BÇ	64.75
BÇ-H	116.73
BÇ-DE	229.28
M	100.07
M-H	138.14
M-DE	327.41

P: *Matricaria recutita* uçucu yağı; P-H: *Matricaria recutita* uçucu yağı n-hekzan fraksiyonu; P-DE: *Matricaria recutita* uçucu yağı dietil eter fraksiyonu; SL: *Lavandula latifolia* uçucu yağı; SL-H: *Lavandula latifolia* uçucu yağı n-hekzan fraksiyonu; SL-DE: *Lavandula latifolia* uçucu yağı dietil eter fraksiyonu; BÇ: *Pinus mugo* uçucu yağı; BÇ-H: *Pinus mugo* uçucu yağı n-hekzan fraksiyonu; BÇ-DE: *Pinus mugo* uçucu yağı dietil eter fraksiyonu; M: *Citrus reticulata* uçucu yağı; M-H: *Citrus reticulata* uçucu yağı n-hekzan fraksiyonu; M-DE: *Citrus reticulata* uçucu yağı dietil eter fraksiyonu

WS1 hücrelerine karşı en az toksik etkiye sahip uçucu yağ sırası ile *L. latifolia* > *C. reticulata* > *M. recutita* > *P. mugo* olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağ fraksiyonlarında farklı madde gruplarının bulunması toksisite $İK_{50}$ değerlerinin de farklı olmasına neden olmuştur. Bu nedenle uçucu yağda bulunan madde gruplarına göre toksik etkinin de değiştiği söylenebilir. Aditif/sinerjik antimikrobiyal etkinlik gösterdiği dozlarda uçucu yağ/standart antimikrobiyal madde ve uçucu yağ fraksiyonu/standart antimikrobiyal madde kombinasyonlarının insan cilt fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkili olmadığı bulunmuştur.

Ayrıca aktif kombinasyonların ilk kez *A. fischeri* suşuna karşı çalışılarak toksisite bulguları değerlendirilmiştir (**Çizelge 28-46-61-77**). Tez kapsamında seçilen uçucu yağların bu suşa karşı *in vitro* toksisite değerlendirmesi ilk olması açısından literatüre önemli katkı sağlayacaktır. Elde edilen toksisite bulgularında genel olarak konsantrasyona bağlı olarak inhibisyon etkisinin arttığı görülmüştür.

Uçucu yağ /uçucu yağ fraksiyonları + antimikrobiyal madde kombinasyonlarının toksik etkisinin en fazla *L. latifolia* > *M. recutita* > *C. reticulata* > *P. mugo*'da olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz preklinik anlamdaki *in vitro* sonuçlar *in vivo* ve klinik çalışmalara zemin oluşturması açısından önem taşımaktadır. Bundan dolayı, doğal madde kombinasyon araştırmalarına devam edilmesi önerilmektedir.

Doğal ürünler, uçucu yağlar ve farklı standart antimikrobiyal maddeler ile kombinasyon çalışmalarının farklı mikroorganizmalara karşı araştırılması yeni bulgular elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Daha spesifik mikroorganizma hedefleri değerlendirilebilir. Örneğin; ağız patojenlerinden *Streptecoccus mutans, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium* türleri vb. birçok tür ile aynı şekilde cilt patojenleri olan; *Candida, Staphylococcus, Propionibacterium, Aspergillus* ve *Malassezia, Mycobacterium* türlerine karşı çeşitli kombinasyon tasarımları yapılabilir. Böylelikle mikroorganizmalarda antimikrobiyal maddelere karşı oluşan direnç gelişimine karşı uçucu yağların etkinliğinden yararlanılabilir.

KAYNAKLAR

Abbasoğlu, U., Çevikbaş, A., Antimikrobiyal ajanlar, In: Farmasötik Mikrobiyoloji, U. Abbasoğlu, F. Onurdağ Kaynak (Eds.), Efil Yayıncılık, Ankara, 85-87 (2011).

Abdel-Aziz, M. M., Synergism between clotrimazole and cinnamon oil: An effective (weapon) drug *in vitro* and *in vivo* against some multi drug resistant dermatophytes, Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 4 (1), 69-83 (2012).

Abdoul-Latif, F. M., Nabil, M., Edou, P., Ali, A. A., Djama, S. O., Obame, L. C., Bassole, I., Mamoudou, H., Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Matricaria chamomilla* L. from Djibouti, J. Med. Plants Res., 5 (9), 1512-1517 (2011).

Ali, E.M., Phytochemical composition, antifungal, antiaflatoxigenic, antioxidant, and anticancer activities of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Matricaria chamomilla* L. essential oils, J. Med. Plants Res., 7 (29), 2297-2207 (2013).

Altıntop, M.D, Özdemir A., Turan-Zitouni G., Ilgın S., Atlı Ö., Işcan G., Zafer Kaplancıklı Z.A, Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents, Eur. J. Med. Chem., 58, 299-307 (2012).

Al-Jabr, A.M., Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (*Coleoptera: Silvanidae*) and *Tribolium castaneum* (*Coleoptera: Tenebrioidae*), SJKFU, 7 (1) 1427H (2006).

Ahmad, A., Khan, A., Khan, L. A., Manzoor, N., *In vitro* synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates, J. Med. Microbiol., 59 (10), 1178-11840 (2010).

Ahmad, A., Van Vuuren, S., Viljoen, A., Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils-the case of *Thymus vulgaris* (Thyme), Molecules, 19 (3), 2896-2910 (2014).

Alatrache, A., Jamoussi, B., Tarhouni, R., Abdrabba, M., Analysis of the essential oil of *Lavandula latifolia* from Tunisia, J. Essent. Oil Bear. Pl., 10 (6), 446-452 (2007).

Aleksic, V., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Nedeljkovic, N. S., Knezevic, P., Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates, Phytomedicine, 21 (12), 1666-1674 (2014).

Alireza, M., Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils of chamomile from Neyshabur, Iran, J. Med. Plants Res. 6 (5), 820-824 (2012).

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. A., Nikhat, M., Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole, Phytomedicine, 17 (12), 921-925 (2010).

Amsterdam, D., Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media, In Antibiotics in Laboratory Medicine, Fourth Edition, V. Lorian (Ed.), 52-111, Williams & Wilkins, Baltimore (1996).

Anderson, R. J., W., G. P., Todd, A., Worsley, A. J., Antibacteriel Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications, United Kingdom: John Wiley&Sons, Ltd., 2012.

Astani, A., Schnitzler, P., Antiviral activity of monoterpenes *beta*-pinene and limonene against herpes simplex virus *in vitro*, Iran J. Microbiol., 6 (3), 149 (2014).

Ayoola, G., Johnson, O., Adelowotan, T., Aibinu, I., Adenipekun, E., Adepoju-Bello, A., Coker, H., Odugbemi, T., Evaluation of the chemical constituents and the antimicrobial activity of the volatile oil of *Citrus reticulata* fruit (Tangerine fruit peel) from South West Nigeria., Afr. J. Biotechnol., 7 (13), 2227-2231 (2008).

Babar, A., Naser Ali, A.W, Saiba, S., Aftab, A., Shah Alam, K., Firoz, A., Essential oils used in aromatherapy: A systemic review, Asian. Pac. S. Trop. Biomed., 5 (8), 601-611 (2015).

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils–a review, Food Chem. Toxicol., 46 (2), 446-475 (2008).

Barazandeh, M., Essential oil composition of *Lavandula latifolia* Medik from Iran, J. Essent. Oil Res., 14 (2), 103-104 (2002).

Barbosa, L. N., Probst, I.S, Andrade, B.F.M.T., Alves, F.C.M., Albano, M., Cunha, M. L.R.S., Doyama, J.T., Rall, V. L. M., Junior, A. F., *In vitro* Antibacterial and chemical properties of essential oils including native plants from Brazil against pathogenic and resistant Bacteria, J. Oleo Sci., 64 (3), 289-298 (2015).

Bassole, I. H. N., Juliani, H. R., Essential oils in combination and their antimicrobial properties, Molecules, 17 (4), 3989-4006 (2012).

Bassole, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebie, R. C., Dicko, M. H., Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination, Molecules, 15 (11), 7825-7839 (2010).

Brahim, M.A.S., Fadli, M., Hassani, L., Boulay, B., Markouk, M., Bekkouchea, K., Abbad, A., Ali, M.A., Larhsini, M., *Chenopodium ambrosioides var. ambrosioides* used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics, Ind. Crop. Prod. 71, 37-43 (2015).

Başer, K.H.C., Buchbauer, G., Handbook of Essential oils: Science, Technology, and Applications. CRC Press (2010).

Berenbaum, M., Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review, Clin. Exp. Immunol., 28 (1), 1 (1977).

Böhme, K., Barros-Velazquez, J., Calo-Mata, P., Aubourg, S. P., Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: mechanisms and applications In: Antimicrobial Compounds, T. G. Villa, P. Vegia-Crespo, Springer Berlin Heidelberg, 51-81 (2014).

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, Int. J. Food Microbiol., 94, 223-253 (2004).

Cavanagh, H. M.,Wilkinson, J. M., Biological activities of lavender essential oil Review, Phytother. Res., 16 (4), 301-308 (2002).

Changming, Z., Zhanggen, H., Xiaohang, Z., Column liquid chromatography, In: Chromatography and Its Applications, S. Dhanarasu (Ed.), InTech, China (2012).

Cepae, B. A., WHO monographs on selected medicinal plants: Geneva: World Health Organization (1999).

Chanthaphon, S., Chanthachum, S., Hongpattarakere, T., Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms, Warasan Songkhla Nakharin., 30 (1), 125 (2008).

Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K., Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils, Flavour. Frag. J., 23 (6) 444-449 (2008).

Charlier, C., Hart, E., Lefort, A., Ribaud, P., Dromer, F., Denning, D., Lortholary, O., Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years?, J. Antimicrob. Chemother., 57 (3), 384-410 (2006).

Chen, W., Vermaak, I., Viljoen, A., Camphor-A Fumigant during the black death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon-A Review, Molecules, 18, 5434-5454 (2013).

Choi, W. I., Lee., S. G., Park, H. M., Ahn, Y. J., Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae), J. Econ. Entomol., 97 (2), 553-558 (2004).

Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Oh, Y.C., Chae, H.S., Jang, H.J., Shin, D.-W., Kwon, D.Y., Antibacterial activity of methyl gallate isolated from Galla rhois or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria, Molecules, 14 (5), 1773-1780 (2009).

Choi, S. H., Activity of essential oil from *Mentha piperita* against some antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains and its combination effects with antibiotics. Nat. Prod. Sci., 13 (2), 85-89 (2007).

Chu, C. J., Kemper, K. J. Lavender (*Lavandula* spp.), Longwood Herbal Task Force, 32 (2001).

Chung, E. Y., Byun, Y. H., Shin, E. J., Chung, H. S., Lee, Y. H., Shin, S. Antibacterial effects of vulgarone B from *Artemisia iwayomogi* alone and in combination with oxacillin, Arch. Pharm. Res., 32 (12), 1711-1719 (2009).

Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M., Sarma, T., Boruah, P., Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India, LWT-Food Sci. Technol., 42 (3), 777-780 (2009).

Civitelli, L., Panella, S., Marcocci, M. E., De Petris, A., Garzoli, S., Pepi, F., Vavala, E., Ragno, R., Nencioni, L., Palamara, A. T., *In vitro* inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide, Phytomedicine, 21 (6), 857-865 (2014).

Cooke, B., Ernst, E., Aromatherapy: A Systematic Review., Br. J. Gen. Pract., 50 (455), 493-496 (2000).

Chey, W. D., Wong, B. C., Practice parameters committee of the American college of gastroenterology. American college of gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection, Am. J. Gastroenterol., 102, 1808-1825 (2007).

Chopra, I., Roberts, M., Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65, 232–260 (2001).

Clinical and Laboratuary Standarts Institute (CLSI) (Formerly, NCCLS) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA (2006).

Clinical and Laboratuary Standarts Institute (CLSI) (Formerly, NCCLS) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Approved Standard, M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA (2002).

Das, K., Tiwari, R. K. S., Shrivastava, D. K, Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends, J. Med. Plant. Res. 4 (2), 104-111, 118 (2010).

Das, D. R., Sachan, A. K., Shuaib, M., Imtiyaz, M., Chemical charecterization of volatile oil components of *Citrus reticulata* by GC-MS analysis. Nitric oxide, 1 (1), 243 (2014).

De Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., Van Vuuren, S., The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils., J. Evid. Based Complement. Altern. Med., Article ID 852049, 1-10 (2013).

DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N., Chambers, H. F., Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet, 375 (9725), 1557-1568 (2010).

Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Third Edition, john Wiley &Sons Ltd, United Kingdom, 2009.

Dharmawan, J., Kasapis, S., Curran, P., Johnson, J. R. (2007). Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: freshly-squeezed juice, Flavour Frag. J., 22, 228–232 (2007).

Djouahri**,** A., Saka, B., Boudarene**,** L., Benseradj, F., Aberrane**,** S., Aitmoussa**,** S., Chelghoum, C., Lamari, L., Sabaou, N., Baaliouamer, A., *In vitro* synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents, Ind. Crop. Prod., 56, 60-66 (2014).

DiDomenico, B., Novel antifungal drugs, Curr. Opin. Microbiol., (2), 509-515 (1999).

Dixon, M.D., Walsh, T. J., Medical mycology In: Antifungal Agents, S. Baron (Ed.), Galveston (1996).

Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P. and Maffei, F. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate and linalool on human lymphocytes *in vitro*, Environ. Mol. Mutagen., 52, 69–71 (2011).

Domrachev, D.V., Karpova, E.V., Goroshkevic, S. N., Tkachev, A.V., Comparative analysis of volatiles from needles of five needle pines of Northern and Eastern Eurasia, Russ. J. Bioorg. Chem., 38, 780–789 (2012).

Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F., Domingues, F. C., Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, Phytomedicine, 19 (3-4), 236-238 (2012).

Eldahshan, O.A., Comparison of chemical and antimicrobial studies of Egyptian mandarin leaves and green branches volatile oils, European J. Med. Plants., 5 (3) 248-254 (2015).

Eliopoulos, G., Eliopoulos, C., Antibiotic combinations: should they be tested? Clin. Microbiol. Rev., 1 (2), 139-156 (1988).

Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Jr., Antibiotic synergism and antimicrobial combinations in clinical infections, Rev. Infect. Dis., 4 (2), 282-293 (1982).

Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Antimicrobial combinations. In: Lorian V ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th ed, Williams and Wilkins, Baltimore, MD USA; 432-49 (2000).

El-Hosseiny, L., El-Shenawy, M., Haroun, M., Abdullah, F., Comparative evaluation of the inhibitory effect of some essential oils with antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, J. Antibiot., 1-5 (2014).

Espina, L., Somolinos, M., Loran, S., Conchello, P., Garcia, D., Pagan, R., Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes, Food Control., 22 (6), 896-902 (2011).

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M., Hassani, L., Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics, Phytomedicine, 19 (5), 464-471 (2012).

Fadli, M., Bolla, J.M., Mezrioui, N.E., Pages, J.M., Hassani, L., First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riatarum* essential oil with conventional antibiotics, Ind. Crop. Prod., 61, 370–376 (2014).

Fanciullino, A. L., Tomi, F., Luro, F., Desjobert, J. M., Casanova, J., Chemical variability of peel and leaf oils of mandarins, Flavour Frag. J., 21 (2), 359-367 (2006).

Farnsworth, N. R., The role of ethnopharmacology in drug development In: Bioactive Compounds from Plants, D. J. Chadwick, J. Marsh (Eds.), England, Jonh Wiley & Sons, 1990.

Fayed, S. A. Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulate* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential oils, Res. J. Agric. Biol. Sci., 5 (5), 740-747 (2009).

Fernandez Alba, A. R., Guil, H., Lopez, G. D, Chisti, Y. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays, Anal. Chim. Acta, 451 (2), 195-202 (2002).

Franke, R., Schilcher , H., Chamomile : Industrial profiles, Taylor & Francis, Boca Raton, 289, 2005.

Gao, B., Chen, Y., Zhang, M., Xu, Y., Pan, S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of pericarpium *Citri reticulatae* essential oil, Molecules, 16 (5), 4082-4096 (2011).

Gawde, A., Cantrell, C.L., Zheljazkov, V.D., Astatkie, T., Schlegel, V., Steam distillation extraction kinetics regression models to predict essential oil yield, composition, and bioactivity of chamomile oil, Ind. Crop. Prod., 58, 61-67 (2014).

Geyik, M. F., Kökoğlu, Ö. F., Uçmak, H., Çelen, M. K., Hoşoğlu, S., Ayaz, C. Hastane kaynaklı Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, Hastane, 16 (2), 175-178 (2002).

Gilling, D., Kitajima, M., Torrey, J., Bright, K., Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus, J. Appl. Microbiol., 116 (5), 1149-1163 (2014).

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H., Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans* potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*, Phytother. Res., 18 (12), 990-995 (2004).

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Portugal, H., Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*, Phytother. Res., 20 (1), 58-61 (2006).

Godal, Q. F., Queiroz, E.F., Wolfender, J.L, Latest Developments in Assessing Antifungal Activity Using TLC-Bioautography: A Review, J. AOAC Int., 96 (6) (2013).

Gomes, M. D. S., Cardoso, M. D. G., Souza, P. E. D., Machado, S. M. F., Silva, L. F., Teixeira, M. L., Andrade, J. D., Miranda, C. A. S. F. D., Andrade, M. A. Multivariate analysis of the essential oil components of the genus *Citru*s and their antifungal activity, Cientifica, 41 (2), 111-121 (2013).

Gomes-Carneiro, M.A., Felzenszwalb, I., Paumgartten, F.J.R, Mutagenicity testing of (±)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella* / microsome assay, Mutat. Res-Gen. Tox. En., 416, 129–136 (1998).

Gomes-Carneiro, M.R., Dias, D.M.M., De-Oliveira A.C.A.X., Paumgartten. F. J. R., Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α-Bisabolol in the Salmonella / Microsome Assay., Mutat. Res-Gen. Tox. En., 585 (1-2), 105-112 (2005).

Gow, N. A.R, Hube, B., Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection, Curr. Opin. Microbiol., 15(4), 406-412 (2012).

Guenther, E., The French lavender and lavandin industry, Econ. Bot., 8 (2), 166-173 (1954).

Guerra, F. Q., Mendes, J. M., Sousa, J. P., Morais-Braga, M. F., Santos, B. H., Melo Coutinho, H. D., Lima Ede, O., Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant *Acinetobacter* spp by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*, Nat. Prod. Res., 26 (23), 2235-2238 (2012).

Guimaraes A.G., Quintans, J.S.S, Quintans, Junior, L.J. Monoterpenes with analgesic activity-a systematic review, Phytother. Res., 27, 1–15 (2013).

Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S. L., Kaushik, D., Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review, Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res., 2, 12-16 (2010).

Gradinaru, A. C., Aprotosoaie, A.C., Trifan, A., Spac, A., Brebu, M., Miron, A. Interactions between Cardamom essential oil and conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* clinical isolates, Farmacia, 62 (6) (2014).

Hajjaj, G., Bounihi, A., Tajani, M., Cherrah, Y., Zellou, A., *In vivo* analgesic activity of essential oil and aqueous extract of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), WJPPS., 3 (5), 1-13 (2014).

Hall, G.S., Sekeres, J. A., Neuner, E., Hall, J.O., Antifungal agents in : Interactions of Yeast, Moulds and Antifungal agents, Hall, G.S. (Eds), Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 1-64 (2012).

Harborne, J. B., Williams, C. A., Phytochemistry of the genus Lavandula In: Lavender, Medicinal and aromatic plants industrial profiles, M. Lis Balchin (Ed), Newyork, Taylor&Franchis, 86 (2002).

He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A. A., Elson, C. E., Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. J. Nut., 127 (5), 668-674 (1997).

Hemaiswarya, S., Doble, M., Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, Phytomedicine, 16 (11), 997-1005 (2009).

Herraiz-Penalver, D., Cases, M. A., Varela, F., Navarrete, P., Sanchez-Vioque, R., Usano-Alemany, J., Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations, Biochem. Syst. Ecol., 46, 59-68 (2013).

Houel, E., Rodrigues, A., Jahn-Oyac, A., Bessiere, J., Eparvier, V., Deharo, E., Stien, D., *In vitro* antidermatophytic activity of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse essential oil alone and in combination with azoles. J. Appl. Microbiol., 116, 288–294 (2014).

Huang, R., Southall, N., Cho, M.-H., Xia, M., Inglese, J., Austin, C. P. Characterization of diversity in toxicity mechanism using *in vitro* cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening, Chem. Res. Toxicol., 21 (3), 659-667 (2008).

http1www.medicinescomplete.com/mc/herbals/2011/HBL1000729924.htm#HBL1000729930 (07.10.2015).

http-2 http://www.iucnredlist.org/details/203245/0 (07.10.2015).

http-3 http://dendro.lt/index.php/dendro/article/view/62/47 (07.10.2015).

http-4 http://www.biodiversityexplorer.org/plants/rutaceae/citrus_reticulata.htm (07.10.2015).

http-5 http://ekmud.org.tr/16-22-kasim-2015-dunya-antibiyotik-farkindalik-haftasi-basin-aciklamasi.ekmud/ (20.04.2015).

Hillegass**,** J. M, Shukla, A, Lathrop, S. A, Mac Pherson, M. B, Fukagawa**,** N.K, Mossman**,** B.T. Assessing Nanotoxicity in Cells *in vitro*, Wiley Interdiscip Rev. Nanomed Nanobiotechnol, 2(3), 219–231 (2010).

Ilic, B. S., Kocic, B. D., Ciric, V. M., Cvetkovic, O. G., Miladinovic, D. L. An *in vitro* synergistic interaction of combinations of *Thymus glabrescens* essential oil and its main constituents with chloramphenicol, The Scientific World Journal, 1-12 (2014).

Ioannou, E., Koutsaviti, A., Tzakou, O., Roussis, V., The genus Pinus: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species, Phytochem. Rev., 13 (4), 741-768 (2014).

Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, J. Antimicrob. Chemother., 47 (5), 565-573 (2001a).

Inouye, S., Yamaguchi, H., Takizawa, T., Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method, J. Infect. Chemother., 7 (4), 251-254 (2001b).

Inouye, S., Uchida, K., Abe, S., Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*, J. Infect. Chemother., 12 (4), 210-216 (2006).

Isman, M. B., Wan, A. J., Passreiter, C. M., Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, Fitoterapia, 72 (1), 65-68 (2001).

Iten, F., Saller, R., Abel, G., Reichling, J., Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*-chemotype carvacrol, Planta Med., 75 (11), 1231-1236 (2009).

Jamalian, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Jaimand, K., Pashootan, N., Amani, A., Razzaghi-Abyaneh, M., Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens, J. Mycol. Med., 22 (4), 308-315 (2012).

Javed, S., Javaid, A., Nawaz, S., Saeed, M. K., Mahmood, Z., Siddiqui, S. Z., Ahmad, R., Phytochemistry, GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial potential of essential oil from five *Citrus* species, J. Agric. Sci., 6 (3), 201 (2014).

Jennings, V. L., Rayner-Brandes, M. H., Bird, D. J., Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems, Water Res., 35 (14), 3448-3456 (2001).

Johnson, O.O., Ayoola, G.A., Adenipekun, T., Antimicrobial activity and the chemical composition of the volatile oil blend from *Allium sativum* (garlic clove) and *Citrus reticulate* (tangerine fruit), 5 (4), 187-193 (2013).

Kamal, G., Anwar, F., Hussain, A., Sarri, N., Ashraf, M., Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels, Food Res. Int., 18 (4), 1275-1282 (2011).

Kamatou, G. P., Viljoen, A., A Review of the application and pharmacological properties of *α*-bisabolol and *α*-bisabolol-rich oils, J. Am. Oil Chem. Soc., 87 (1), 1-7 (2010).

Kara, N., Baydar, H., Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula sp*.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey, Turk. J. Field Crop., 18 (1), 58-65 (2013).

Karapandzova, M., Stefkov, G., Dokik, E. T., Panovska, T. K., Kaftandzieva, A Kulevanova, S., Chemical characterization and antimicrobial activity of the needle essential oil of *Pinus mugo* (Pinaceae) from Macedonian flora, Planta Med., 77 (12), PL59 (2011).

Kasrati, A., Jamali, C.A., Fadli, M., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuthd, H., Leach, D., Abbad, A., Antioxidative activity and synergistic effect of Thymus saturejoides Coss. essential oils with cefixime against selected food-borne bacteria, Ind. Crop.Product., 61, 338-344 (2014).

Kazemi, M., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Matricaria chamomilla*, Bull. Env. Pharmacol. Life Sci., 3 (2), 148-153 (2014).

Khan, M. S. A., Malik, A., Ahmad, I., Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*, Med. Mycol., 50 (1), 33-42 (2012).

Kırbaşlar, G. F., Tavman, A., Dülger, B., Türker, G., Antimicrobial activity of Turkish citrus peel oils, Pak. J. Bot., 41 (6), 3207-3212 (2009).

Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J., How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, Nat. Rev. Microbiol., 8 (6), 423-435 (2010).

Koenig, W.A., Joulain, D., Hochmuth, D.H., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. MassFinder 3, Hamburg, Germany, 2004.

Kon, K. V., Rai, M.K., Combining essential oils with antibiotics and other antimicrobial agents to overcome multidrug-resistant bacteria, In: Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components, M.K Rai, K.V.Kon (Eds), Academic Press, USA, 149-164 (2013).

Kurose, K., Okamura, D., Yatagai, M., Composition of the essential oils from the leaves of nine *Pinus* species and the cones of three of *Pinus* species, Flavour Fragr. J., 22, 10-20 (2007).

Kubeczka, K.H., History and sources of essential oil research In: Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. K. H. C. Başer, G. Buchbauer (Eds), CRC Press, United States of America, 18-19 (2010).

Lamine, B. M., Ismahame, A., Kelthoum, L. D., Khadouja, K., Bouziane, A., Evaluation De Leffet Inhibiteur Des Huiles Essentielles De *Lavandula latifolia* Vis-A-Vis De *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 Et De Son Mutant CH31, E. S. J., 11 (21), 195-203 (2015).

Lang, G., Buchbauer, G., A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review, Flavour, Frag. J., 27 (1), 13-39 (2012).

Langeveld, W. T., Veldhuizen, E.J.A., Burt, S.A., Synergy between essential oil components and antibiotics: A review, Crit. Rev. Microbiol., 40 (1), 76–94 (2014).

Lastbom L., Boman A., Johnsson S., Camnera P., Ryrfeldt A. Increased airway responsiveness after skin sensitisation to 3-carene, studied in isolated guinea pig. Toxicology, 147, 209–214 (2000).

Lewis, R.E., Diekema, D.J., Messer, S.A. Pfaller, M.A., Klepser, M.E., Comparison of E test, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species, J. Antimicrob. Chemother., 49, 345-351 (2002).

Lim, S., Combined effects of the essential oil from *Eucalyptus globulus* with ketoconazole against *Candida* and *Trichophyton* Species, Nat. Prod. Sci., 14 (1), 1-5 (2008).

Lis-Balchin, M., Lavender: The Genus Lavandula: CRC press. Boca Raton, FL. 2003.

Liu, Q., Niu, H., Zhang, W., Mu, H., Sun, C., Duan, J., Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens, Lett, Appl. Microbiol., 60, 421-430 (2015).

Lota, M. L., Serra, D. D. R., Tomi, F., Casanova, J., Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins, Biochem. Syst. Ecol., 29 (1), 77-104 (2001).

Mabberley, D., *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants, 49 (2-3), 481-498 (2004).

Manassero, C. A., Girotti, J. R., Mijailovsky, S., García de Bravo, M., & Polo, M. *In vitro* comparative analysis of antiproliferative activity of essential oil from mandarin peel and its principal component limonene. Nat. Prod Res., 27 (16), 1475-1478 (2013).

Menezes I.A., Marques M.S., Santos T.C., Dias K.S., Silva A.B., Mello I.C., et al., Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* in mice, Fitoterapia, 78 (3), 192–5 (2007).

Mercier B., Prost J., Prost M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α- and β-pinenes): A review, Int. J. Occup. Med. Environ. Health., 22, 331-342 (2009).

Miladinovic, D. L., Ilic, B. S., Kocic, B. D., Ciric, V. M., Nikolic, D. M., Antibacterial investigation of thyme essential oil and its main constituents in combination with tetracycline, J. Med. Food., 18 (8), 935-937 (2015).

Milenkovic, M.T., Bozic, D.D., Slavkovska, V.N., Lakusic, B.S. Synergistic effects of *Salvia officinalis* L. essential oils and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Arch. Biol. Sci., 67 (3), 949-956 (2015).

Mishra, B. B., Tripathi, S. P. Repellent activity of plant derived essential oils against *Sitophilous oryzae* (Linnaeus) and *Tribolium castenium* (Herbst), S. J. S. R., 1 (2), 173-178 (2011).

Miyazawa M; Yamafuji C., Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids, J. Agric. Food Chem., 53, 1765-1768 (2005).

McLafferty, F.W, Stauffer, D.B., The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, J Wiley and Sons: New York, 1989.

Magi, G., Marini, E., Bruna Facinelli, B., Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci, Front. Microbiol., 6, 165 (2015).

Mahboubi, M., Feizabadi, M., Antifungal activity of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent and its synergy with amphotricin B, Int. J. Essent. Oil Ther., 2 (1), 26-28 (2008).

Mahboubi, M., Ghazian Bidgoli, F., Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin, Phytomedicine, 17 (7), 548-550 (2010).

Mahboubi, M., Ghazian Bidgoli, F., *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*, Phytomedicine, 17 (10), 771-774 (2010).

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., Kuipers, E. J., Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report, *Gut*. 56, 772-781 (2007).

Malik, T., Singh, P., Pant, S., Chauhan, N., Lohani, H., Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens, Phytother. Res., 25 (8), 1225-1228 (2011).

Mazumder, J., Kumria, R., Pathak, D., Evaluation of synergistic antimicrobial activity and antioxidant activity of blend of essential oil contains Fennel, Coriander, Ajowan and Caraway, IOSR-JPBS., 9(1), 87-94 (2014).

Mendes, F.R.S., Silva, F.G.E., Sousa, E.O., Rodrigues, F.F.G. Costa, J.G.M., Monte, F.J.Q., Lemos , T.L.G., Assunçao, J.C.C., Essential oil of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. (Zingiberaceae): chemical composition and modulation of the activity of aminoglycoside antibiotics, J. Essent. Oil Res., 27 (3), 259-263 (2015).

Moon, S. E., Kim, H. Y., Cha, J. D., Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria, Arch. Oral Biol., 56 (9), 907-916 (2011).

Mukherjee, P.K, Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A, Ghannoum, M.A., Combination treatment of invasive fungal infections, Clin. Microbiol. Rev., 18 (1), 163-194 (2005).

Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic susceptible and antibiotic resistant pathogens, Phytomedicine, 17 (13), 1061-1066 (2010).

Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Segura, J., Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas, Biochem. Syst. Ecol., 35 (8), 479-488 (2007).

Murti, K., Panchal, M. A., Gajera, V., Solanki, I., Pharmacological properties of *Matricaria recutita*: A Review, Pharmacologia, 3 (8), 348-351 (2012).

Nasir B, Fatima H, Ahmed M and Haq IU. Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources, Austin. J. Microbiol., 1 (1), 1002 (2015).

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., Effect of essential oils on pathogenic bacteria, Pharmaceuticals, 6 (12), 1451-1474 (2013).

National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of d-Limonene (CAS No. 5989-27-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies), National Toxicology Program technical report series, 347, 1 (1990).

Njoroge, S. M., Mungai, H. N., Koaze, H., Phi, N. T. L., Sawamura, M., Volatile constituents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel oil from Burundi, J. Essent. Oil Res., 18 (6), 659-662 (2006).

Nozaki, A., Takahashi, E., Okamoto, K., Ito, H., Hatano, T., Antifungal activity of essential oils and their constituents against *Candida* spp. and their effects on activity of amphotericin B, Yakugaku Zasshi, 130 (6), 895-902 (2010).

Odds, F., Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J. Antimicrob. Chemother., 52 (1), 1-1 (2003).

Odds, F. C., Brown, A. J., Gow, N. A., Antifungal agents: mechanisms of action, Trends Microbiol., 11 (6), 272-279 (2003).

Ogbodo, S., Okeke, A., Ugwuoru, C., Chukwurah, E., Possible alternatives to reduce antibiotic resistance, Life Sci. Med. Res., 7 (2011).

Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J., Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*, Helicobacter, 8 (3), 207-215 (2003).

Orav, A., Raal, A., Arak, E., Content and composition of the essential oil of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert from some European countries, Nat. Prod. Res., 24 (1), 48-55 (2010).

Owlia, P., Rasooli, I., Saderi, H., Antistreptococcal and antioxidant activity of essential oil from *Matricaria chamomilla* L., Res. J. Biol. Sci., 2 (2), 237-239 (2007).

Panda, S. K., Screening methods in the study of antimicrobial properties of medicinal plants, Int. J. Adv. Biotec. and Res., 2 (1), 1-35 (2012).

Park, I. K., Kim, J. N., Lee, Y. S., Lee, S. G., Ahn, Y. J., Shin, S. C., Toxicity of plant essential oils and their components against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). J. Econ. Entomol., 101 (1), 139-144 (2008).

Perdigon-Melon, J., Carbajo, J., Petre, A., Rosal, R., Garcia-Calvo, E., Coagulation–Fenton coupled treatment for ecotoxicity reduction in highly polluted industrial wastewater, J. Hazard Mater., 181 (1), 127-132 (2010).

Pereira, V., Dias, C., Vasconcelos, M., Rosa, E., Saavedra, M., Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections *Pseudomonas aeruginosa*, Ind. Crop. Prod., 52, 1-7 (2014).

Pino, J. A., Bayat, F., Marbot, R., Aguero, J., Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Iran, J. Essent Oil Res., 14 (6), 407-408 (2002).

Pinto, E., Goncalves, M. J., Hrimpeng, K., Pinto, J., Vaz, S., Vale-Silva, L. A., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida, Cryptococcus, Aspergillus* and dermatophyte species, Ind. Crop. Prod., 51, 93-99 (2013a).

Pinto, E., Hrimpeng, K., Lopes, G., Vaz, S., Gonçalves, M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida, Cryptococcus, Aspergillus* and dermatophyte species, Eur. J. Clin Microbiol., 32 (10), 1311-1320 (2013b).

Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M., Zehtab-Salmasi, S., Mohammadi, A. Essential oil content and composition of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes, J. Agron., 5 (3), 451-455, (2006).

Pohjala, L., Tammela, P., Samanta, S. K., Yli-Kauhaluoma, J., Vuorela, P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays, Anal. Biochem., 362 (2), 221-228 (2007).

Prakash, B., Singh, P., Mishra, P. K., Dubey, N. K, Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits, Int. J. Food Microbiol., 153 (1-2), 183-191 (2012).

Pyun, M. S., Shin, S., Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against Trichophyton species and synergism of the oils with ketoconazole, Phytomedicine, 13 (6), 394-400 (2006).

Rahalison, L., Hsmburger, M., Hostettman, K., A Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants, Phytochem. Anal., 2, 199-203 (1991).

Raut, J.S., Karuppayil, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils, Ind.Crop.Prod., 62, 250-264 (2014).

Reichling, J., Schnitzler, P., Antiviral Effects of Essential Oils Used Traditionally in Phytomedicine In: Herbal Medicines: Development and Validation of Plant-Derived Medicines for Human Health, G. Bagetta, M. Cosentino, M. Tiziana Corasaniti, S. Sakurada (Eds), CRC Press, 1, 317 (2011).

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R., Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview, Forsch. Komplementmed, 16 (2), 79 (2009).

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.H., Khalel, K. I., Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), Ind. Crop Prod., 44, 437-445 (2013).

Rodrigues, F. F., Costa, J. G., Coutinho, H. D., Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*, Phytomedicine, 16 (11), 1052-1055 (2009).

Roller, S., Ernest, N., Buckle, J., The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA), J. Altern. Complement. Med., 15 (3), 275-279 (2009).

Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., Vitali, C., *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils, Curr. Med. Chem., 17 (28), 3289-3295 (2010).

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Antonietta Milillo, M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin, Phytomedicine, 14 (11), 727-732 (2007).

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R, The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B, Phytomedicine, 15 (8), 635-638 (2008).

Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M. P., Mallamaci, R. *In* vitro synergic efficacy of the combination of nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species, Phytomedicine, 16 (10), 972-975 (2009).

Rosenberg C., Liukkonen T., Kallas-Tarpila T., Ruonakangas A., Ranta R., Nurminen M., Welling I., Eppinen P.J. Monoterpene and wood dust exposures: work-related symptoms among finnish sawmill workers. Am. J. Ind. Med., 41, 38-53 (2002).

Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N. E., Hassani, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol, Phytomedicine, 17 (13), 1057-1060 (2010).

Tisserand, R., Young, Rodney (Eds), Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals, Elsevier Health Sciences, 1-784 (2013).

Saei-Dehkordi, S. S., Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Kousha, S., Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms, J. Food Sci., 77 (11), M631-M637 (2012).

Sarker, S.D., Latif, Z., Gray A.I. (Eds), Natural Product Isolation, 2nd edition, Methods in Biotechnology Vol. 20, Humana Press, Totowa, (2006).

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A., Luque, P., Chemical composition and seasonal variations of spike lavender oil from Southern Spain, J. Essent. Oil. Res., 16 (3), 206-210 (2004).

Sashidhara, K. V., Verma, R. S., Ram, P., Essential oil composition of *Matricaria recutita* L. from the lower region of the Himalayas, Flavour Frag. J., 21 (2), 274-276 (2006).

Sawamura, M., Thi Minh Tu, N., Onishi, Y., Ogawa, E., Choi, H.S., Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) cold-pressed oil Biosci., Biotechnol., Biochem., 68 (8), 1690-1697 (2004).

Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G Germana, M. A, Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily, Food Control, 26 (2), 326-330 (2012).

Shabnam, J., Amna, J., Zaid, M., Arshad, J., Fouzia, N., Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria, J. Med. Plants Res., 5 (16), 3697-3701 (2011).

Shaaban, H.A.E., El-Ghorab, A.H, Shibamoto, T., Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review, J. Essent. Oil. Res, 24 (2), 203-212 (2012).

Shahverdi, A. R., Monsef-Esfahani, H. R., Tavasoli, F., Zaheri, A., Mirjani, R. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile in vitro*, J. Food Sci., 72 (1), S055-058 (2007).

Shin, S., Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B, Arch. Pharm. Res., 26 (5), 389-393 (2003).

Shin, S., Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as antifungal agents against *Trichophyton* species, Arch. Pharm. Res., 27 (3), 295-299 (2004).

Shin, S., Kim, J. H., *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens Arch. Pharm. Res., 28 (8), 897-901 (2005).

Shin, S., Lim, S., Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against, *Trichophyton* spp., J. Appl. Microbiol., 97 (6), 1289-1296 (2004).

Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., Hosseini, S. M., Khaksar, R., Characterization of antioxidant-antimicrobial kappa-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil, Int. J. Biol. Macromol., 52, 116-124 (2013).

Si, H., Hu, J., Liu, Z., Zeng, Z. L., Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Immunol. Med. Microbiol., 53 (2), 190-194 (2008).

Siavash Saei-Dehkordi, S., Fallah, A. A., Heidari-Nasirabadi, M., Moradi, M. Chemical composition, antioxidative capacity and interactive antimicrobial potency of *Satureja khuzestanica* Jamzad essential oil and antimicrobial agents against selected food-related microorganisms, Int. J. Food Sci. Techn., 47 (8), 1579-1585 (2012).

Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Denys, P., Kowalczyk, E., The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains, Microb. Drug Resist., 18 (2), 137-148 (2012).

Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., Domingues, F. C., Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with Amphotericin B. Phytomedicine, 19 (1), 42-47 (2011).

Sim, Y., Shin, S., Combinatorial anti-Trichophyton effects of *Ligusticum chuanxiong* essential oil components with antibiotics, Arch. Pharm. Res., 31 (4), 497-502 (2008).

Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M. K., Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview, Pharmacog. Rev., 5 (9), 82 (2012).

Singh, P., Shukla, R., Kumar, A., Prakash, B., Singh, S., Dubey, N. K., Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* essential oils on *Aspergillus flavus growth* and aflatoxin production on *Asparagus racemosus*, Mycopathologia, 170 (3), 195-202 (2010).

Stringaro, A., Vavala, E., Colone, M., Pepi, F., Mignogna, G., Garzoli, S., Cecchetti, S., Ragno, R., Anjiolella, L., Effects of *Mentha suaveolens* essential oil alone or in combination with other drugs in *Candida albicans*, J. Evid. Based Complement. Altern. Med., 1-9 (2014).

Sokovic, M., Glamoclija, J., Marin, P. D., Brkic, D., Van Griensven, L. J Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model, Molecules, 15 (11), 7532-7546 (2010).

Sultana, H. S., Ali, M., Panda, B. P., Influence of volatile constituents of fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco on clinically isolated pathogenic microorganisms under *in vitro*, Asian. Pac. J. Trop. Biomed., 2 (3), 1299-1302 (2012).

Srivastava, J. K., Shankar, E., Gupta, S., Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future, Mol. Med. Rep., 3 (6), 895 (2010).

Stefani, S., Goglio A., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance, Int. J. Inf. Dis., 14 (4), 19-22 (2010).

Stevanovic, T., Garneau, F. X., Jean, F. I., Gagnon, H., Vilotic, D., Petrovic, S., Ruzic, N., Pichette, A., The essential oil composition of *Pinus mugo* Turra from Serbia, Flavour Frag. J., 20 (1), 96-97 (2005).

Stefanovic, O., Stankovic, M. S, Comic, L., *In vitro* antibacterial efficacy of *Clinopodium vulgare* L. extracts and their synergistic interaction with antibiotics, J. Med. Plants Res., 5 (17), 4074-4079 (2011).

Sun, J., D-Limonene: safety and clinical applications, Altern. Med. Rev., 12 (3), 259 (2007).

Tampieri, M., Galuppi, R., Carelle, M., Macchioni, F., Cioni, P., Morelli, I. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*, Pharm. Biol., 41 (8), 584-591 (2003).

Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L., Morelli, I, The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components, Mycopathologia, 159 (3), 339-345 (2005).

Teixeira, M. L., Cardoso, M. d. G., Figueiredo, A. C. S., Moraes, J. C., Assis, F. A., De Andrade, J., Nelson, D. L., De Souza Gomes, M., De Souza, J. A., De Albuquerque, L. R. M., Essential oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical composition, insecticidal and antioxidant activities, Am. J. Plant Sci., 5 (9) (2014).

Tejeswini, M. G., Sowmya, H. V., Swarnalatha, S. P., Negi, P. S., Antifungal activity of essential oils and their combinations in *in vitro* and *in vivo* conditions, Arch. Phytopathol. Plant Prot., 47 (5), 564-570 (2014).

Thybaud, V., Aardema, M., Clements, J., Dearfield, K., Galloway, S., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kirkland, D., MacGregor, J., Marzin, D, Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to *in vitro* testing, Mutat. Res-Gen Tox. En., 627 (1), 41-58 (2007).

Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S. J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M. B., Kawachi, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem., Int. J. Food Microbiol., 139 (3), 127-133 (2010).

Toroglu, S., *In vitro* antimicrobial activity and antagonistic effect of essential oils from plant species, J. Environ. Biol., 28 (3), 551-559 (2007).

Toroğlu, S., *In vitro* antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils, J. Environ. Biol., 32 (1), 23-29 (2011).

Toroğlu, S., Dığrak, M., Çenet, M., Baharat olarak tüketilen *Laurus nobilis* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotiklere *in vitro* etkilerinin belirlenmesi, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9, 20-26 (2006).

Toroğlu, S., Dığrak, M., Kocabaş, Y. Z., Çay veya baharat olarak tüketilen *Teucrium polium L., Thymbra spicata L. var. spicata, Ocimum basilicum L. ve Foeniculum vulgare* Miller'in uçucu yağlarının *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi ve bazı antibiyotiklerle etkileşimleri, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 8, 36-42 (2005).

Tsitsimpikou, C., Petrakis, P. V., Ortiz, A., Harvala, C., Roussis, V., Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species, J. Essent. Oil Res., 13 (3), 174-178 (2001).

Ulitzur, S., Established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purposes, J. Biolumin. Chemilumin., 12(4), 179-192 (1997).

Upadhyay, R., Emergence of drug resistance in microbes, its dissemination and target modification of antibiotics: A life threatening problem to human society, Emergence, 2(5), 119-126 (2011).

Valgas, C., Souza, S. M., Smania, E.F.A., Smania, Artur, Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, Braz. J. Microbiol., 38, 369-380 (2007).

Vuuren, S. F. v. and Viljoen, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination, Flavour Fragr. J., 22, 540-544 (2007).

Van Vuuren, S. F., Suliman, S., Viljoen, A. M., The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials, Lett. Appl. Microbiol., 48 (4), 440-446 (2009).

Van Zyl, R. L., Seatlholo, S. T., Van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M., The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents, J. Esset. Oil Res., 18, 129-133 (2006).

Varona, S., Rodriguez Rojo, S., Martin, A., Cocero, M. J., Serra, A. T., Crespo, T., Duarte, C. M., Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria, Ind. Crop. Prod., 42, 243-250 (2013).

Venditti, A., Serrilli, A. M., Vittori, S., Papa, F., Maggi, F., Di Cecco, M., Ciaschetti, G., Bruno, M., Rosselli, S., Bianco, A., Secondary metabolites from *Pinus mugo* Turra subsp. *mugo* Growing in the Majella National Park (Central Apennines, Italy), Chem. Biodivers., 10 (11), 2091-2100 (2013).

Veras, H. N., Rodrigues, F. F., Colares, A. V., Menezes, I. R., Coutinho, H. D., Botelho, M. A., Costa, J. G., Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol, Fitoterapia, 83 (3), 508-512 (2012).

Verma, P., Methods for determining bactericidal activity and antimicrobial interactions: synergy testing, time kill curves and population analysis In: Antimicrobial Susceptibiliy Testing Protocols, Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A. C. (Eds), CRC press, New York, 275-298 (2007).

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils, J. Food Safety, 28 (4), 567-576 (2008).

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. A. Chemical composition of mandarin (*C. reticulata* L.), grapefruit (*C. paradis*i L.), lemon (*C. limon* L.) and orange (*C. sinensis* L.) essential oils. J. Essent. Oil Bear. Plant., 12 (2), 236-243 (2009).

Vuuren, S. V., Viljoen, A., Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination, Flavour Frag. J., 22 (6), 540-544 (2007).

Vural, N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Basimevi, Ankara, 1-659 (2005).

Wanger, A., Disk diffusion test and gradient methodologies In: Antimicrobial Susceptibiliy Testing Protocols, Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. (Eds), CRC press, New York, 53-73 (2007).

Wei Q., Harada K., Ohmori S., Minamoto K., Wie C., Ueda A., Toxicity study of the volatile constituens of Myoga utilizing acute dermal irritaion assays and the Guinea-pig maximization test, J. Occup. Health., 48, 480-486 (2006).

Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S., Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents, Planta Med., 77 (1), 7 (2011).

World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance(2014)/http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/.

Yap, P. S. X., Krishnan, T., Yiap, B. C., Hu, C. P., Chan, K. G., Lim, S. H. E., Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*, J. Appl. Microbiol., 116, 1119-1128 (2014).

Yetkin, G., Kuzucu, Ç., Çalışkan, A., Ay, S., Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli'*lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı, İnönü Üniv. Tıp Fak. Derg., 13 (3), 147-150 (2006).

Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., Wu, N., Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells, Molecules, 15 (5), 3200-3210 (2010).

EK 1

***MATRICARIA RECUTITA* UÇUCU YAĞI (Matricaria aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0)**

Tanım: Mavi renkli uçucu yağ, *M. recutita* bitkisinin taze veya kurutulmuş çiçek başları veya çiçekli kısımlarının buhar distilasyonu ile elde edilir.

Kimyasal içerik: Avrupa Farmakopesi'ne göre kimyasal içerik açısından 2 tip papatya uçucu yağı tanımlanmıştır; bisabolol oksitçe zengin diğeri de (-)-α-bisabolol açısından zengin olan papatya uçucu yağları şeklinde.

Bisabolol oksitler açısından zengin olan papatya uçucu yağında;

Bisabolol oksitler (%29-81)

Kamazulen (≥ % 1.0) tanımlanmış oranlarda olmalıdır.

(-)-α-Bisabolol maddesince zengin papatya uçucu yağları ise

(-)-α-Bisabolol (% 10-65),

Kamazulen (≥ %1) ve

Bisabolol oksitlerin ve (-)-α-bisabolol maddelerinin toplamı oransal olarak en az % 20 olmalıdır

EK 2

***LAVANDULA LATIFOLIA* UÇUCU YAĞI (Spicae aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0)**

Tanım: Uçucu yağı *Lavandula latifolia* Medik. bitkisinin çiçekli kısımlarının buhar distilasyonu ile elde edilir.

Kimyasal içerik belirtilen limitler içerisinde olmalıdır

Limonen (% 0.5-3.0),

1,8-Sineol (% 16.0-39.0),

Kafur (% 8.0-16.0),

Linalol (% 34.0-50.0),

Linalil asetat ≤ 1.6,

α-Terpineol (% 0.2-2.0)

(E)-α-Bisabolen (% 0.4-2.5)

EK 3

***PINUS MUGO* UÇUCU YAĞI (Pini pumilionis aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0)**

Tanım: Uçucu yağı *Pinus mugo* Turra bitkisinin taze yaprak veya dallarından buhar distilasyonu ile elde edilir.

Kimyasal içerik:

α-Pinen (% 10-30)

δ-3-Karen (% 10-20)

β-Fellandren (% 10-19)

β-Pinen (% 3-14)

Limonen (% 8.0-14)

Terpinolen ≤ % 8.0

Mirsen (% 3.0-12)

Kamfen ≤ % 2.0,

p-Simen ≤ % 2.5,

Bornil asetat (% 0.5-5.0)

β-Karyofillen (% 0.5-5.0)

EK 4

***CITRUS RETICULATA* UÇUCU YAĞI (Citri reticulatae aetheroleum) / European Pharmacopoeia (8.0)**

Tanım: Mandalina uçucu yağı *C. reticulata* taze meyve kabuklarından soğukta mekanik ekstraksiyon ile elde edilir, sarımsı veya turuncu, karakteristik kokuya sahiptir.

Kimyasal içerik:

α-Pinen (% 1.6-3.0)

β-pinen (% 1.2-2.0)

Sabinen ≤ % 3.0

mirsen (% 1.5-2.0)

limonen (% 65.0-75.0)

γ-Terpinen (% 16.0-22.0)

Metil-N metilantranilat (% 0.3-0.6)