T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ajuga chamaepitys subsp. *chia* TAKSONUNUN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATİYE NUR SAVAŞ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU

ÇANAKKALE – 2021

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ajuga chamaepitys subsp. *chia* TAKSONUNUN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATİYE NUR SAVAŞ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. NURCİHAN HACIOĞLU DOĞRU

ÇANAKKALE – 2021

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Atiye Nur SAVAŞ tarafından Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU yönetiminde hazırlanan ve **29/06/2021** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "***Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* Taksonunun Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU (Danışman)	……
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR	……
Dr. Öğr. Üyesi Derya DOĞANAY	…….

Tez No : ……..
Tez Savunma Tarihi : 29/06/2021

……
PROF. DR. PELİN KANTEN
Enstitü Müdürü

../../20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)
Atiye Nur SAVAŞ
29/06/2021

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU'na, bitki örneğinin tayini ve toplanmasındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Ersin KARABACAK'a ve antioksidan aktivite tayin basamaklarındaki desteği için Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR'e, çalışma süresince her türlü yardıma koşan arkadaşlarım Furkan ÖZTÜRK, Selen KAYA ve Büşra DALGIÇ'a, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Atiye Nur SAVAŞ

Çanakkale, Haziran 2021

ÖZET

Ajuga chamaepitys subsp. *chia* TAKSONUNUN BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Atiye Nur SAVAŞ
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Doç. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU
29/06/2021, 78

Çalışmamızda, *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang. bitki türünden elde edilen etanol, metanol, aseton ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal, antibiyofilm ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisi, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı mukayese antibiyotiği penisilinden (P10) daha yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ekstraktlar ile ampisilin ve polimiksin B antibiyotikleri kullanılarak oluşturulan kombinasyonları antagonistik etkisi saptanmıştır. Bununla birlikte, bitki ekstraktlarının zamana bağlı öldürme testinde, 24 saat sonunda mikrobisidal etki elde edilmiştir. En yüksek antibiyofilm aktivite aseton ekstresinde, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 6538P bakterilerine karşı elde edilmiştir. Ayrıca bitkinin antioksidan aktivitesinin en yüksek olduğu ekstraktın etil asetat olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang., Antimikrobiyal aktivite, Antibiyofilm aktivite, Antioksidan kapasite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF

Ajuga chamaepitys subsp. *chia*

Atiye Nur SAVAŞ
Çanakkale Onsekiz Mart University
School of Graduate Studies
Master of Science Thesis in Biological Science
Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU
29/06/2021,78

In our study, it was aimed to determine the antimicrobial, antibiofilm and antioxidant activities of ethanol, methanol, acetone and ethyl acetate extracts *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang. obtained from the plant species. *A. chamaepitys* subsp. *chia* plant showed a higher antibacterial activity than the comparative antibiotic penicillin (P10) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Combinations of the extracts with ampicillin and polymyxin B antibiotics have been found to have antagonistic effects. However, in the time-dependent killing test of plant extracts, microbicidal effect was obtained after 24 hours. The highest antibiofilm activity was obtained from the acetone extract against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 6538P bacteria. In addition, it was determined that the extract with the highest antioxidant activity of the plant was ethyl acetate.

Keywords: : *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang., Antimicrobial activity, Antibiofilm activity, Antioxidant capacity

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI……... i
ETİK BEYAN…… ii
TEŞEKKÜR…….. iii
ÖZET ……..…….…….. iv
ABSTRACT …….. v
İÇİNDEKİLER ……..…… vi
SİMGELER ve KISALTMALAR……..……. ix
TABLOLAR DİZİNİ…….…. x
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...…….….. xi

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ 1

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3

2.1. Tıbbi Bitkiler ve *Ajuga chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang Türünün Genel Özellikleri...……..... 3
2.2. Bitkilerin Biyolojik Aktiviteleri……... 6
2.2.1. Bitkilerin Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri……... 7
2.2.2. Bitkilerin Antibiyofilm Aktiviteleri…… 10
2.2.3. Bitkilerin Antioksidan Aktiviteleri……. 11
2.2.4. *Ajuga* Türleriyle Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları…….. 13

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM 20

3.1. Materyal……....……..... 20
3.1.1. Örnek Toplanması ve Teşhis……....……..….. 20

3.2 Yöntem……...…….…..... 21
3.2.1. Ekstraktların Elde Edilmesi……...…….……..….. 21
3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri…… 21
3.2.3. Antibiyofilm Aktivite Tayini ……..…… 23
3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayini……... 24
3.2.5. Veri Analizi…… 25

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI 26

4.1. Ekstraktların Ürün Verimlilikleri……...…….…..... 26
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları…….....…….…..... 26
4.2.1. Bitki Ekstraktlarının Disk Difüzyon, MİK, MBK Bulguları……..... 26
4.2.2. Bitki Ekstraktlarının FİK Bulguları……... 33
4.2.3. Zamana Bağlı Kinetik Öldürme Testi Bulguları……... 36
4.2.4. Antibiyofilm (Biyofilm Oluşumunu Giderme Yüzdesi) Aktivite Tayini Bulguları……. 41
4.3. *A.chamaepitys* subsp. *chia* Bitkisinin Antioksidan Aktivite Bulguları…….. 46
4.3.1. Ekstraktların Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH) Bulguları……..... 46
4.3.2. Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Belirleme Tayini Bulguları…… 47

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER 50

KAYNAKÇA ...…… 52
ÖZGEÇMİŞ ….……..... I

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
BHI	Brain Heart Infusion Broth
g	Gram
%	Yüzde oranı
^{o}C	Santigrat derece
cm	Santimetre
CUPRAC	Bakır (II) indirgeme/antioksidan kapasite
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dk	Dakika
FİK	Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MEB	Malt Extract Broth
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
NRRLB	Agricultural Research Service Culture Collection
NY100	Nistatin
P10	Penisilin
S10	Streptomisin

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Çalışmada kullanılan bitki örneği	21
Tablo 2	Ekstraktların ürün verimliliği	26
Tablo 3	Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite bulguları	32
Tablo 4	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktının FİK Bulguları	33
Tablo 5	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin metanol ekstraktının FİK Bulguları	34
Tablo 6	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin aseton ekstraktının FİK Bulguları	35
Tablo 7	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etil asetat ekstraktının FİK Bulguları	36
Tablo 8	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının antibiyofilm (% inhibisyon) aktivitesi	42
Tablo 9	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının DPPH yöntemi ile serbest radikal giderme aktivitesi	46
Tablo 10	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının CUPRAC kapasitesi.	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin genel görünümü ve çiçek görüntüsü	20
Şekil 2	Bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları	27
Şekil 3	Bitki ekstraktlarının *S. haemolyticus* ATCC 43252 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları	28
Şekil 4	Bitki ekstraktlarının *A. baumannii* ATCC 19606 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları	28
Şekil 5	Bitki ekstraktlarının *E. coli* NRRLB 3704 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları	29
Şekil 6	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktının MİK bulguları	29
Şekil 7	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin metanol ekstraktının MİK bulguları	30
Şekil 8	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı MBK bulguları	30
Şekil 9	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının *C. albicans* ATCC 10231 maya kültürüne karşı MFK bulguları	31
Şekil 10	*E. coli* NRRLB 3704 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği	37

Şekil 11	*P. vulgaris* ATCC 13315 ve *B. subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği	38
Şekil 12	*S. haemolyticus* ATCC 43252 ve *A. baumannii* ATCC 19606 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği	39
Şekil 13	*S. aureus* ATCC 6538P ve *C. albicans* ATCC 10231 test kültürlerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği	40
Şekil 14	*A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisine ait dört farklı ekstraktın DPPH yöntemi ile serbest radikal giderme aktivitesi	47

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

Yeryüzünde bulunan bütün canlılar yaşamları boyunca çeşitli hastalıklarla karşı karşıya kalmışlardır. Bu hastalıklardan kurtulmak için bilim insanları tarafından birçok tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bilim insanları genellikle uyguladıkları tedaviler bitkiler ile yapılmıştır. Günümüze kadar şeker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb. hastalıklar bitkiler ile tedavi edilmiş ve hala edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), birçok hastalığın ilk olarak bitkisel kaynaklı ürünlerle tedavisini amaçlamış olup, tıbbi bitkilerin kullanımının daha da artacağını öngörmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Özellikle bulaşıcı hastalıkların tedavisinde Dünyanın her yerinde 1920'li yıllardan bu yana yoğun antibiyotik kullanımı beraberinde antibiyotik dirençliliği sorununu da getirmiştir. Antibiyotik direnç sorununun yanı sıra tedavide kullanılan sentetik ilaçların yan etkileri bilim insanlarını enfeksiyon etmenleri üzerinde geniş spektrumlu etkiye sahip hatta mikrobiyal biyofilm oluşumunu engelleyici yeni doğal bileşiklerin araştırılmasına yöneltmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar özellikle bitkilerin içerdikleri biyoaktif maddeler ve bileşiklerin, hem bulaşıcı hastalıkların tedavisinde hem de direnç gösteren bakteri suşlarının inhibe edilmesinde hatta mikrobiyal biyofilm oluşumunun gideriminde kullanılabilecek doğal kaynaklar olma özelliğini taşıyan en önemli organizma grupları oldukarını ortaya koymuştur.

Bitkilerin, patojenler ve bitki zararlısı böceklere karşı sentezlemiş oldukları doğal bileşenler arasında antioksidanlarda sayılabilir. Oksidatif stres kökenli pek çok hastalığın önlenmesini sağlayan antioksidanlar, bitkiler gibi doğal kaynaklar dışında sentetik yollarla da üretilebilmektedir. Ancak sentetik antioksidanların karaciğerde hasar ve karsinojenez (Nirmala, 2018) gibi olumsuz etkilere sebep olmaları doğal antioksidan kaynakların taranmasını önemli hale getirmiştir. Bitkiler fenoller, vitaminler, karotenoidler, flavonoidler gibi doğal antioksidan kaynakları içerdikleri için farklı bitki gruplarının bu amaçla taranmasını gerekli kılmaktadır.

Dünya genelinde yüksek yayılış alanına sahip Lamiaceae familyası ülkemizde de en çok bulunan familyalardan biridir. Lamiaceae familyasında bulunan pekçok tür alternatif tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Lamiaceae familyasına ait *Ajuga* cinsi tıpta eski çağlardan beri ateş, diş ağrısı, dizanteri, sıtma, yüksek tansiyon, diyabet, mide-bağırsak bozuklukları, idrar söktürücü ve mantar önleyici, iltihap önleyici gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999). *Ajuga* cinsi üyelerinin içermiş oldukları zengin uçucu yağ, fenolik bileşikler, flavonoidler gibi birçok kimyasal bileşiğin (Ulcay, 2021) antimikrobiyal (Ulukanlı, vd., 2005), antitümör (Chen, vd., 1996; Ben, vd., 2000), antienflamatuar (Marc, vd., 2008), antioksidan (Chenni, vd., 2007), antiviral ve sitotoksik (Orhan, vd., 2009) gibi geniş bir biyolojik, farmakolojik ve tıbbi özellik gösterdiği pek çok farklı araştırmada ortaya konmuştur (Turkoğlu, vd., 2010). *Ajuga chamaepitys* türü ile yapılan kısıtlı çalışmalarda bu türün antimikrobiyal (Türkoğlu, vd., 2010), antioksidan (Delazar, vd., 2012) ve antiromatizmal (Marc, vd., 2008) etkiye sahip bir tür olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Kampüsü'nden toplanan *A. chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang türünün, Disk Difüzyon, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonları (MBK/MFK) ile antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyofilm aktivitesi ve Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH) ve CUPRAC Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Belirleme Tayini metotları ile antioksidan aktivitelerinin ortaya konmasına çalışılmıştır. Ayrıca antimikrobiyal kombinasyonlarının değerlendirilmesi için Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) metodu ve Zamana Bağlı Kinetik Öldürme Testi (Time-kill) çalışılmıştır. Bugüne kadar yapılmış en kapsamlı çalışma olan bu araştırmayla *A. chamaepitys* subsp. *chia* türünün ilk kez ortaya konan antibiyofilm aktivitesi ile birlikte potansiyel farmakolojik bir ilaç kaynağı olması yönünde ilk bilgiler ortaya konmuştur. Tez kapsamında, *A. chamaepitys* subsp. *chia* türünün biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile birçok hastalığın ve dirençli bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yeni ilaçların kaynağı olabileceği ve gereksiz antibiyotik kullanımının azalacağı ve antioksidan kapasiteye sahip yeni bir kaynak olması yönünde katkı sağlaması beklenmektedir.

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Tıbbi Bitkiler ve *A. chamaepitys* subsp. *chia* (Schreb.) Arcang Türünün Genel Özellikleri

Yüzyıllardan süregelen hastalıkların tedavisinde kullanılan en önemli ilaç bitkiler olmuştur. İnsanoğlu ilaçların keşfinden önce yara, iltihaplanma, ağrı vb. durumlarda bazı bitkiler ile tedavi uygulamıştır. Dünyanın birçok yerinde uygulanan bu tedavi yöntemi günümüze kadar gelmiş ve şeker hastalığı, dizanteri, grip, astım, bronşit, bazı ruh hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde bitkiler kullanılmıştır. Bu nedenle hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilere tıbbi bitkiler denilmektedir. Tıbbi bitkiler, gıda, ilaç, kozmetik ve sanayi endüstrisi gibi farklı birçok alanda kullanılmaktadır (Demir, 2020).

Türkiye, Asya ve Avrupa arasında köprü görevi görmesi ve Akdeniz iklim kuşağında bulunması bitki çeşitliliğinde etkili olmuştur. Ülkemizde bitkiler, ilaç sektöründe, gıda ve bazı bitkisel kimyasal maddelerin yapımında, kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Bununla birlikte önemli bir grubu diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de çay, baharat ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Türkiye Florasında yaklaşık 11.000 tür bulunurken bunların 1000'e yakını tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Türkiye, tıbbi bitki çeşitliliğinde dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Tıbbi bitkiler ülkemizde genellikle Ege, Akdeniz, Marmara, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden toplanmaktadır. Gerektiğinde toplanan bu bitkiler herhangi bir işlem uygulanmadan doğal haliyle kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Lamiaceae familyası (Ballıbabagiller)**,** Akdeniz, Avusturya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika gibi dünyanın her yerinde yayılış gösteren zengin bir familyadır. Lamiaceae familyası, bu bölgelerde 250 cinsi ve 6000-7000 arasında türü barındırmaktadır. Habitat olarak çoğunlukla step, kayalık, kurak ve nemli alanlar, yol ve tarla kenarlarında, kalkerli alanları tercih etmektedir. Türkiye'de de bu familya, Dünya geneline benzer bir durum olarak üçüncü en zengin bitki familyası olma özelliği taşımakta ve yaklaşık 45 cins

içinde 560-650 arasında tür ve 735 civarı taksonla temsil edilmektedir (Üzgör, 2019). Familya da genelde bilinen nane, kekik, lavanta, biberiye gibi yarı çalı formunda olan bitkiler bulunmaktadır. Genellikle Akdeniz kıyılarında yaygın görülen bu bitkilerde yaz aylarında canlı kalabilmelerini sağlayan uçucu yağ oluşmakta olup tüm türleri aromatiktir. Familyada bulunan başlıca cinsler *Lamium, Teucrium, Stachys, Marrubium, Satureja, Salvia, Ajuga, Phlomis, Origanum, Sideritis, Thymus* olarak sıralanabilir (Salem, 2017).

Lamiaceae familyası üyesi olan bitki grupları aynı zamanda endüstriyel bitki türleri olup sanayi, ilaç sektörü, geleneksel tıp ve tarım alanları gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu familya üyeleri farmakolojik etkilere sahip bileşikler açısından oldukça zengin bitki türleri olup uçucu yağlar, glikozidler, flavanoidler, tanenler, fenoller ve reçineler gibi sekonder bileşikleri içerirler. Bu sekonder metabolitler, Lamiaceae üyelerinin antibakteriyel, antioksidan, antitümöral, antifungal, analjenik ajanlar olmalarına büyük katkı sağlarlar Hatta familyanın içinde bulunan tıbbi bitkiler, geçmişten günümüze kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde alternatif tıp çalışmaları için önemli materyaller olmuştur (Kocabaş ve Karaman, 2001; Özkan, 2007).

Lamiaceae familyasının üyesi 71 tür 170 sinonim ve taksonomik olarak netleşmemiş 10 türle en zengin tür çeşitliliğine sahip cinslerden biri de *Ajuga* cinsidir. Bu cins üyeleri Avrupa, Asya ve Afrika'da yayılış gösteren, aynı zamanda güneydoğu Avustralya'da da iki türü bulunan tek yıllık veya çok yıllık otsu ve her dem yeşil bitkiler olup Dünya genelinde 300'ün üzerinde taksonla temsil edilmektedir (Köse, vd., 2017). Herdem yeşil olması ve güzel çiçeklerinden dolayı bahçelerde toprak örtüsü veya sınır bitkisi olarak kullanılmaktadır. Ancak familyanın bazı türleri yabani ot sınıfında bulunur. *Ajuga* cinsi aynı zamanda ekonomik ve tıbbi değere sahip olup (Israılı ve Lyoussı, 2009); Dünyanın farklı pek çok yerinde – Pakistan, Hindistan, Etiyopya, Fas, Türkiye ve İtalya gibi- geleneksel tıp çalışmalarında yüksek tansiyon, sarılık, ateş, ülser, diyabet, ağrı, hemoroit, yaralar için antiasit, antispazmodik, anti-dizanterik, kan temizleyici, saç toniği ve antiseptik olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır (Tahraoui, vd., 2007; Giday, vd., 2010; Di Novella, vd., 2013; Bhatia, vd., 2014; Guzel, vd., 2015; Kumar, vd., 2015; Rao, vd., 2015; Jan, vd., 2017). İlk bilimsel çalışmalar 1948 yıllarında *Ajuga reptans* türünde yapılan farmakolojik ve terapötik araştırmalara dayanmaktadır (Baytop, 1999). Bazı *Ajuga*

türlerinin ise, böcek antifidantı ile böcek büyüme inhibitörü (Camps ve Coll 1993), antioksidan (Chenni, 2007; Türkoğlu, vd., 2010; Delazar, vd., 2012; Haşimi, 2012), antimikrobiyal (Marc, vd., 2008; Haşimi, 2012), antimalaryal/antiplazmodiyal (Chandel ve Bagai, 2011), antitümör (Wessner, vd., 1992) vb. aktivitelerinin olduğu saptanmıştır.

Türkiye'de 14 tür ve 27 alt türü bulunan *Ajuga* cinsi üyeleri genellikle aşırı soğuk ve yüksek kesimlerde yetişmeyen güneşli ve nemli alanlarda yetişmektedir (Kose, vd., 2011). *Ajuga* cinsi tıbbi aromatik bitki olarak kullanılmakta olup özellikle kaşıntı, mide rahatsızlıkları, egzama, yaralanma ve ağrı durumlarında geleneksel tıp kullanımı yüksek bitki gruplarından biridir. Türkiye'de yayılış gösteren 14 türden en yaygın olanı *A. chamaepitys* (L.) Shreber türüdür (Üzgör, 2019).

Ajuga cinsi üyeleri çiçek morfolojisi ve renk deseni olarak çift dudaklı, mavi, mor ve sarı renkte olup bitki 5-50 cm uzunluğa sahiptir (Israili ve Lyoussi, 2009). Gövde yaprakları kenarlı, dişli veya iğne şeklinde grimsi renktedir. Yaprakların yüzeyi oldukça tüylü ve yaprak boyu 0.8- 1.5 cm eni ise 1-2 mm arasındadır. Çiçek yaprakları diğer yapraklara göre daha fazla bölmelidir. Her eksenden çift çiçek açar. Çanak yaprakları tabanda küçük olup 4-6 mm uzunluğunda bulunmaktadır. Bazı gövde yapraklarına benzeyen brakteler farklılaşmıştır. Kaliks aktinomorftur. Sarı renge sahip olan taç yaprakları nisan ayından ekim ayına kadar bulunur. Genellikle taşlı alanlarda, step iklimi olan bozkır topraklarında rastlanılmaktadır. Yükselti olarak, 2000 m'ye kadar yayılış gösterebilir (Gül, vd., 2012). Taşlı yamaçlar, bozkır toprakları, step iklimi yetişme alanları olan bu bitki türleri Türkiye'de ise kuzey, kuzeybatı, batı taraflarında yayılış göstermektedir. Mayıs-Temmuz ayları arası çiçeklenme zamanı olup; halk dilinde genellikle "Mayasıl Otu" diyerek bilinmektedir (Davis, 1982).

A. chamaepitys subsp. *chia* (Schreb.) Arcang türü ise Doğu Akdeniz elementidir (Davis, 1982). Halk arasında yer çamı, bodur ot, yer servisi, acı yavşan, kurtluca (Baytop, 1997), mayasıl otu, kısa mahmut otu (Zeybek ve Zeybek, 1994) olarak bilinmektedir. *A. chamaepitys* türü orta çağdan beri idrar arttırıcı, adet söktürücü, zehirli hayvan sokmalarında panzehir olarak (Baytop, 1999), kuvvet verici, yara iyileştirici ve terletici

(Baytop, 1997; Baytop, 1999) olarak kullanılmaktadır. Halen etnofarmakolojik olarak halk arasında lapa haline getirilip yara iyileştirmede kullanıldığı bilinmektedir (Baytop, 1999). *A. chamaepitys* subsp. *chia* ise Konya yöresinde basur otu olarak bilinmekte ve hemoroitte kullanılmaktadır (Sezik ve Yeşilada, 2002; Özge, 2015).

2.2. Bitkilerin Biyolojik Aktiviteleri

Yüzyıllardır bitkiler çeşitli ön işlemlerden geçirilerek pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Teknolojik gelişmeler yeni tekniklerle geliştirilen teknolojik ilaç sayılarını arttırmış olsa da bu ilaçların sentetik yapılı olması, tedavide olumsuz sonuç vermesi ve yan etkilerinin artması tedavide doğal kaynakların kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle son yıllarda bitkiler ve içerdikleri biyoaktif moleküller, önemli doğal ilaç kaynakları olabilme potansiyellerinden dolayı mikrobiyolojik ve farmakolojik yönden kapsamlı çalışmalara konu olmuşlardır (Kırbağ ve Zengin, 2005). Günümüzde özellikle "Tamamlayıcı Tıp" diye adlandırılan tedavi anlayışı, DSÖ örgütü verilerine göre 91 ülkede yapılan çalışmalarda 20000'den fazla bitki türünün bu amaçla kullanımını beraberinde getirmiştir (Sevindik, vd., 2017; Pehlivan ve Sevindik, 2018).

Yapılan bazı araştırmalara göre tıbbi bitkiler biyolojik açıdan birçok kimyasal madde içermektedir. Bitkilerin doğal bileşenleri olan bu kimyasalların ilaç yapımında kullanılan kimyasal içeriklerle benzerlik göstermesi bu bileşiklerin daha fazla araştırılmasını ve tedavide kullanımının önünü açmıştır (Bayram, vd., 2010; Jose, vd., 2018; Mohammed, vd., 2018). Zengin kimyasal içerikler ve bu içeriklerin ilaç formülasyonlarında kullanımının artması bitki materyallerini farmakolojinin önemli çalışma konuları arasına sokmuştur. Bitkilerin sekonder metabolitleri olan besin olarak tüketilmeyip özellikle insan sağlığı açısından önemli olan biyoaktif içeriklere "fitokimyasallar" denir (Sevindik, 2018). Bitkilerin sentezlediği bazı kimyasallar arasında "fenolik bileşikler (polifenoller), tanenler, saponinler, karotenoidler, kumarinler, tokoferoller, terpenler, izotiyosiyanatlar, sülfitler, sülforafanlar, terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler, fitosteroller, fitoöstrojenler ve indoller" sayılabilir (Fidan ve Dündar, 2007). Bunlar (flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, berberin, kinin ve emetinler) enfeksiyon ve

kronik hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin, "antioksidan (Vital, vd., 2010), metal iyonlarını şelatlaştırıcı, antitümör (Verma, vd., 2009), dejeneratif hastalıkları önleyici, antialerjik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antitrombotik (kanın pıhtılaşmasını önleyici), antikarsinojen, antiaterojen (damar sertliğini önleyici), antiülser ve vasodilator (kan damarlarını genişletici) ajan, DNA hasarını onarma" (Benjamin vd., 20,15; Thi ve Brogger, 2015) gibi fonksiyonlara sahip oldukları yapılan pek çok çalışmada saptanmıştır (Weisburger, 2000; Cemeroğlu, 2004; Halliwell, 2007; Demir ve Akpınar, 2020).

2.2.1. Bitkilerin Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri

1928 yılında Fleming tarafından ilk antibiyotik Penisilinin keşfiyle birlikte enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni bir çağ açılmıştır. Enfeksiyon etkeni mikroorganizmaların gelişmesini durduran veya onları öldüren, bununla birlikte konakta yan etkiye sebep olmaması beklenen bu ilaçlar antimikrobiyal maddeler olarak adlandırılmıştır. Bu ilaçlar sayesinde hem enfeksiyon etmenlerinin hastada tedavisi sağlanmış hem de diğer insanlara bulaşma potansiyelinin önüne geçilmiştir. (Arda, 1997). İlk antibiyotik kaynağı doğal yollarla elde edilmişken; farklı hastalıkların sağaltımında zaman içerisinde sentetik ve yarı sentetik diye adlandırılan antibiyotikler keşfedilmeye başlanmış ve uzun yıllar tedavide başarıyla kullanılmıştır. Fakat enfeksiyon etmenlerinin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri, toksisite oranlarını yüksek olması ve konakta istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkması bu ajanlarla tedavide sorunlar ve kısıtlamalar yaratmaya başlamıştır (Pulcini, vd., 2012). Bu nedenle bu ilaçlara alternatif olabilecek yeni aktif bileşikler ve özellikle doğal kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır (Wu, vd., 2012). Bitkiler doğal antimikrobiyal kaynak olma potansiyeli yüksek organizmalardır (Orhan, vd., 2012). Biyotik stres faktörleri olan patojenlere karşı bitkilerin üretmiş oldukları sekonder metabolitler ve bitkisel ürünler aynı zamanda önemli bir antimikrobiyal ajan olma özelliği de taşımaktadırlar (Kan, vd., 2009). Bitkilerden elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve bitki ekstraktlarının virüs, bakteri ve funguslar üzerinde durdurucu, yavaşlatıcı ve öldürücü etki yaptığı belirlenmiştir. Bitkilerden yapılan ilaçlar mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda, bitkilerin

kimyasal bileşimlerinin belirlenmesine ve bu kimyasal özelliklerin hangi hastalıkların tedavisinde ne kadarlık dozda kullanılacağının saptanabilmesi için antimikrobiyal mekanizmayı çözmek için çalışılmaktadır (Erdoğan ve Everest, 2012).

Bitkilerde etken madde üzerine yapılan çalışmalar, bu ilaç kaynaklarının tedavi edici özelliklerinin tek bir maddeden değil çok sayıda bileşenin sinerjik etkisinden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu durum tek başına antibiyotiklerle tedavi edilmeleri zor olan dirençli mikroorganizma kökenli hastalıklara karşı, bitki bileşenleri + antibiyotik kombinasyonlarının daha etkin bir tedavi yöntemi olacağı fikrini ortaya koymuştur (Shanthi-Sree, vd., 2010; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Bugün enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yan etkiler, antibiyotik direnci gibi sorunlar günlük pratikte antibiyotik kombinasyonlarının kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Antibiyotik kombinasyonları, mikroorganizmaların kana karıştığı ciddi doku ve organ hasarı oluşabilecek enfeksiyonlarda dirençli mikroorganizma oranını düşürmek ve bazı antibiyotiklerde görülen doz bağımlı toksik etkinin gideriminde yoğun şekilde kullanılmaktadır. Bitkilerde yukarıda bahsettiğimiz faydalı etkilerinden dolayı bu kombinasyonlara katılmaktadır.

Antibiyotik- antibiyotik ya da bitki – antibiyotik kombinasyonları oluşturarak bu kombinasyonların etkinliğini test etmek amacıyla çok sayıda metod in vitro da kullanılmaktadır. Bu sayede in vivo tedavide kullanılacak en etkili bileşimin tespitine çalışılmaktadır (Bal, 1999; Forbes vd., 2007). Bu amaçla öncelikle antibiyotik yada bitki ekstraktının MİK değerinin belirlenmesi ve sinerji testlerinin yapılması gerekmektedir (Bal, 1999).

Sinerji testleri antibiyotik kombinasyonlarının in vivo etkisini saptamak amacıyla yapılan testlerdir. Yapılan bu testler sonucunda kombinasyonun etkisi, antibiyotiklerin yada bitki ekstraktlarının tek başına kullanımında elde edilen yüksekse sinerjizmden, düşükse antagonizmden, toplamına eşitse indiferan (etkisiz) etkiden bahsedilmektedir (Fournier, vd., 2006). Kombinasyonların in vitro etkinliğini ölçen testler dört gruba

ayrılmaktadır. Bunlar; checkerboard yöntemleri, Zamana Bağlı Öldürme (time-kill) yöntemleri, disk difüzyon yöntemi ve E test yöntemidir (Köksal, 2010). Dama Tahtası Yönteminin anlaşılmasının ve uygulanmasının kolay olması klinik laboratuvarlarda sinerji testleri arasında en sık kullanılan metot olmasına sebep olmuştur. Dama tahtası yöntemi; mikrodilüsyon, makrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri olmak üzere üç farklı şekilde uygulanabilmektedir. Time-kill yöntemi ise sadece mikroorganizma gelişiminin engellenmesi değil aynı zamanda mikrobisidal (öldürme eğrisi elde edilebilmesi nedeniyle) aktivite ölçümüde alabilen bir teknik olması nedeniyle sinerji testlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca dama tahtasında yönteminde 16-20 saat sonunda tek ölçüm alınmasının aksine, bu metotta zamanla birlikte değişen etki dinamik olarak gösterilebilmektedir. Disk difüzyon metodunda ise iki farklı antibiyotiğin ya da bitki ekstraktının emdirildiği diskler yan yana yerleştirilir uygun inkübasyon süresinin sonunda iki zon çapının birbirine bakan tarafında genişleme yada köprü oluşumu sinerji olarak tanımlanmaktadır (Bal, 1999).

Bu çalışmada bitki ekstraktlarının sinerjetik aktivitesinin araştırılması için kombinasyonda kullanılmak üzere iki antibiyotik seçilmiştir. Bu antibiyotikler ampisilin ve polimiksin B'dir. Gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkili olan ampisilin antibiyotiği geniş spektrumlu bir antibiyotik çeşidi olup, bakteri hücre duvarını yıkarak bakterinin aktivitesini bozmaktadır. İdrar yolları enfeksiyonu, orta kulak enfeksiyonu, zatürre, menenjit vb. hastalıkların tedavisinde özellikle *Escherichia coli* ve *Salmonellosis* gibi bazı bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır (Tısoğlu, 2016). Polimiksinler ise hücrenin dış membranı ve sitoplazmik membran üzerinde etkili olup, Gram negatif bakteriler üzerinde etki gösterirken, gram pozitif bakteriler üzerinde etki göstermemektedir. Son yıllarda oluşan çoklu ilaç direnci bulunan gram-negatif bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavilerinde yaşanan sorunlar polimiksinlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin neden olduğu hastalıkların tedavisinde Polimiksin B antibiyotikleri kullanılmaktadır. Ayrıca, pnömoni, cerrahi alan enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde de polimiksinler tercih edilmektedir (Olcay, 2017).

2.2.2. Bitkilerin Antibiyofilm Aktiviteleri

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışık şekilde bulunan kendi salgıladığı polimerik yapışkan bir yapıda yaşayan mikroorganizma topluluğuna denir (Ceyhan, 2008). Mikroorganizmalar, zeminlere tutunup çoğalırlar ve kendilerini hücre dışı polimerik maddelerden oluşan yapışkan matris içine gömerler. Bu yapılar biyofilm formunu oluşturmaktadır (Simoes, vd., 2010). Bakterilerin çoğu biyofilm oluşturma yeteneğindedir. Biyofilm oluşumu karmaşık bir biyolojik yapıdır ve genellikle ardışık safhalarda gerçekleşen bir işlemdir. İlk olarak planktonik bakteriler bir yüzeye bağlanır, daha sonra bağlı hücrelerin büyümesi ile mikrokoloniler oluşur ve son olarak mikrokoloniler gelişip birleşerek makrokolonileri oluşturmaktadırlar (Dheilly, vd., 2010). Bakterilerin farklı biyofilm türleri oluşturdukları bilinmekle birlikte bazen tek bir bakteri farklı çevresel koşullar altında birkaç farklı türde biyofilm oluşturabilmektedir (Karatan ve Watnick, 2009). Biyofilm oluşumu patojenik bakterilerin virülansı ile ilişkilidir ve biyofilm içinde yer alan bakteriler, planktonik bakterilere göre antibiyotik ve dezenfektanlara karşı 1000 kat daha dayanıklıdırlar (Donlan ve Costerton, 2002; Caraher, vd., 2007; Monds ve O'Toole, 2009). Biyofilm oluşumunda yer alan bakterilerin mikroçevre oluşturmaları, biyofilm içi genetik madde aktarımı, matriks yapıdan dolayı dışarıdan dezenfektan ve antibiyotik girişinin engellenmesi gibi sorunlar dirençliliği arttıran nedenler olarak sayılabilir (Augustin, vd., 2004; Ceyhan, 2008).

Bakteriyel patojenler arasında biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençlilik, bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir (Rogers, vd., 2010). Bakteriyel biyofilmler kronik veya dirençli enfeksiyonlara neden olurlar. Enfeksiyonlara neden olan bakteriler kateterler veya yapay eklemler gibi tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturmaları nedeniyle "Biyofilm infeksiyonları" olarak adlandırılırlar. Diş veya ağız içi yumuşak dokular üzerinde oluşan biyofilmler çürük, periodontitis ve mukozal gibi hastalıkların başlıca nedenlerindendir (Maezono, vd., 2011). Ayrıca biyofilmler özellikle bira, süt, taze ürünler, kümes hayvanları ve kırmızı et işletmeleri gibi gıda sanayi sektörlerinde de problem yaratmaktadır (Frank, vd., 2003; Jessen ve Lammert, 2003; Somers ve Wong, 2004; Chen, vd., 2007). Mikroorganizmalarda

biyofilm üretimi ve beraberinde gelen antibiyotik direnci yeni biyofilm oluşumunu giderici stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Sidhu, vd., 2001; Simoes, vd., 2006). Bu amaçla, mekanik yöntemler (kazıma gibi), biyofilm oluşumunu engelleyici sinyal mekanizmalarının bozulması, antibiyotik kaynaklarının kullanımı ve biyofilm oluşumunu teşvikleyen şeker vb. besin kaynaklarının giderimi gibi metotlar kullanılmaktadır. Bunlar arasından mekanik temizleme ve antibiyotik kullanımı en çok kullanılan metotlardır (Ceyhan, 2008). Mekanik temizleme yöntemindeki maliyetin yüksek olması ve biyofilm oluşan bölgeye ulaşamamak, biyosit ve dezenfektanların antibiyotik dirençli mikroorganizmalara karşı etkisiz kalması gibi sorunlar bu metotların dezavantajlı yönleridir (Stewart, vd., 2000; Thormann, vd., 2005; Ceyhan, 2008). Ortamlarda biyofilm oluşumunu teşvikleyen besinlerin giderilmesi üzerine çalışmalar yürütülmekle beraber bu strateji ortamdaki besinlerin kontrol edilemediği durumlarda ve ortamlarda kullanılamamaktadır (Thormann, vd., 2005; Ceyhan, 2008). Ancak bu stratejilerin çoğu hedef olan bakterileri öldürecek ya da sonlandıracak mekanizmalara dayanmamaktadır. Mikrobiyal kontrol ile ilgili alternatif arayışlarında özellikle bitkisel kaynaklı ürünler yaygın olarak dikkat çekmektedir (Packiavathy, vd., 2011). Bitkilerin biyoaktif ajanlar olarak potansiyel kaynak oldukları bilinmektedir (Murugan, vd., 2011). Bitkilerden elde edilen biyolojik olarak aktif bileşiklerin güvenilir olmaları, enfeksiyon tedavilerinde kullanılabilir olmaları ve etnofarmakolojik geçmişlerinin olması gibi nedenlerden dolayı yeni-alternatif, doğal antimikrobiyal- antibiyofilm ajan araştırmalarında yüksek kabul görmektedirler (Musthafa, vd., 2010; Packiavathy, vd., 2011).

2.2.3. Bitkilerin Antioksidan Aktiviteleri

Antioksidanlar, gıdada veya vücutta çok düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, vücutta dejeneratif hastalıkların başlatılması ve çoğaltılması veya gıda kalitesinin bozulmasına neden olan oksidatif süreçleri geciktiren, kontrol eden veya önleyen yedi grup maddedir. Antioksidanlar, sağlıklı bölgelerde vücudu oksidatif hasara karşı koruyabilme yetenekleri sayesinde hastalık riskini azaltma ve sağlık desteklerinde kullanılırlar. Bu tanıma uyan antioksidanlar, serbest radikal süpürücüler, singlet (tekli) oksijen sönümleyiciler, peroksit inaktivatörleri, metal iyonu kenetleme maddeleri,

sekonder oksidasyon ürünlerinin sönümleyicileri ve prooksidatif enzimlerin önleyicileridir (Shahidi ve Zhong, 2007).

Antioksidanlar doğal olarak farklı kaynaklardan üretilebilir veya farklı yollarla sentezlenebilir. Yüksek bitkiler ve bileşenleri, tokoferoller ve fenoller/polifenoller (baharatlar, otlar, meyveler, sebzeler, hububatlar, tahıllar, tohumlar, çaylar ve yağlarda bol bulunur) zengin bir doğal antioksidan kaynağı sağlar. Yosun, balık/kabuklu deniz hayvanları ve deniz bakterileri gibi deniz kaynaklı antioksidanlar da düşünülmüştür (Shahidi ve Amarowicz, 1996; Amarowicz, vd., 1999; Athukorala, vd., 2003).

Antioksidanların etkinliği genellikle yapısal özellikleri, konsantrasyonu, sıcaklığı, oksidasyon substratının türü, sistemin fiziksel durumu, prooksidanlar ve sinerjistlerden etkilenir (Yanishlieva-Maslarova, 2001). Bir antioksidanın kimyasal yapısı, serbest radikallere ve reaktif oksijen türlere (ROT) dolayısıyla antioksidan aktiviteye karşı esas reaktivitesini belirler. Antioksidanların etkinliği, konsantrasyonlarına ve sistemdeki konumlarına (ara yüzeydeki dağılım) da bağlıdır (Shahidi ve Zhong, 2011; Zhong ve Shahidi, 2011). Mekanizmalarına göre antioksidanlar birincil veya ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Birincil antioksidanlar, çoğalma veya başlatma evresine müdahale ederek lipid oksidasyonunu inhibe eden zincir kırıcı antioksidanlardır veya kararlı serbest radikalleri oluşturmak için serbest radikalleri alan β-parçalama tepkimeleridir. İkincil antioksidanlar, oksidasyonu geciktirmek için hava oksijeni veya katalitik metal iyonlarını bağlayarak zincirin oksidasyon başlatma oranını geciktiren koruyucu antioksidanlar olarak kabul edilir. İkincil antioksidanlar, birincil antioksidanlardan farklı olarak daha kararlı nonreaktif ürünleri serbest radikallere dönüştüremezler (Frankel, 2005; Chaiyasit, vd., 2007). Rice, vd. (1997), hem birincil hem de ikincil antioksidan olarak görev yapabilen karışık fonksiyonlu antioksidanların da bulunduğuna dikkat çekmiştir.

Bitkilerin üretmiş olduğu antioksidan özellik gösteren maddeler bitkilerin ürettiği fitokimyasallardır (flavonoidler, fenolik asitler ve karotenoidler vb.). Bitkilerce üretilen bu fitokimyasal antimikrobiyal, biyoinsektisit olma ve antibiyofilm vb. etkilerinin yanı sıra

serbest radikallere karşı koruyucu olma özelliklerini de bünyelerinde barındırmaktadırlar (Liu, 2004).

2.2.4. *Ajuga* Türleriyle Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Kökdil, vd. (2002), *Ajuga relicta* ekstrelerinden steroid, monoterpen, iridoid glikozit, diterpen, triterpen, oleanolic acid ve β-acetate konfigürasyonunda maddeler izole etmişlerdir.

Gören, vd. (2005), *Ajuga postii* ekstraktlarından elde edilen iridoid glikozit, triterpen ve steroid yapıda maddelerden sadece reptoside'in DNA hasarına yol açtığını ve dolayısıyla sitotoksik aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir.

Kırbağ, vd. (2005), *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *laevigata* türünün sadece *K. pneumonia* kültürüne karşı mukayese antibiyotiği Streptomisin'den yüksek antibakteriyel aktivitesini bildirmişlerdir.

Ulukanlı, vd. (2005), *A. chamaepitys* bitkisinin hekzan, aseton ve metanol ekstrelerinden metanol ekstresinin, *Mycobacterium smegmatis*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*; aseton ekstresinin, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *M. smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *K. pneumoniae* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu; hekzan ekstresinin ise *P. aeruginosa* ve *Candida albicans'*a karşı antimikrobiyal etki göstermediğini bildirmişlerdir.

Saraç ve Uğur (2007), *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktının test edilen Gram pozitif ve negatif bakterilerle *C. albicans* maya kültürüne karşı hiçbir inhibisyon göstermediğini tespit etmişlerdir.

Marc, vd. (2008), Lübnan'da halk arasında kullanılan bitkilerden olan *A. chia* ve *A. iva* (L.) bitkilerinin toprak üstü kısımlarının antiromatizmal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Israili ve Lyoussi (2009), *Ajuga* türlerinin fitoekdisteroid, neo-klerodan, diterpen, triterpen, anthosianidin-glikozit, iridoid glikozit, vithanolit, flavonoit ve trigliserit bileşenlerini içerdiğini bildirmişlerdir.

Ardekani, vd. (2010), *Ajuga chamaecistus* subsp. *tomentella* bitkisinin uçucu yağ analizlerinde kırk dört bileşik saptamakla beraber antimikrobiyal aktivite denemelerinde test edilen gram pozitif ve negatif bakterilere karşı herhangi bir antagonistik aktivitenin saptanamadığını bildirmişlerdir.

Türkoğlu, vd. (2010), *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* bitkisinin su, metanol ve kloroform ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlar ve su ekstresinin diğerlerinden yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca *A. chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* bitkisinin metanol ekstraktının *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* DSM 50071, *K. pneumonia* FMC 5, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Candida* spp. ve *Saccharomyces cerevisiae* test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Metanol ekstraktının *E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia* ve *E. aerogenes* test bakterilerine karşı mukayese antibiyotiği ampisilinden yüksek antagonistik aktivitelerini tespit etmişlerdir.

Chandel ve Bagai (2011), *Ajuga bracteosa* etanol ekstresinin yüksek antiplazmodiyal aktivitesini tespit etmişlerdir.

Delazar, vd. (2011), İran'da yetişen *A. chamaepitys* türünde yaptıkları çalışmalarında, esansiyel yağ kompozisyonuyla antioksidan aktivite gösteren fenolik glikozitlerini izole etmişlerdir. Ekstraktlar arasında en yüksek serbest radikal temizleme aktivitesini MeOH ekstresinde saptamışlardır.

Miti´c, vd., (2011), Vidlic Dağı'nda (Sırbistan) normal çevre koşulları (NEC) ve yangın sonrası çevre koşulları (PFEC) içeren iki komşu bölgeden topladıkları *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkilerinin esansiyel yağlarının fitokimyasal bileşenlerini GC ve GC/MS aracılığıyla incelemişler ve NEC bölgesinden toplanan bitki esansiyel yağında otuz sekiz PFEC bölgesinden toplanan bitki esansiyel yağında otuz dört bileşen saptamışlardır. Bu fitokimyasal bileşenlerin, NEC ve PFEC bölgesinden toplanan örneklerde sırasıyla a-pinen (%10.9, %5.4), b-pinen (%22.0, %14.8), germacrene D (%16.2, % 26.8), germacrene B (%5.9, %13.6) ve viridiflorol (%6.0, % 5.7) olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu bitkilere ait esansiyel yağların antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve her iki yağ numunesinin de Fe (III)'ün Fe (II)'ye ve Mo (VI)'nın Mo (V)'ye indirgenmesinde yaklaşık olarak eşit ve orta aktiviteye ve zayıf radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Haşimi (2012), endemik *Ajuga vestita* ve *Ajuga xylorrhiza* bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin antimikrobiyal, antioksidan, antikolinesteraz, mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri araştırdığı çalışmasında; her iki bitkinin aseton ekstraktlarının *Streptococcus pyogenes* üzerinde orta derecede, *A. xylorrhiza* aseton ekstresinin *E. coli* üzerinde orta derecede, aynı bitkinin metanol ekstresinin de *P. aeruginosa* üzerinde düşük derecede olmakla birlikte mukayese antibiyotiği vankomisinden yüksek antibakteriyel aktivitesini saptamıştır. Ayrıca ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoit miktarları kuersetine eşdeğer olarak tayin edilmiş ve antioksidan aktivite tayininde tüm ekstrelerin yüksek antioksidan aktiviteleri ortaya konmuştur. Bununla birlikte her iki bitkinin aseton çözgeninde yüksek antikolinesteraz ve antimutajenik aktiviteleride belirlenmiştir.

Yumrutaş, vd. (2012) *A. chamaepitys* bitkisinden uçucu yağ analizi ve in vitro DNA koruma ve antioksidan aktivitelerini belirlemek için yaptıkları çalışmada; uçucu yağın GC-MS analizleri sonucunda, toplam yağın % 99.0'ını temsil eden yirmi dört farklı bileşik saptanmıştır [β-pinen (% 19,5), Epoksi allo-alloaromadendren (% 12,6) α-pinen (% 11,2) ve Ekaryofilen (% 8,4) monoterpen hidrokarbonlar (% 34.6) ve ardından seskiterpen hidrokarbonlar (% 22.0)]. Ayrıca uçucu yağların yüksek DNA koruma aktivitesinin yanında doğal bir antioksidan olabileceği de önerilmiştir.

Mamadalieva, vd. (2013), *Ajuga turkestanica* bitki türünün metanol, kloroform, bütanol ve su ekstraktlarının fitokimyasal içeriklerinin yanı sıra antioksidan, sitotoksik ve antibakteriyel aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında su ve bütanol özütlerinin 7.24 ± 0.82 ve 14.57 ± 1.64 µg/mL $IC_{50\ değerleri}$ ile yüksek antioksidan aktivitesini; kloroform özütünün, sırasıyla 7.13 ± 0.85, 9.03 ± 0.92 ve 10.77 ± 1.44 µg / mL IC_{50} değerleriyle kanser hücre hatları HeLa, HepG-2 ve MCF-7'ye karşı güçlü sitotoksik etkilerini saptamışlardır. Bununla birlikte kloroform özütünün, *S. aureus* MRSA 1000/93 ve *S. pyogenes* ATCC 12344 bakterilerine karşı yüksek antimikrobiyal aktivitesini ortaya koymuşlardır. *A. turkestanica*'nın metanol ve kloroform özütlerinin, GLC/FID ve GLC/ analizlerinde Pregna-4,9 (11) -dien-20-ol-3-on-19-oik asit lakton (% 19.58), 20-metil-pregna-5,17-dien-3β-ol (% 12.93), 3 7-dioxocholan-24-oic asit (% 10.53) ve betulin (% 10.18) ana bileşenlerin varlığı tespit edilmiştir.

Duran (2015), Muğla yöresinde çay olarak tüketilen *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia*, bitkisine ait etanol ekstraktlarının antimutajenik, antiproliferatif, antikaryojenik, antibiyofilm ve hemostatik aktivitelerini araştırmıştır. Bitkinin % 97.50 oranla yüksek mutajenite, *Streptococcus gordonii* bakterisine karşı zayıf antikaryojenik ve % 64.15 oranla yine aynı bakteriye karşı yüksek antibiyofilm aktivite gösterdiği bununla birlikte hemostatik aktivitesinin olmadığı saptanmıştır.

Göger, vd. (2015), *A. orientalis'in* fitokimyasal bileşenlerini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında *C. albicans* ATCC 90028 ve *Candida tropicalis* ATCC 1369, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 maya kültürlerine karşı metanol ekstresinin yüksek MİK değerini tespit etmişlerdir. Ayrıca bitkinin DPPH radikali süpürme aktivitesi IC50 = 0.4 ± 0.02 mg/ mL olduğu belirtilmiştir.

Jakovljević, vd. (2015), *A. chamaepitys* (L.) Schreb. subsp. *chamaepitys* su, metanol, aseton, etil asetat ve petrol eter olmak üzere toplam 5 ekstraktı ile çalışmışlar ve en yüksek toplam fenolik madde (57.02 ± 0.61 mg GA/g) ve flavanoid madde (91.76 ± 0.81 mg RU/g) içeriğini etil asetat ekstraktından elde etmişlerdir. Bununla birlikte DPPH metodu kullanılarak yapılan antioksidan aktivite testinde en yüksek değerin aseton

ekstraktında olduğunu tespit etmişlerdir (SC_{50} değer = 330.52 µg/mL). Ayrıca bu bitki türüne ait 5 farklı ekstraktının toplam 13 test bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlar ve Gram negatif bakterilere karşı zayıf antagonistik etki tespit etmişlerdir. Bununla birlikte Gram negatif bakteriler arasında en güçlü etki aseton ekstraktında *Proteus mirabilis* ve *P. mirabilis* ATCC 12453'e (MIC= 10 mg/mL) karşı elde edilmiştir. Gram pozitif bakterilerde genel olarak daha güçlü bir antimikrobiyal etki gözlenmiş ve özellikle metanol, aseton ve etil asetat ekstraktlarının *Bacillus cereus* (MİK ve MMK=1.25 mg/mL), *S. aureus* ATCC 25923 ve *B. subtilis* IP 5832 (MIK ve MMK=2.5 mg/mL) bakterilerine karşı güçlü antibakteriyel etkisi saptanmıştır.

Movahhedin, vd. (2016), *A. chamaecistus* subsp. *scoparia* (Boiss.) bitki türünün antidiyabetik, anti-Alzheimer hastalıkları, cilt koruyucu ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre *A. chamaecistus* subsp. *scoparia* türünün diyabet, Alzheimer ve cilt rahatsızlıklarında bulunan bazı enzimleri inhibe edebileceği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bitki türünün radikal bir çöpçü olarak da hareket edebileceğini bildirmişlerdir. Bu türün antioksidan yeteneği ise yüksek indirgeme gücü ve metal şelatlama aktivitesi ile doğrulanmıştır. Bitkinin uçucu yağının GC ve GC / MS analizi ve ekstraktların HPLC analizi ile bitkide, önemli biyolojik olarak aktif bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir.

Venditti, vd. (2016), *A. chamaepitys* bitkisinin fitokimyasal yapısını ve antioksidan, sitotoksik aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında; monoterpen glikozitlerini analiz etmişler ve 2 tanesi ilk kez kaydedilen (5 ve 8 nolu maddeler) ajugoside (1), reptoside (2), 8-O asetilharpagide (3), harpagide (4), 5-O-β-D-glukopiranosil-harpagid (5), asperulosidik asit (6), deasetil asperulosidik asit (7) ve 5-O-β-D-glikopiranosil-8-O-asetilharpagid (8), maddelerini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda antioksidan aktivite bakımından *A. chamaepitys* bitkisinin polar özütlerinin uçucu yağından daha yüksek antioksidan aktivitesi olduğunu; uçucu yağ ve etanolik özütlerin ise, MDA MB 231 hücre hattında sırasıyla 36.88 ve 59.24 µg / mL IC_{50} ve CT116 üzerinde sırasıyla 60.48 ve 64.12 µg / mL IC_{50} değerleri ile tümör hücrelerinde orta derecede sitotoksik aktivitelerini bildirmişlerdir.

Salem (2017), *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktları farklı test mikroorganizmalarına karşı denenmiş ve *B. subtilis* DSMZ 1971, *S. aureus* ATCC 25923, ve *S. epidermidis* DSMZ 20044 test bakterilerine karşı yüksek antibakteriyel aktivitesi tespit edilmiştir.

Medjeldi, vd. (2018), *Ajuga iva* bitki türünün fitokimyasal bileşenlerini (polifenoller, flavonoidler ve yoğunlaştırılmış tanenler) değerlendirmek ve biyolojik aktivitelerini (antioksidan, antibakteriyel ve antiviral) test etmek için yapmış oldukları çalışmalarında; DPPH yöntemi ile test edilen antioksidan aktivite IC_{50} değeri 0,43 ± 0,03 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Antibakteriyel ve antiviral test denemelerinde ise sırasıyla Metisilin Dirençli *S. aureus* (MRS), *B. cereus* ve *S. aureus* ve Coxsackie Virus tip B-3 (CVB-3), Adenovirus tip 5 (ADV-5), Respiratory Syncytial Virus tip B (RSV-B) ve Herpes Simplex Virus tip 2 (HSV-2), Coxsackie Virus'a karşı antagonistik etki bildirilmiştir.

Toiu, vd. (2019), *A. genevensis* ve *A. reptans* bitki türlerinin in vivo anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve biyoaktif bileşikler bileşenlerini incelemişlerdir. *A. reptans* petrol eteri özütünün *Aspergillus niger* ve *C. albicans'a* karşı güçlü antifungal aktivitesini, her iki bitki türünün etanol ekstraktlarının antienflamatuar etkisini tespit etmişlerdir. Aynı zamanda iki bitki türünün tüm ekstrelerinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Yılmaz (2019), *A. chamaepitys* (L.) bitki türünün Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) analiz yöntemi kullanılarak etanol ekstresi içinde bulunan bileşikleri incelemiştir. Çalışmada, tespit edilen on beş fito bileşen içinde en bol bulunan bileşiklerin, ökaliptol, tujon, endoborneol, davana eteri ve oktakozan olduğunu ve bu bileşiklerin hemoroit, mide ağrısı, sarılık ve iltihaplı hastalıklar gibi çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Kaplan (2020) çalışmasında, *A. chamaepitys* subsp. *laevigata* ve *A. bombycina* bitki türlerinin biyoaktif bileşenleri araştırmış ve terapötik değeri yüksek olan fitokimyasallar

tespit etmiştir. Özellikle bitkilerde tespit ettiği selidoniol, heptacosane ve docosane moleküllerinin büyük miktarda bulunması sebebiyle ilaç sektöründe kullanılabilecekleri sonucuna varmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Örnek Toplanması ve Teşhis

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Kampüsü'nden Mayıs 2019'da toplanan *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisi (Şekil 1) Doç. Dr. Ersin KARABACAK tarafından Türkiye Florası'ndan (Davis, vd., 1988) yararlanılarak teşhis edilen materyalin bir örneği Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Herbaryumunda muhafaza edilmektedir (Tablo 1).



Şekil 1. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin genel görünümü ve çiçek görüntüsü (Orijinal)

Tablo 1

Çalışmada kullanılan bitki örneği

Tür	**Toplanılan Alan**
A. chamaepitys subsp. *chia* (Schreb.) Arcang	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Kampüsü, 40° 6′36.67″ N; 26° 25′ 1.54 ″ E, Yükseklik 90 m

3.2. Yöntem

3.2.1. Ekstraktların Elde Edilmesi

Oda sıcaklığında kurutma işleminden sonra bitki materyali mekanik parçalayıcı yardımıyla toz haline getirilmiş ve 15 g'lık örnekler halinde 150 mL'lik etanol, metanol, aseton ve etil asetat (% 96) çözgenleri ile sırasıyla Soksilet cihazında 12 saat boyunca ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Evaporatör yardımıyla çözgenleri uçurulan ekstraktlar dimetil sülfoksit (DMSO) ile farklı konsantrasyonlarda çözülerek, filtrasyon işlemiyle steril edilerek deneye hazır hale getirilmiştir (Kaur, vd., 2002; Boubaker, vd., 2010).

Bitki ekstraktlarının verim analizleri Güner (2011)'e göre belirlenmiştir. Tüm ekstraktların ürün verimliliği aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

Verim (%) = Ekstrakt ağırlığı (g) / 15 g toz bitki örneği x 100

3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Tayin Yöntemleri

Tüm antimikrobiyal aktivite ve antibiyofilm çalışmalarında ÇOMÜ Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı NHD Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiş olan *E. coli* NRRL B-3704, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923,

S. haemolyticus ATCC 43252, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ATCC 13315, *A. baumannii* ATCC 19606 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizma kültürleri kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite denemelerinin birinci basamağında disk difüzyon metodu (Bauer, 1966) ile bitki ekstraktları antimikrobiyal aktivite bakımından var yok denemesine tabi tutulmuştur. Uygun inkübasyon sürelerinin sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve kontrol antibiyotikleri [Penisilin (P10:10µg/disk) ve Nistatin (NY100:100 µg/disk)] ile mukayese edilmiştir (CLSI, 2006).

Bitki ekstraktlarının mikrobiyostatik etkilerinin ortaya konması amacıyla mikrodilüsyon metodu (Wikler, 2006) kullanılarak tüm test mikroorganizmaları için Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. MİK ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde Mikroplaka Okuyucu cihazında 550 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. MİK değeri ve üremenin olmadığı MİK değerinin üstündeki plak kuyucuklarından Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine nokta ekimler yapılarak inkübasyona tabi tutulmuş ve üremenin olmadığı konsantrasyon, bakteriler için Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK), maya kültürü içinde Minimum Fungisidal Konsantrasyon (MFK) kabul edilmiştir.

Franksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonunun (FİK) Belirlenmesi

Bitki ekstraktları ve geleneksel antimikrobiyal ilaç kombinasyon etkileşimlerinin ortaya konması için Van Vuuren ve Viljoen, (2011) tarafından tasarlanan "Dama Tahtası (Checkerboard)" metodu kullanılmıştır. Bitki ekstraktları ve FIK metodunda kullanılacak Polimiksin ve Ampisilin antibiyotiklerinin MİK değerleri belirlendikten sonra çift kat olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlanmış ve Dama tahtası metoduna göre yapılan kombinasyonlardaki MİK değerleri ölçülmüştür. Buna bağlı olarak alınan FİK (∑FİK) toplamı hesaplamasında; (a) bitki örneğini ve (b) geleneksel antimikrobiyal numunesini temsil ederek FİK hesaplanmıştır (Van Vuuren ve Viljoen, 2011).

FİK A=B'nin varlığında A'nın MİK sayısal değeri / Tek başına A'nın MİK sayısal değeri

FİK B=A'nın varlığında B'nin MİK sayısal değeri / Tek başına B'nin MİK sayısal değeri

ΣFİK indeksi = FİK A+ FİK B

Kombinasyonların etkinliği ΣFİK ≤ 0.5 ise sinerji, 0.5 < ΣFİK > 1 ise kısmi sinerji, ΣFİK = 1 ise aditif, 1 < ΣFİK > 4 ise etkisiz, ΣFİK ≥ 4 ise antagonizma olarak değerlendirilmiştir (Subaşı, 2020).

Zamana Bağlı Kinetik Öldürme Testi (Time-kill)

Time kill metoduna göre test mikroorganizmaları bitki ekstraktları ile Mueller Hinton Broth (MHB, OXOID, UK) besiyerlerinde inkübasyona tabi tutulmuş ve inkübasyon sırasında 2, 4, 6 ve 24 saat aralıklarla tüplerden alınan numuneler uygun seyreltmeler sonunda MHA besiyerine ekimleri yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda sayılan koloniler kob/mL olarak kaydedilmiştir. Elde edilen değerler $\log_{10}$ dönüştürülerek bakterisidal etkinin zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak irdelenmesine çalışılmıştır. Bakteri sayısında 10^3(3- $\log_{10}$) azalma bakterisidal etki olarak değerlendirilmiştir (Subaşı, 2020).

3.2.3. Antibiyofilm Aktivite Tayini

Elde edilen ekstraktların MİK ve MİK altı konsantrasyonlarda test mikroorganizmalarının biyofilm oluşturma kapasitelerini engelleyici etkisi mikroplaka

biyofilm metodu (Merritt, vd., 2005) ile tespit edilmiştir. Ekstraktların antibiyofilm etkisinin ölçülmesi yüzde indirgeme formülasyonu ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{örnek} / A_{kontrol}) x100$$

$A_{kontrol}$: Kontrol reaksiyonunun absorbansı

$A_{örnek}$: Test bileşiklerinin absorbansı

3.2.4. Antioksidan Aktivite Tayini

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemek için Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH) ve Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Belirleme Tayini (CUPRAC) metotları kullanılmıştır.

DPPH tayini için Blois (1958) tarafından geliştirilen metot, CUPRAC için ise Apak, vd., (2005) tarafından dizaynı yapılan metot kullanılmıştır. DPPH ve CUPRAC ölçümü için sırasıyla 517 nm ve 470 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır.

Hazırlanan örneklerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerinden inkübasyon değerleri absorbans değerleri (A): % inhibisyon=(A kontrol-A örnek)/ A kontrol x 100 göre hesaplanmıştır. Standart olarak BHT kullanılmıştır. Tüm denemeler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş olup; DPPH sonuçlarının hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{örnek}) / A_{kontrol} \times 100$$

3.2.5. Veri Analizi

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisine ait ekstraktlar ile tüm biyolojik aktivite denemeleri üç tekrarlı yapılmış ve elde edilen tüm verilerin Microsoft Excel programı kullanılarak ortalama ve standart sapma değerleri alınmıştır.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Ekstraktların Ürün Verimlilikleri

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin 4 farklı çözgenle gerçekleştirilen ekstraksiyonları sonrası ürün verimliliği bulguları Tablo 2'de verilmiştir. Ürün verimliliği bakımından en yüksek verimliliğin metanol çözgenin de, en düşük verimliliğin ise etil asetatla yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edildiği saptanmıştır.

Tablo 2

Ekstraktların ürün verimliliği

Çözgen	**Ekstrakt ağırlığı**	**Verim (%)**
Etanol	1.31	8.75
Metanol	2.30	**15.39**
Aseton	0.27	**10.40**
Etil asetat	1.56	1.86

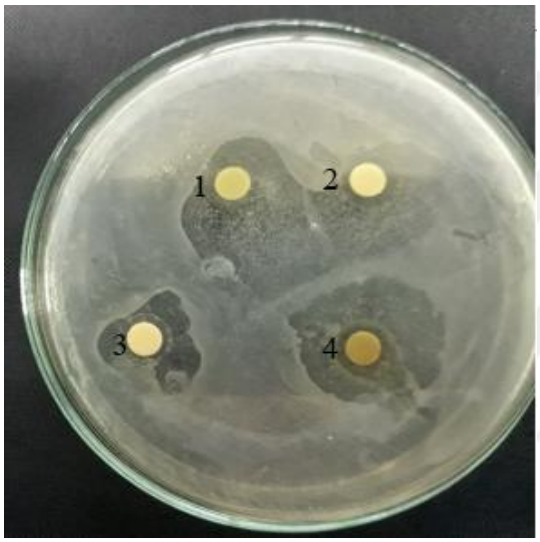
4.2.Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

4.2.1. Bitki Ekstraktlarının Disk Difüzyon, MİK, MBK Bulguları

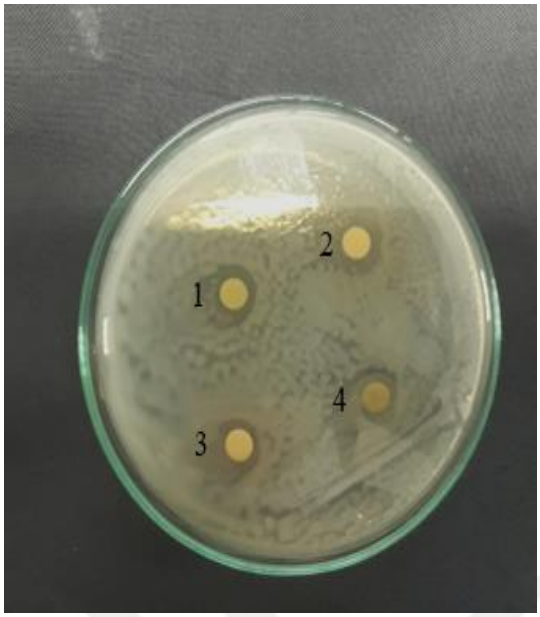
A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisine ait antimikrobiyal aktivite bulguları Tablo 3'de verilmiştir. Disk difüzyon metodu ile yapılan taramada *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin tüm ekstraktlarının *E. coli* NRRLB 3704 (Şekil 5) (etanol hariç), *P. vulgaris* ATCC 13315 (etil asetat hariç), *B. subtilis* ATCC 6633, *S. haemolyticus* ATCC 43252 (metanol hariç), *A. baumannii* ATCC 19606 (aseton ve etil asetat hariç), *S. aureus* ATCC 43252 (metanol, aseton ve etil asetat hariç) ve *C. albicans* ATCC 10231 (metanol hariç) test kültürlerine karşı mukayese antibiyotiği P10 ve NY100'den düşük olmakla beraber antagonistik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bitki numunesinin metanol ve etil asetat ekstraktlarının sırasıyla *S. haemolyticus* ATCC 43252 (Şekil 3) ve *P. vulgaris*

ATCC 13315 ve *A. baumannii* ATCC 19606 (Şekil 4) bakterilerine karşı P10 mukayese antibiyotiğine benzer etki gösterdiği belirlenmiş olup; tüm ekstraktların, *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Şekil 2) ve *S. aureus* ATCC 43252 bakterilerine (etanol hariç) karşı ise P10 antibiyotiğine nazaran daha yüksek antibakteriyel etkisi tespit edilmiştir.

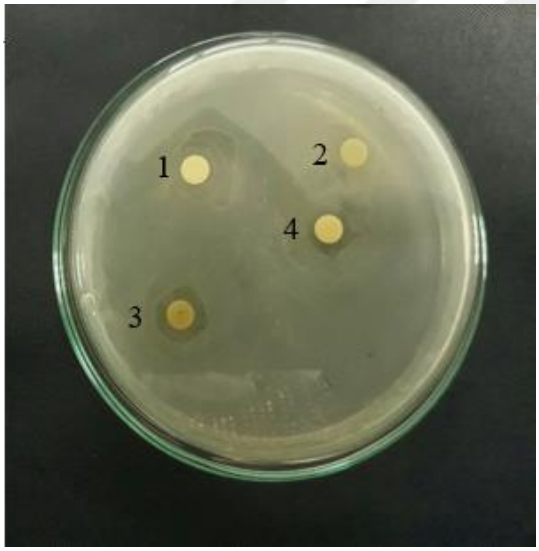
Kontrol olarak sadece etanol, metanol, aseton ve etil asetat emdirilen disklerde zon çapı 0-1 mm olarak ölçülmüştür.



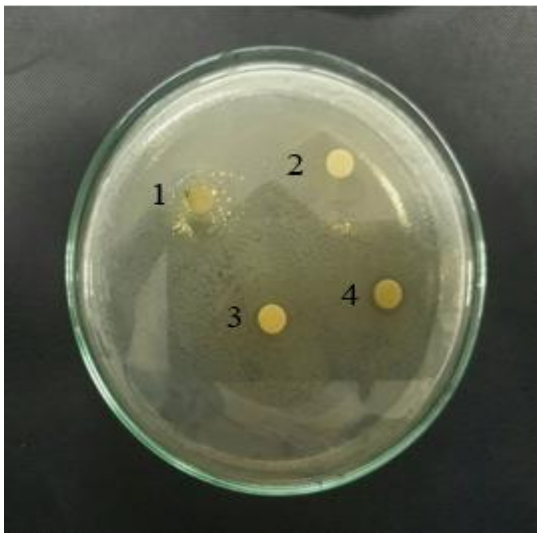
Şekil 2. Bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları; 1: aseton, 2: etanol, 3: metanol, 4: etil asetat



Şekil 3. Bitki ekstraktlarının *S. haemolyticus* ATCC 43252 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları; 1: metanol, 2: aseton, 3: etil asetat, 4: etanol

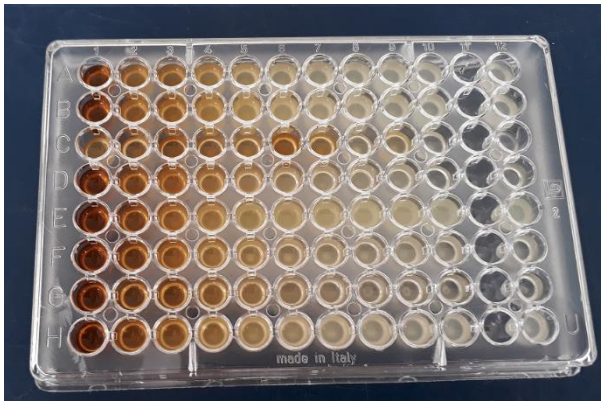


Şekil 4. Bitki ekstraktlarının *A. baumannii* ATCC 19606 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları; 1: metanol, 2: aseton, 3: etil asetat, 4: etanol

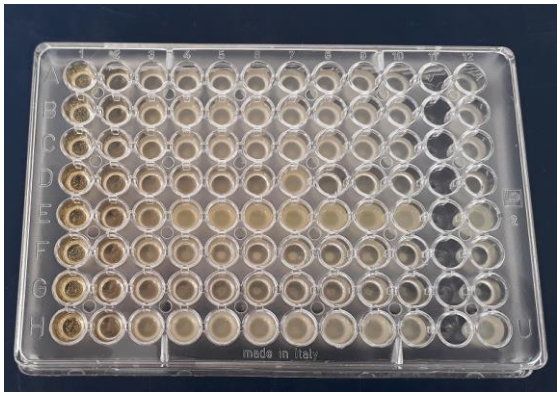


Şekil 5. Bitki ekstraktlarının *E. coli* NRRLB 3704 test bakterisine karşı disk difüzyon bulguları; 1: etil asetat, 2: etanol, 3: metanol, 4: aseton

Bitki ekstraktlarının tüm test mikroorganizmalarına karşı 1,25-40,0 µg/mL arasında değişen oranlarda MİK değerleri saptanmıştır (Tablo 3; Şekil 6; Şekil 7). Tüm ekstraktların 1,25 µg/mL'lik MİK değeri ile E. *coli* NRRLB 3704, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. haemolyticus* ATCC 43252 bakterilerine karşı mukayese antibiyotiği S10'dan daha düşük MİK değeri verdiği; aynı durumun etanol, metanol ve aseton ekstraktlarında *P. vulgaris* ATCC 13315, *A. baumannii* ATCC 19606 bakterilerine karşı elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca disk difüzyon metodunda elde edilen verilerden farklı olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı 4 ekstrakttan elde edilen MİK değerlerinin mukayese antibiyotiği S10'dan düşük olduğu belirlenmiştir.

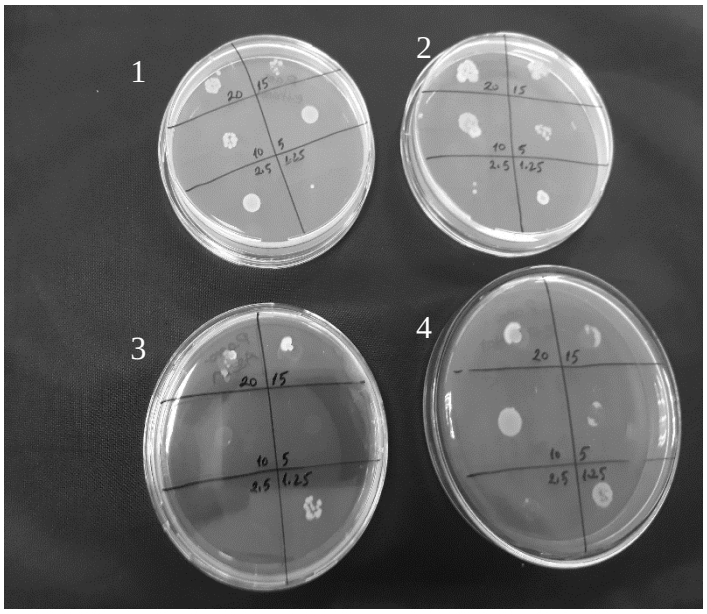


Şekil 6. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktının MİK bulguları

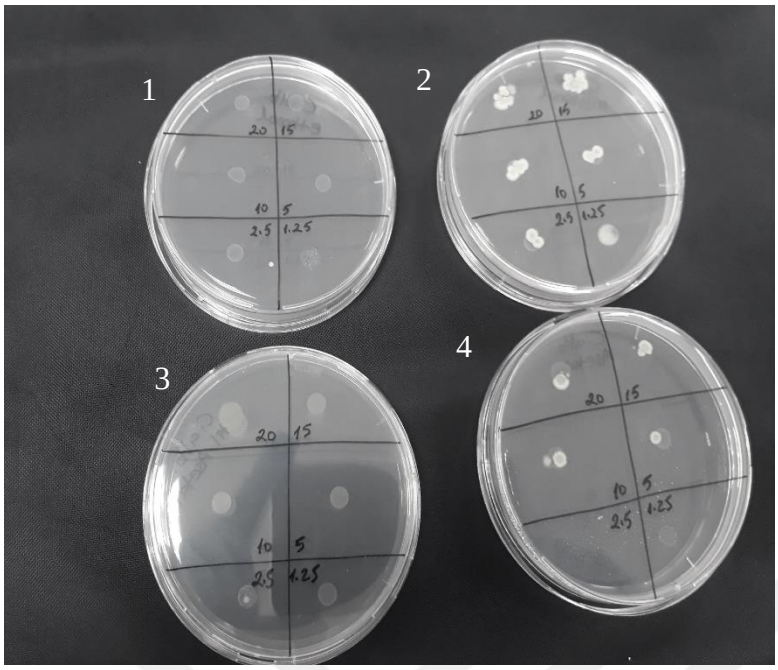


Şekil 7. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinin metanol ekstraktının MİK bulguları

A. chamaepitys subsp. *chia* bitki ekstraktlarının MBK değerleri 1.25-40 µg/mL arasında değişim gösterirken; en düşük MBK değerinin (1.25 µg/mL) *E.coli* NRRLB 3704 (etanol, aseton ve etil asetat), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Şekil 8), *P. vulgaris* ATCC 13315, *S. haemolyticus* ATCC 43252 ve *C. albicans* ATCC 10231 (Şekil 9) test mikroorganizmalarına karşı etanol ekstraktında elde edildiği saptanmıştır (Tablo 3).



Şekil 8. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterisine karşı MBK bulguları; 1: etanol, 2: metanol, 3: aseton, 4: etil asetat



Şekil 9. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki ekstraktlarının *C. albicans* ATCC 10231 maya kültürüne karşı MFK bulguları; 1: etanol, 2: metanol, 3: etil asetat, 4: aseton

Tablo 3

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite bulguları

Test Mikroorganizmaları	Antimikrobiyal Test Yöntemleri																			
	*Disk Difüzyon[a]						MİK						MBK/MFK				MBK ya da MFK/MİK			
	Bitki Ekstraktları (mm)				Kontrol (mm)		Bitki Ekstraktları (µg/mL)				Kontrol		Bitki Ekstraktları (µg/mL)				Bitki Ekstraktları			
	E1	**E2**	**E3**	**E4**	**P10**	**NY100**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**S10**	**NY100**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
E. coli NRRLB 3704	0	7.0	13.0	8.0	16.0	D	**1.25**	**1.25**	**1.25**	**1.25**	4.0	D	1.25	40.0	1.25	1.25	1.0	32.0	1.0	1.0
P. aeruginosa ATCC 27853	**11.0**	**19.0**	**24.0**	**18.0**	8.0	D	1.25	1.25	1.25	40.0	1.0	D	1.25	40.0	40.0	40.0	1.0	32.0	32.0	1.0
P. vulgaris ATCC 13315	10.0	12.0	9.0	13.0	13.0	D	**1.25**	**1.25**	**1.25**	40.0	4.0	D	1.25	40.0	40.0	40.0	1.0	32.0	32.0	1.0
B. subtilis ATCC 6633	11.0	7.0	8.0	13.0	14.0	D	**1.25**	**1.25**	**1.25**	**1.25**	2.0	D	40.0	40.0	40.0	40.0	32.0	32.0	32.0	32.0
S. haemolyticus ATCC 43252	12.0	14.0	12.0	9.0	14.0	D	**1.25**	**1.25**	**1.25**	**1.25**	4.0	D	1.25	40.0	40.0	40.0	1.0	32.0	32.0	32.0
A. baumannii ATCC 19606	11.0	7.0	**13.0**	12.0	12.0	D	**1.25**	**1.25**	**1.25**	40.0	4.0	D	40.0	40.0	40.0	40.0	32.0	32.0	32.0	1.0
S. aureus ATCC 6538P	14.0	**16.0**	**25.0**	**24.0**	15.0	D	**1.25**	**1.25**	40.0	40.0	5.0	D	40.0	40.0	40.0	40.0	32.0	32.0	1.0	1.0
C. albicans ATCC 10231	11.0	0	13.0	8.0	D	16.0	**1.25**	**1.25**	40.0	40.0	D	2.5	1.25	40.0	40.0	40.0	1.0	32.0	1.0	1.0

E1: Etanol, E2: Metanol, E3: Aseton, E4: Etil asetat; (*): Rakamlar Inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir. P10 = Penisilin (10ug/disc); NY100: Nistatin (100 ug/disc); S10: Streptomisin (10 ug/disc); D: Denenmedi

4.2.2.Bitki Ekstraktlarının FİK Bulguları

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin farklı test kültürlerine karşı etanol+polimiksin B, metanol+polimiksin B, aseton+polimiksin B, etil asetat+polimiksin B ve etanol+ampisilin, metanol+ampisilin, aseton+ampisilin, etil asetat+ampisilin kombinasyonlarının dama tahtası metoduna göre FİK bulguları Tablo 4, 5, 6 ve 7'de verilmiştir. Tüm test kültürlerine karşı tüm kombinasyonlarda antagonistik etki tespit edilmiştir.

Tablo 4

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin etanol ekstraktının fik bulguları

Test kültürü	**Kombinasyon**	**ΣFİK indeksi**	**Etki**	**Kombinasyon**	**ΣFİK indeksi**	**Etki**
***E.coli* NRRLB 3704**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. aeruginosa* ATCC 27853**	**E1+Polimiksin B**	24	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. vulgaris* ATCC 13315**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***A. baumannii* ATCC 19606**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***B. subtilis* ATCC 6633**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***S. aureus* ATCC 6538P**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	24	Antagonist
***S. haemolyticus* ATCC 43252**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist
***C. albicans* ATCC 10231**	**E1+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E1+ Ampisilin**	6	Antagonist

E1: Etanol

Tablo 5

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin metanol ekstraktının fik bulguları

Test kültürü	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki
***E.coli* NRRLB 3704**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. aeruginosa* ATCC 27853**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. vulgaris* ATCC 13315**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***A. baumannii* ATCC 19606**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***B. subtilis* ATCC 6633**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	12	Antagonist
***S. aureus* ATCC 6538P**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***S. haemolyticus* ATCC 43252**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist
***C. albicans* ATCC 10231**	**E2+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E2+ Ampisilin**	6	Antagonist

E2: Metanol

Tablo 6

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin aseton ekstraktının fik bulguları

Test kültürü	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki
***E.coli* NRRLB 3704**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. aeruginosa* ATCC 27853**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. vulgaris* ATCC 13315**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***A. baumannii* ATCC 19606**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***B. subtilis* ATCC 6633**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***S. aureus* ATCC 6538P**	**E3+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	5.03	Antagonist
***S. haemolyticus* ATCC 43252**	**E3+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	6	Antagonist
***C.albicans* ATCC 10231**	**E3+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E3+ Ampisilin**	5.03	Antagonist

E3: Aseton

Tablo 7

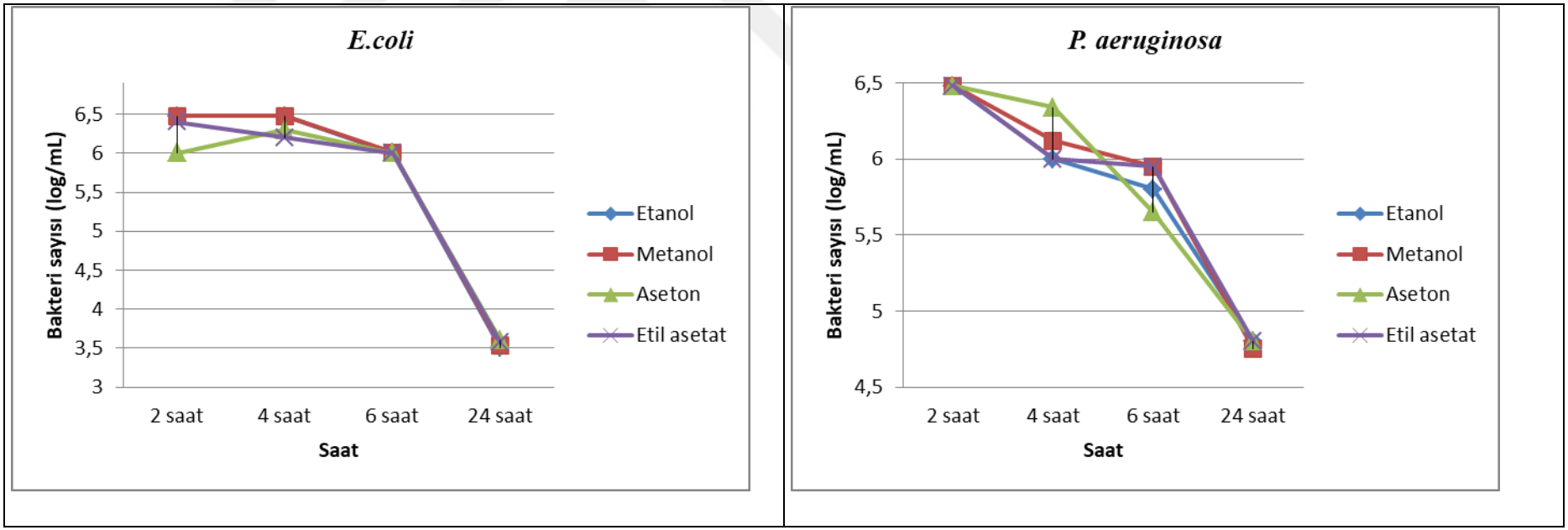
A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin etil asetat ekstraktının fik bulguları

Test kültürü	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki	Kombinasyon	ΣFİK indeksi	Etki
***E.coli* NRRLB 3704**	**E4+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	6	Antagonist
***P. aeruginosa* ATCC 27853**	**E4+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	5.03	Antagonist
***P. vulgaris* ATCC 13315**	**E4+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	5.03	Antagonist
***A. baumannii* ATCC 19606**	**E4+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	5.03	Antagonist
***B. subtilis* ATCC 6633**	**E4+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	6	Antagonist
***S. aureus* ATCC 6538P**	**E4+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	5.03	Antagonist
***S. haemolyticus* ATCC 43252**	**E4+Polimiksin B**	6	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	6	Antagonist
***C.albicans* ATCC 10231**	**E4+Polimiksin B**	5.03	Antagonist	**E4+ Ampisilin**	5.03	Antagonist

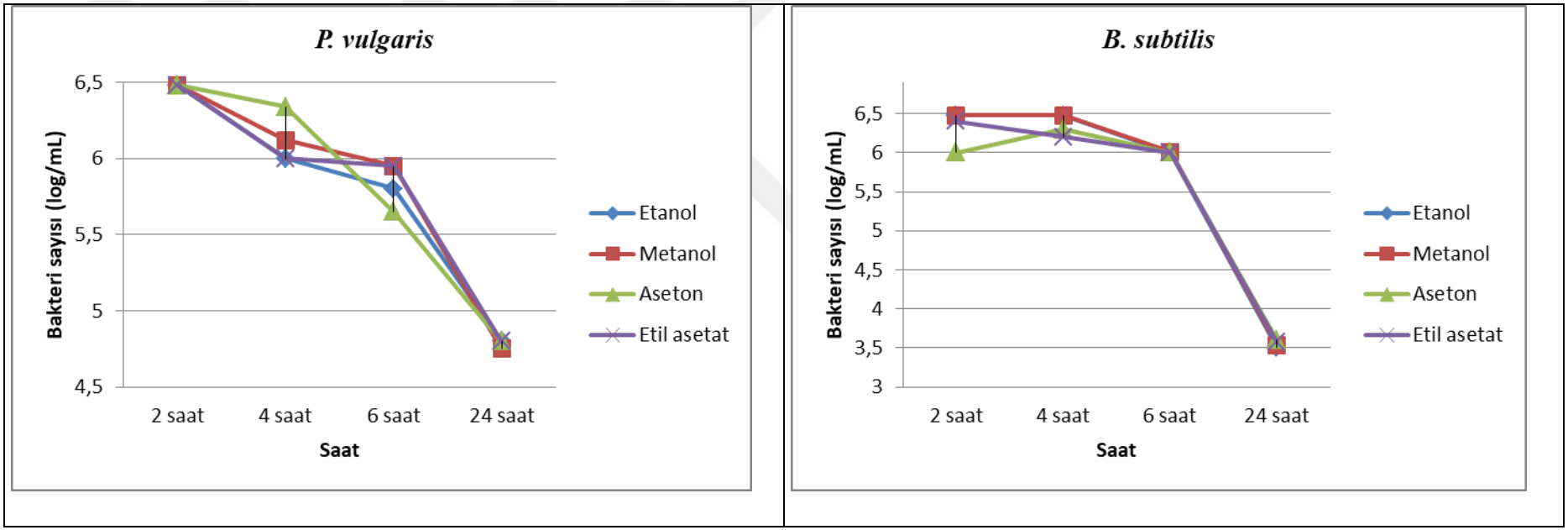
E4: Etil asetat

4.2.3. Zamana Bağlı Kinetik Öldürme Testi Bulguları

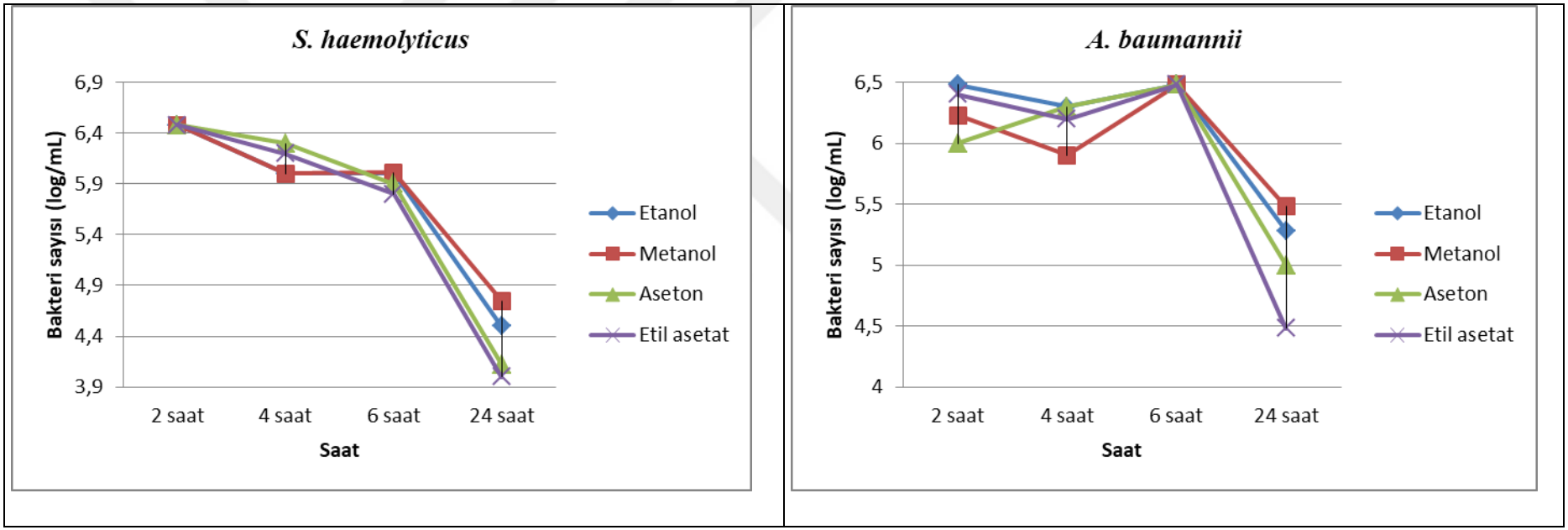
Dört farklı bitki ekstraktının zamana bağlı kinetik öldürme testi bulguları her bir test kültürü için Şekil 10, 11, 12 ve 13'de verilmiştir. Her bir bakteri ve maya kültürü için saate bağlı periyodik bir azalma tespit edilmiş olup, tüm kültürler için kayda değer mikrobisidal etkinin 24 saat sonunda elde edildiği saptanmıştır.



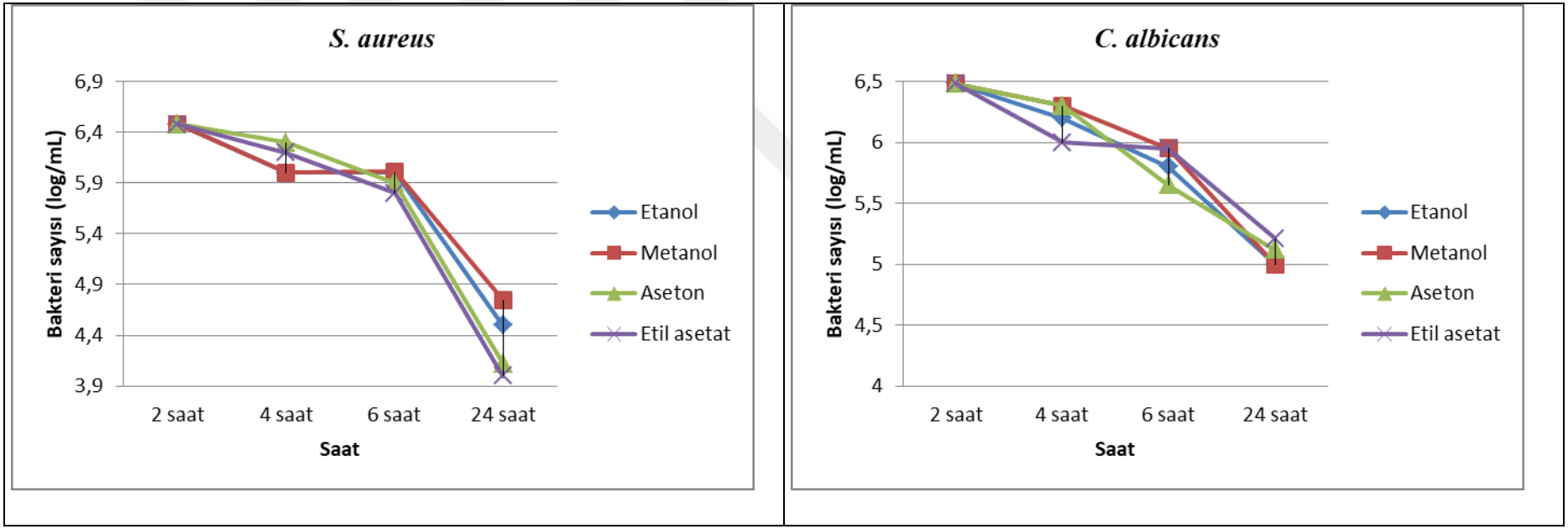
Şekil 10. *E. coli* NRRLB 3704 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği



Şekil 11. *P. vulgaris* ATCC 13315 ve *B. subtilis* ATCC 6633 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği



Şkil 12. *S. haemolyticus* ATCC 43252 ve *A. baumannii* ATCC 19606 bakterilerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği



Şekil 13. *S. aureus* ATCC 6538P ve *C. albicans* ATCC 10231 test kültürlerine karşı bitki ekstraktlarının zamana bağlı kinetik öldürme testi grafiği

4.2.4. Antibiyofilm (Biyofilm Oluşumunu Giderme Yüzdesi) Aktivite Tayini Bulguları

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin dört farklı ekstraktının MİK ve MİK altı değerlerde biyofilm giderim yüzdesi bulguları Tablo 8'de verilmiştir. En yüksek biyofilm yüzdesi aseton ekstresinden % 93,02±0,01 oranla *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve % 92,18±1,76 oranla *S. aureus* ATCC 6538P bakterisine karşı, en düşük giderim yüzdesi ise % 3,65±0,25 oranla *E.coli* NRRLB 3704 bakterisine karşı etil asetat ekstresinden elde edilmiştir. Bununla birlikte *E.coli* NRRLB 3704 (etanol), *A. baumannii* ATCC 19606 (metanol), *B. subtilis* ATCC 6633 (metanol ve aseton) test bakterilerine ve *C. albicans* ATCC 10231 (metanol) maya kültürüne karşı bazı ekstraktlarda antibiyofilm aktivitesi saptanmamıştır.

Tablo 8

A. chamaepitys subsp. *chia* bitki ekstraktlarının antibiyofilm (% inhibisyon) aktivitesi

Ekstraktlar	Test Mikroorganizmaları								
	Konsantrasyon (µg/mL)	***E.coli* NRRLB 3704**	***P. aeruginosa* ATCC 27853**	***P. vulgaris* ATCC 13315**	***A. baumannii* ATCC 19606**	***B. subtilis* ATCC 6633**	***S. aureus* ATCC 6538P**	***S. haemolyticus* ATCC 43252**	***C. albicans* ATCC 10231**
E1	**MİK**	-	53.45±3.21	**55.54±0.20**	47.12±0.22	45.03±0.01	**50.34±1.60**	**56.12±0.11**	30.45±1.14
	MİK/2	-	-	-	33.12±0.10	-	-	-	15.45±0.99
	MİK/4	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	**MİK**	8.93±0.62	**73.15±0.56**	**57.45±2.24**	-	-	**57.12±0.25**	**60.19±0.06**	-
	MİK/2	5.67±0.45	**66.45±0.2**	-	-	-	-	41.06±0.45	-
	MİK/4	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	**MİK**	42.75 ±0.22	**93.02±0.01**	47.51±2.10	**55.72± 0.12**	-	**92.18±1.76**	**58.41±1.12**	**79.82±1.12**
	MİK/2	28.45±0.2	**73.12±0.24**	30.78±1.20	35.12± 0.1	-	**76.15±1.00**	28,41±0.12	45.67±0.56
	MİK/4	-	**54.12±0.12**	-		-	-	-	-
E4	**MİK**	11.01±0.2	**75.12±0.67**	**63.37±0.11**	44.22±1.21	**64.12±0.24**	**75.45±1.56**	32.57±1.10	26.28±0.14
	MİK/2	3.65±0.25	**65.44±1.12**	-	-	**58.12±0.24**	30.78±1.20	-	6.02±0.10
	MİK/4	-	-	-	-	26.12±0.30	-	-	-

E1: Etanol, E2: Metanol, E3: Aseton, E4: Etil asetat

Elde edilen literatür verileri, *Ajuga* türlerinin farmakolojik açıdan farklı çalışma gruplarınca üzerinde yoğun şekilde çalışılmış bir genus olduğunu ortaya koymaktadır (Israili ve Lyoussi, 2009; Chandel ve Bagai, 2011; Delazar, vd., 2011; Miti´c, vd., 2011; Haşimi, 2012; Yumrutaş, 2012; Göger, vd., 2015; Medjeldi, vd., 2018; Yılmaz, 2019; Kaplan, 2020). Sadece araştırmamıza konu olan *A. chamaepitys* subsp. *chia* değil farklı pekçok *Ajuga* türünün özellikle antimikrobiyal aktivitesinin ortaya konması için farklı araştırmalar yürütülmüştür (Kırbağ, vd., 2005; Ulukanlı, vd., 2005; Saraç ve Uğur, 2007; Türkoğlu, vd., 2010; Ardekani, vd., 2010; Duran, 2015; Jakovljević, vd., 2015; Salem, 2017). Bununla birlikte *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisinden elde edilen dört farklı ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon MİK, MBK, FİK ve Zamana Bağlı Kinetik Öldürme Testi gibi farklı metotlar kullanılarak kapsamlı çalışıldığı ve ayrıca antibiyofilm aktivitesinin de ortaya konduğu herhangi bir literatür belirlenememiştir.

A. chamaepitys türünde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları incelendiğinde; *A. chamaepitys* subsp. *laevigata*'nın *K. Pneumonia*'ye karşı (Kırbağ, vd., 2005); *A. chamaepitys* metanol ekstresinin M. *smegmatis*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*; aseton ekstresinin, *S. aureus, M. luteus, M. smegmatis, B. subtilis, K. pneumoniae* bakterilerine karşı (Ulukanlı, vd., 2005); *A. chamaepitys* subsp. *euphratica* bitkisinin metanol ekstraktının *E. coli, P. aeruginosa, K. pneumonia* ve *E. aerogenes* test bakterilerine karşı (Türkoğlu, vd., 2010); *A. chamaepitys* subsp. *chamaepitys* bitkisinin metanol, aseton ve etil asetat ekstrelerinin gram pozitif *B. cereus, B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı (Jakovljević, vd., 2015); *A. chamaepitys* subsp. chia etanol ekstraktının *B. subtilis, S. aureus* ve *S. epidermidis* test bakterilerine karşı (Salem, 2017) çalışılan mukayese antibiyotiklerinden yüksek antibakteriyel aktivitesinin elde edildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte pek çok çalışmada da *C. albicans* (Ulukanlı, vd., 2005; Saraç ve Uğur, 2007; Türkoğlu, vd., 2010) ve *S. cerevisiae* (Türkoğlu, vd., 2010) maya kültürlerine karşı antifungal aktivite tespit edilememiştir. Bununla birlikte Ardekani, vd. (2010) *A. chamaecistus* subsp. *tomentella* türünden test edilen gram pozitif ve negatif bakterilere karşı herhangi bir antagonistik aktivite tespit edemezken; Duran (2015), *A. chamaepitys* subsp. *chia* var. *chia* ekstraktlarının Gram pozitif bakteriler *S. gordonii*'ye karşı zayıf, *S. mutans* ve *S. sanguis*'e karşı ise antikaryojenik aktivite göstermediğini; Jakovljević, vd., (2015) ise *A. chamaepitys* subsp. *chamaepitys* ekstrelerinin Gram negatif test bakterilerine karşı zayıf antagonistik

aktivitelerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, Ulukanlı, vd. (2005), Jakovljević, vd. (2015) ve Salem (2017), tarafından yapılan çalışmalara benzer şekilde *S. aureus* ve Türkoğlu, vd. (2010) tarafından yapılan çalışmaya benzer şekilde *P. aeruginosa* bakterilerine karşı P10 antibiyotiğine nazaran daha yüksek antibakteriyel etki tespit edilmiştir. Bununla birlikte literatür bilgilerinin aksine bitki ekstraktlarından teste tabi tutulan diğer gram negatif ve pozitif bakterilere ve *C. albicans* maya (etanol ve aseton ekstraktları) kültürüne karşı antagonistik aktivite saptanmıştır. Özellikle *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki türüyle yapılan diğer antimikrobiyal aktivite denemelerinden farklı sonuçlar elde edilmesinin, bitkinin toplandığı lokalitenin özellikleri (çevrebilim, iklim, toprak yapısı vb.), deneylerde kullanılan çözgen tipleri ve ekstraksiyon metotları ile test mikroorganizmaları arasında strain düzeyinde görülen farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Antibiyotiklerle tedavi kullanılmaya başlandığı 1920'li yıllardan bugüne beraberinde antibiyotik direnci ve bunun dışında çok çeşitli yan etkileride beraberinde getirmiştir. Bu nedenle mevcut kullanımda olan antibiyotiklerin daha etkin ve toksik olmayan dozlarda kullanımının sağlanması amacıyla antibiyotik kombinasyon tedavi güncel hale gelmiştir (Cornaglia ve Rossolini, 2009). Bu amaçla çalışmamızda bitkinin 4 farklı ekstraktı ile özellikle antibakteriyel özellikleri bilinen iki ticari antibiyotiğin (polimiksin B ve ampisilin) kombinasyonu FİK yöntemiyle incelenmiştir. Kullanılan ticari iki antibiyotikle ekstraktların bir arada kullanımının negatif etkileşim (antagonistik) gösterdikleri tespit edilmiş olup; antibiyotik ve ekstraktın birlikte etkisinin, antibiyotiğin ya da ekstraktın tek başına kullanımı sonucunda oluşan etkiden yüksek oranda azalmaya sebep olduğu ortaya konmuştur. Literatürde daha önce *Ajuga* türleriyle gerçekleştirilmiş FİK çalışmasına rastlanılmamış olup farklı araştırmacılar tarafından propolis ve kurkumin ekstraktı (Sharma, vd., 2010; Ünal ve Erdal, 2020), bitki çayları (Hacıoğlu, vd., 2017) ve tıbbi bitkiler (Vambe, vd., 2018) vb. farklı bitki kaynakları ile çalışmalar tespit edilmiştir. Farklı ticari antibiyotikler veya bitki ekstraktları ile FİK denemelerinin tekrar edilmesi gerekmektedir.

Bitki ekstraktlarının mikrobisidal dozlarının zamana bağlı değişiminin belirlenmesi potansiyel antibiyotik kaynağı olma özelliklerinin belirlenmesi için gereklidir. Özellikle sinerjizm testlerinde kullanılan metotlardan olan Time kill metodu bu amaçla yoğun şekilde kullanılmaktadır (Subaşı, 2020). *Ajuga* türleriyle gerçekleştirilmiş Time kill çalışması saptanamamış olup; Vambe, vd. (2018), Güney Afrika'da tıbbi bitki olarak kullanılan bitkilerde zamana bağlı öldürme eğrisinin özellikle 24 saatte önemli oranda değişim gösterdiğinin bildirmişlerdir. Time kill metoduna göre elde ettiğimiz bulgular tüm test mikroorganizmalarına karşı özellikle 24 saatte belirgin bir değişim olduğunu ortaya koymuş olup literatürde bu alanda yapılan çalışma bulgularıyla verilerimiz örtüşmektedir (Yıldırım, 2011; Aumeeruddy-Elalfi, vd., 2016; Boakye, vd., 2016; Subaşı, 2020)

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisinin antibiyofilm aktivitesinin tespitine yönelik Duran (2015) tarafından yapılan araştırma dışında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada bitki ekstraktının *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunu % 80.86 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Khan, vd. (2017), *Ajuga bracteosa* türünün 3 farklı *P. aeruginosa* strainine karşı antibiyofilm aktivitelerini araştırmışlar ve biyofilm gideriminin kontrol grubuna kıyasla orta ve zayıf kabul edilebilecek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 6538P bakterilerine karşı özellikle metanol, aseton ve etil asetat ekstraktlarından elde edilen yüksek antibiyofilm oranları bu bitki ekstraktının biyofilm gideriminde hem gram pozitif hemde gram negatif bakterilere karşı kullanılabileceğinin ilk bulguları niteliğindedir. Bununla birlikte literatür taramaları bu bitki grubuyla yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğunu ortaya koymakta olup, çalışmamız *A. chamaepitys* subsp. *chia* türüyle bu alanda yapılan ilk kapsamlı çalışma olma özelliği taşımaktadır.

4.3. *A. chamaepitys* subsp. *chia* Bitkisinin Antioksidan Aktivite Bulguları

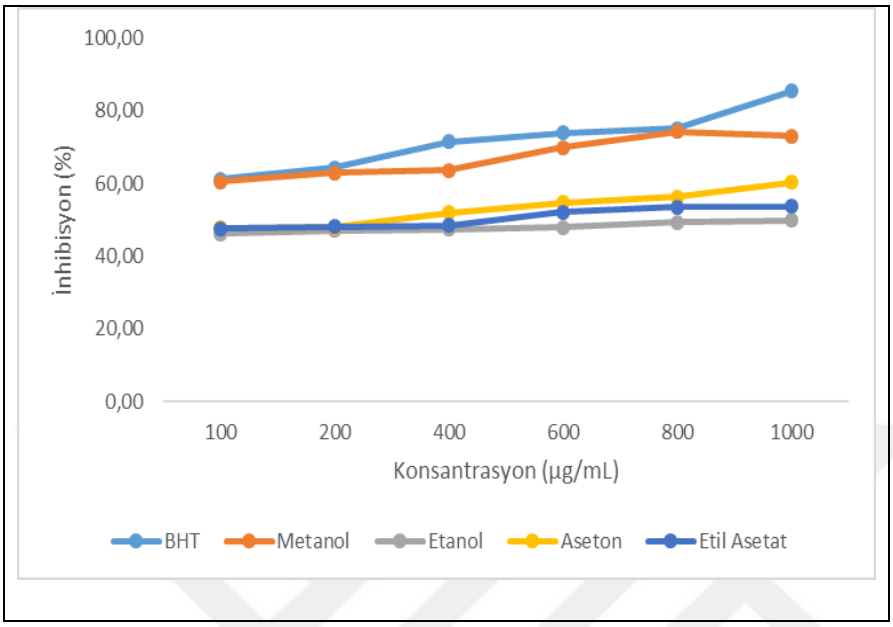
4.3.1. Ekstraktların Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH) Bulguları

Çalışılan bitkinin 4 farklı ekstraktının beş farklı konsantrasyondaki (100, 200, 400, 600 ve 800 µg/mL) antioksidan aktiviteleri, DPPH yöntemi ile 517 nm'de absorbans değerleri ölçülerek hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak bütil hidroksi toluen (BHT) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm ekstraktların BHT'ye nazaran düşük olmakla birlikte konsantrasyona bağlı artan oranlarda antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Bununla birlikte çözücülerden etil asetatın diğer çözgenlerden nispeten yüksek antioksidan aktivitesi olduğu gözlenmiştir (Tablo 9; Şekil 14).

Tablo 9

A. chamaepitys subsp. *chia* bitki ekstraktlarının DPPH yöntemi ile serbest radikal giderme aktivitesi

	% İnhibisyon Değerleri				
Ekstraktların Konsantrasyonları (µg/mL)	**BHT**	**Etil Asetat**	**Aseton**	**Metanol**	**Etanol**
100	42.07±3.21	**28.33±3.21**	23.92±4.12	25.57±4.12	23.37±2.65
200	54.17±2.98	**34.74±2.98**	27.49±3.24	30.06±2.87	26.39±4.12
400	76.17±3.65	**47.12±3.65**	35.75±2.68	43.72±3.71	34.65±3.21
600	85.97±1.98	**56.83±1.98**	42.71±2.73	54.35±2.05	41.52±1.87
800	93.40±4.63	**66.73±4.63**	49.13±3.19	63.70±3.62	47.57±2.96



Şekil 14. *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkisine ait dört farklı ekstraktın DPPH yöntemi ile serbest radikal giderme aktivitesi

4.3.2. Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Belirleme Tayini Bulguları

A. chamaepitys subsp. *chia* bitkisine ait etil asetat ekstraktının diğer ekstraktlardan çok daha yüksek Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda tüm ekstraktlarda özellikle 400 µg/mL'den sonra konsantrasyon artışına bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin yükseldiği saptanmıştır (Tablo 10).

Tablo 10

A. chamaepitys subsp. *chia* bitki ekstraktlarının CUPRAC kapasitesi

Absorbans Değerleri					
Ekstraktların Konsantrasyonları	**Askorbik Asit**	**Etil Asetat**	**Aseton**	**Metanol**	**Etanol**
100	1.39±0.07	**0.65±0.13**	0.52±0.11	0.55±0.12	0.54±0.09
200	1.51±0.18	**0.76±0.06**	0.56±0.21	0.62±0.18	0.59±0.08
400	2.±0.25	**1.02±0.12**	0.63±0.14	0.74±0.2	0.67±0.2
600	2.57±0.16	**1.17±0.21**	0.73±0.25	0.87±0.16	0.81±0.12
800	3.23±0.17	**1.53±0.09**	0.81±0.1	0.99±0.23	0.89±0.15

Bitkilerden farklı çözgenlerle elde edilen ekstraktların farklı etken maddeleri ve fonksiyonel grupları ortaya koyması nedeniyle antioksidan aktivite çalışmasında DPPH ve CUPRAC gibi iki metot kullanılmıştır. Her iki test sonucunda elde edilen verilere bakıldığında bitki ekstraktlarından pozitif kontrollere nazaran düşük olmakla beraber belirli konsantrasyonlarda yükselen antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir.

Türkoğlu, vd. (2010), *A. chamaepitys* subsp. *chia* su ekstraktının metanol ve kloroformdan yüksek, kontrol grubu BHT'den düşük antioksidan aktivitesini; Miti ´c vd. (2011), iki farklı lokaliteden topladıkları *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitkilerinin zayıf ve Yumrutaş vd. (2012) aynı türün düşük antioksidan aktivitesini tespit etmişlerdir.

Haşimi (2012), *A. vestita* ve *A. xylorrhiza* bitkilerinden DPPH metoduna göre *A. vestita* ve *A. xylorrhiza* metanol ekstraktlarının en yüksek antioksidan aktiviteyi 500 µg/mL konsantrasyonda gösterdiklerini ve ayrıca aynı konsantrasyonda pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den daha yüksek etkiye sahip oldukları tespit etmiştir. CUPRAC metoduna göre ise 1 mg/ml konsantrasyonda *A. vestita* metanol ekstraktının pozitif kontrol olarak kullanılan α-tokoferolden daha yüksek aktivite gösterdiği saptamıştır.

Mamadalieva, vd. (2013), *A. turkestanica*'nın su ve bütanol ekstraktlarında yüksek antioksidan aktivitesini saptamışlardır.

Çalışmamızda elde edilen veriler aynı türde Türkoğlu, vd. (2010) tarafından yapılan çalışma ile örtüşmektedir. Diğer literatürde elde edilen düşük antioksidan aktivite verilerinin bitki türlerinin toplandığı lokalite özellikleri, ekstraksiyon koşulları ve metotlarıyla ilintili olduğu düşünülmektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, kozmopolit bir tür olan ve farklı araştırmacıların yapmış olduğu biyolojik aktivite çalışmalarına konu olan *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki türünün dört farklı ekstraktının kapsamlı antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan kapasitesinin araştırıldığı ve bitki türünün doğal bir ilaç kaynağı olması yönünde umut verici veriler içermektedir. Özellikle enfeksiyon yapma kapasiteleri ve virülans faktörleri yüksek *S. aureus* ATCC 6538P ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri kültürlerine karşı daha önce aynı bitki ile yapılan benzer çalışmalardan farklı olarak elde edilen yüksek antagonistik aktivite büyük önem arz etmektedir. Benzer şekilde her iki bakterinin (*S. aureus* ATCC 6538P ve *P. aeruginosa* ATCC 27853) biyofilm oluşturma kapasitesinin özellikle metanol, aseton ve etil asetat ekstraktlarınca yüksek oranda giderildiği yapılan testlerle kanıtlanmıştır. Bu bilgiler, *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki türünün yapılacak kapsamlı çalışmalarla gıda, kâğıt gibi endüstri kollarında önemli antibiyofilm özellikte etken madde kaynağı olabilmesi için ön veriler niteliği taşımaktadır. Ayrıca çalışılan bitki türü antioksidan aktivite bakımından da kayda değer önemli bulgular göstermiştir.

Elde edilen bu bilgiler ışığında aşağıdaki maddeler halinde özetlenen başlıklar altında *A. chamaepitys* subsp. *chia* bitki türüyle kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

1- *A. chamaepitys* subsp. *chia* türünün farklı çözgenler ve ekstraksiyon metotları ile kıyaslamalı olarak detaylı biyolojik aktivite (sitotoksisite, antiviral, antikanserojen aktivite vb.) denemeleri yapılmalıdır.

2- İlaç kaynağı olabilecek detaylı fitokimyasal madde analizleri yapılmalıdır.

3- Antibiyotik kombinasyonlarında kullanılabilecek muhtemel fitokimyasal içerikler farklı ticari antibiyotiklerle sinerjizm ve zamana bağlı öldürme kinetiği vb. testlere tabi tutulmalıdır.

4- Mikrobiyal biyofilmlerle mücadelede stratejilerinin önemli bir basamağı olan anti-quorum sensing çalışmalarında *A. chamaepitys* subsp. *chia* ekstrakt denemeleri yapılmalıdır.

5- Sentetik antioksidanların yerine alabilecek doğal antioksidan kaynağı olma potansiyelini ortaya koyacak ileri araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

Arda, M. (1997). "Mikrobiyal Üremenin Kontrolü". Temel Mikrobiyoloji. (s.558), Medisan Yayınevi: Ankara.

Arıduru, R. (2013). Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya.

Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., ve Mahomoodally, M. F. (2016). "Chemical composition, antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from 10 tropical medicinal plants from Mauritius". *Journal of Herbal Medicine,* 6 (2), 88–95. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.02.002.

Bal, Ç. (1999). "Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması". *Flora Dergisi*, 4, 219-29.

Bayram E., Kırcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, İ. (2010). "Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin arttırılması olanakları", Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak 2010, Ankara, 437-454.

Ben Jannet, H., Harzallah-Skhiri, F., Mighri, Z., Simmonds, M. S. J. ve Blaney, W. M. (2000). "Responses of Spodoptera littoralis larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves". *Fitoterapia*, 71, 105-112.

Benjamin, S., Pradeep, S., Josh, M. S., Kumar, S. ve Masai, E. (2015). "A monograph on the remediation of hazardous phthalates". *Journal of Hazardous Materials*, 298, 58-72. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.004.

Bhatia, H., Sharma, Y. P., Manhas, R. ve Kumar, K. (2014). "Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur, J&K, India". *Journal of Ethnopharmacology*, 151 (2), 1005–1108. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.017.

Boakye, Y. D., Agyare, C. ve Andreas, H. (2016). "Anti-infective properties and time-kill kinetics of *Phyllanthus muellerianus* and its major constituent, geraniin". *Medicinal Chemistry,* 6 (2), 95–104. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000332.

Camps, F. ve Coll, J. (1993). “Insect allelochemicals from *Ajuga* plants”. *Phytochemistry*, 32, 1361-1370.https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85139-I

Cemeroğlu, B. (2004). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi* (1. Cilt). Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları: Ankara.

Ceyhan, N. (2008). “Klinikte biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri”. *İnfeksiyon Dergisi*, 22, 227-240.

Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J. ve Decker, E. A. (2007). “Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (3), 299-317.

Chandel, S., Bagai, U. (2011). “Screening of antiplasmodial efficacy of *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth.” *Parasitol Research*, 108, 801–805. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2250-6.

Chen, H., Tan, R. X., Liu, Z. L., Zhang, Y. ve Yang, L. (1996). “Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*”. *Journal of Natural Products*, 59, 668-670.

Chen, J., Rossman, M. L. ve Pawar, D. M. (2007). “Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium”. *Food Science & Technology*, 40, 249-254.

Chenni, A., Yahia, D. A., Boukortt, F. O., Prost, J., Lacaille-Dubois, M. A. ve Bouchenak, M. (2007). “Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet”. *Journal Ethnopharmacol*. 109, 207-213. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.036.

Comlekcioglu, N., Kocabas, Y. Z. ve Ashabil, A. (2019). “Investigation of bioactive compounds on relict endemic *Ajuga relicta* P. H. Davis (Lamiaceae) from Turkey”. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6 (3), 223-232. https://doi.org/10.21448/ijsm.507568.

Cornaglia, G., Rossolini, G. M. (2009). “Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens”. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 218- 223.

Davis, P. H., Mill, R. R. ve Tan, K. (1988). "Flora of Turkey and the East Aegean Islands". *38 Edinburgh University Press,* 10, 191-193.

Delazar, A., Delnavazi, M. R., Yassa, N., Parkhideh, S., Delazar N., Nahar L. ve Sarker S.D. (2012). "Essential oil composition and isolation of Free-Radical-Scavenging Phenolic Glycosides From the Aerial Parts of *Ajuga chamaepitys* Growing in Iran". *Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (2), 299-305.

Demir, N.R. (2020). Tıbbi bitkisel ürünlerdeki element içeriği ve organik klorlu pestisit kalıntı düzeylerinin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Sağlık Bilimler Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Demir, T. ve Akpınar, Ö. (2020). "Biological activities of phytochemicals in plants". *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology,* 8 (8),1734-1746.

Di Novella, R., Di Novella, N., De Martino L., Mancini, E. ve De Feo. V. (2013). "Traditional plant use in the national park of Cilento and Vallo Di Diano, Campania, Southern, Italy". *Journal of Ethnopharmacology*, 145 (1), 328–342.

Duran, Ö. (2015). Çay Olarak Tüketilen Lamiaceae Familyasının Antimutajenik, Antiproliferatif, Antikaryojenik, Antibiyofilm ve Hemostatik Aktivitelerinin İncelenmesi.Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı*. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi ve Türkiye Tabiatını Koruma. Derneği: Ankara.

Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2011). "Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi". *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1),52–67.

Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu M. S. (2013). "Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları". *EÜFBED - Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6 (2), 233-265.

Fidan, A. F. ve Dündar, Y. (2007). "Yucca schidigera ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri". *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47 (2), 31-39.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. ve Weissfeld, A. S. (2007). "Gram-negative Bacilli and Coccobacilli (MacConkey-positive, Oxidase Positive)". *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 340-350.

Fournier, P. E., Vallenet, D. ve Barbe, V. (2006). "Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii"*. *Plos Genetics*, 2, 62-72.

Frank, J. F., Ehlers, J. ve Wicker, L. (2003). "Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions". *Food Protect Trends*, 23, 654-663.

Frankel, E. N. (2005). "Antioxidants". E.N. Frankel(ed.), in: *Lipid Oxidation Second Edition*. (s.209-253). Woodhead Publishing: Cambridge.

Gelinci, E. (2018). *Sideritis öztürkii* Aytaç&Aksoy Türünün Antimikrobiyal Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

Giday, M., Asfaw, Z. ve Woldu, Z. (2010). "Ethnomedicinal study of plants used by Sheko ethnic group of Ethiopia". *Journal of Ethnopharmacology*, 132 (1), 75–85. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.046.

Göger F., Köse Y. B., Göger G., Demirci F. (2015). "Phytochemical characterization of phenolics by LC-MS/MS and biological evaluation of *Ajuga orientalis* from Turkey". *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 10, 639-644.

Gören, A. C., Zhou, B. N., Gülaçtı, T., Kökdil, G. ve Kingston, D. G. (2005). "DNA damaging activities of methanol extract of *Ajuga postii* and iridoid glucoside reptoside". *Natural Product Research*, 19 (5), 457–460. https://doi.org/10.1080/14786410412331272095.

Gül, A., Özçelik, H., Uzun, Ö.F. (2012). "Isparta yöresindeki bazı doğal yer örtücü bitkilerin adaptasyonu ve özellikleri". *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16 (2), 133-145.

Güzel, Y., Güzelşemme, M. ve Miski, M. (2015). "Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey". *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 118–152. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.042.

Hacioglu, M., Dosler, S., Birteksoz Tan, A. S. ve Otuk, G. (2017). "Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an in vitro study". *PeerJ Life and Environment*, 5, e3467. https://doi.org/10.7717/peerj.3467.

Halliwell, B. (2007). "Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health". *Cardiovascular Research*, 73 (2), 341-347. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.004.

Haşimi, N. (2012). *Ajuga vestita* ve *Ajuga xylorrhiza* bitkilerinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin bazı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı,Diyarbakır.

Huber-Morath, A. (1978). "*Verbascum* L." P.H. Davis(ed.). in: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*.(s 461-603). Edinburgh University Press:Edinburgh.

Israili Z. H. ve Lyoussı B. (2009). "Ethnopharmacology of the plants of genus *Ajuga "*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (4), 425-62.

Jakovljević, D. Z., Vasić, S. M., Stanković, M. S., Čomić, L.R. ve Topuzović, M. D. (2015). "Secondary metabolite content and in vitro bıological effects of *Ajuga chamaepitys (L.) schreb. subsp. chamaepıtys*". *Archives of Biological Sciences* 67 (4), 1195-1202. https://doi.org/10.2298/ABS150225095J.

Jan, H. A., Wali, S., Ahmad, L., Jan, S., Ahmad, N. ve Ullah, N. (2017). "Ethnomedicinal survey of medicinal plants of Chinglai valley, Buner district, Pakistan". *European Journal of Integrative Medicine*, 13, 64–74. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.06.007.

Jessen, B. ve Lammert, L. (2003). "Biofilm and disinfection in meat processing plants". *Int Biodeter Biodegr*, 51, 265-269.

Jose, J., Raju, D. ve Nayak, P. (2018). "Microspheres-novel drug delivery carrier for plant extracts for antibacterial activity". *Research Journal of Pharmacy and Technology,* 11 (4), 1681-1684. https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00313.X.

Kan, A., Ozcelik, B. ve Kartal, M. (2009). "In vitro antiviral activities under cytotoxic doses against herpes simplex type-1 and parainfluenza-3 viruses of *Cicer arietinum* L.". *African Journal Pharmacy and Pharmacology,* 3 (12), 627-631.

Khan, I., Khan, U., Khan, W., Subhan, M., Nawaz, M.A., Pervez,S., Khan, K., Jan, A.K. ve Ahmad, A. (2017). "Antibacterial and antibiofilm potential of leaves extracts of Mirabilis jalapa L. and *Ajuga bracteosa* wall. against *Pseudomonas aeruginosa*". *Pure and Applied Biology*, 6 (2), 605-613.

Kırbağ, S., Kurşat, M. ve Zengin, F. (2006). "Elazığ'da tıbbi amaçlar için kullanılan bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri"**.** *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları,* 168-171.

Kırbağ, S. ve Zengin, F. (2006). "Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri". *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tarım Bilimleri Dergisi,* 16 (2), 77-80.

Kocabaş, Y. Z. ve Karaman, S. (2001). "Essential oils of Lamiaceae family from south east mediterranean region (Turkey)". *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 4 (10), 1221- 1223.

Kose, Y. B., Erkara, I. P. ve Alan, S.(2011). "Pollen morphology of some Turkish *Ajuga* L.(Lamiaceae) and its taxonomic value". *Bangladesh Journal of Botany*, 40 (1), 29–33.

Kose, Y. B., Mutlu, M. B. ve Küçük, S. (2017). "Phylogenetic relationships of some *Ajuga* L. taxa based on the ribosomal DNA internal transcribed spacer region". *Romanian Biotechnological Letters,* 23 (1), 13249-13254.

Kökdil, G., Gülaçtı, T., Gören, A. C. ve Wolfgang, V. (2002). "Steroids and terpenoids from *Ajuga relicta*". *Zeitschrift für Naturforschung B Journal of Chemistry,* 57, 957- 960.

Köksal, İ. (2010)."Sinerji Suşlarının Klinikteki Yeri", *34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi,* 7–11 Kasım 2010, Kongre Kitabı, İstanbul.178.

Kumar, K., Sharma, Y. P., Manhas, R. ve Bhatia, H. (2015). "Ethnomedicinal plants of Shankaracharya Hill, Srinagar, J&K, India". *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 255–274. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.021.

Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action". *American Society for Nutritional Sciences*, 134, 3479-3484.

Maezono, H., Noiri, Y., Asahi, Y., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., Izutani, N., Azakami, H. ve Ebisu, S. (2011). "Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*". *Antimicrob Agents Chem*, 55, 5887-5892.

Mamadalieva, N. Z., El-Readi, M. Z., Ovidi, E., Ashour, M. L., Hamoud, R., Sagdullaev, S. S., Azimova, S. S., Tiezzi, A. ve Wink, M. (2013). "Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*". *Phytopharmacology*, 4 (1), 1-18.

Marc, E. B., Nelly, A., Annick, D. D. ve Frederic, D. (2008). "Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon". *Journal of. Ethnopharmacology*, 20, 315-334. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.024.

Medjeldia, S., Bouslamab, L., Benabdallaha, A., Essidb, R., Haoua, S. ve Elkahouib, S. (2018). "Biological activities, and phytocompounds of northwest Algeria *Ajuga iva* (L) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction". *Microbial Pathogenesis*, 121, 173-178. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.022.

Merritt, J. H., Kadouri, D. E. ve O'Toole, G. A. (2005). "Growing and analyzing static biofilms". *Current Protocols of Microbiology*, 1 (1), 17.

Miti ´c, V. D., Stankov-Jovanovi ´c, V. P., Jovanovi ´c, O. P., Pali ´c, I. R., Djordjevi ´c, A. S. ve Stojanovi ´c, G. S. (2011). "Composition and antioxidant activity of hydrodistilled essential oil of Serbian *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ssp. *chia* (Schreber) Arcangeli". *Journal of Essential Oil Research*, 23 (6), 70-74. https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9712285.

Mohammed, F. S., Karakaş, M., Akgül, H. ve Sevindik, M. (2019). "Medicinal properties of *Allium calocephalum* collected from Gara Mountain (Iraq)". *Fresenius Environmental Bulletin*, 28 (10), 7419-7426.

Murugan, K., Selvanayaki, K. ve Al-Sohaibani, S. (2011). "Antibiofilm activity of *Andrographis paniculata* against cystic fibrosis clinical isolate *Pseudomonas aeruginosa*". *World Journal Microbiol Biotechnology*, 27, 1661-1668.

Musthafa, K. S., Ravi, A. V. ve Annapoorani, A. (2010). "Evaluation of anti quorum-sensing activity of edible plants and fruits through inhibition of the N-acyl-homoserine lactone system in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*". *Chemotherapy*, 56, 333-339.

Nirmala, C., Bisht, M. S., Bajwa, H. K. ve Santosh, O. (2018). "Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry". *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.003.

Olcay, E. (2017). Pseudomonas aeruginosa İçin Polimiksin B'nin MİK Değerleri Üzerinde Farklı Basınç ve Sürelerde Uygulanan Hiperbarik Oksijenin Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı, İstanbul.

Orhan, D. D., Özçelik, B., Hoşbaş, S. ve Vural, M. (2012). "Assessment of antioksidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi". *Turkish Journal of Biology*, 36, 672-686.

Orhan, I., Deliorman-Orhan, D., ve Özçelik, B. (2009). "Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids". *Food Chemistry*. 115, 701-705. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.024.

Packiavathy, I. A. S. V., Agilandeswari, P., Musthafa, K. S., Pandian, S. K. ve Ravi, A. V. (2011). "Antibiofilm and quorumsensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens". *Food Research International*, 45, 85-92.

Pulcini, C., Bush, K., Craig, W. A., Frimodt-Moller, N., Grayson, M. L., Mouton, J. W., Turnidge, J., Harbarth, S. ve Gyssens, I.C. (2012). "Forgotten antibiotics: an inventory in Europe, the United States, Canada and Australia". *Clinical Infectious Diseases*, 54 (2), 268-274. https://doi.org/10.1093/cid/cir838.

Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G. (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds". *Trends in Plant Science,* 2 (4), 152-159.

Rogers, S.A., Huigens, R.W. ve Cavanagh, J. (2010). "Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents". *Journal of Antimicrobial Chemothertherapy,* 54, 2112-2118.

Salem, M. A. H. (2017). Lamiaceae Familyasına ait bazı türlerin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu.

Saraç, N. (2005*).* Muğla Yöresinde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Bazı Lamiaceae Türlerinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi, Yüksek lisans tezi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.

Saraç, N. ve Uğur, A. (2007). "Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some *Lamiaceae* species growing in Mugla, Turkey". *EurAsian Journal of BioSciences*, 4, 28-37.

Sevindik, M. (2018). "Pharmacological properties of *Mentha* species". *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*, 7 (1), 259-263. https://doi.org/10.4172/2573-4555.1000259.

Shahidi, F. ve Zhong, Y. (2011). "Revisiting the polar paradox theory: a critical overview". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 59 (8), 3499-3504.

Shams Ardekani, M. R., Khanavi, M., Taheri, P., Samadi, N., Safaripour, E. ve Salimpour, F. (2010). "The Essential oil composition of *Ajuga chamaecistus* Ging. subsp. *tomentella* Rech. f.". *Journal of essential oil-bearing plants JEOP,* 13 (1) , 45 - 51. https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643789.

Sharma, M., Manoharlal, R., Negi, A.S. ve Prasad, R. (2010). "Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis". *FEMS Yeast Research,* 10 (5), 570-578. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00637.x.

Sidhu, M. S., Landsrud, S. ve Holck, A. (2001). "Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry". *Microbial Drug Resistance*, 7, 73-83.

Simoes, M., Simoes, L.C., Machado, I., Pereira, M.O. ve Vieira, M.J. (2006). "Control of flow-generated biofilms using surfactants-evidence of resistance and recovery". *Food Bioprod Process*, 84, 338-345.

Somers, E. B. ve Wong, A. C. (2004). "Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on Listeria monocytogenes biofilm formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue". *Journal Food Protection*, 67, 2218-2229.

Stewart, P. S., McFeters, G. A. ve Huang, C. T. (2000). "Biofilm control by antimicrobial agents". J. Bryers (ed.). in: *Biofilms II: Process analysis and applications*. (s.373-405). New York: Wiley.

Subaşı, E. (2020). Dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarıyla geliştirilen enfeksiyonlarda sulbaktam/kolistin ve meropenem/kolistin kombinasyon tedavi etkinliğinin galleria mellonella deneysel modelinde in vivo olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak.

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. ve Lyoussi, B. (2007). "Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province)". *Journal of Ethnopharmacology*, 110 (1), 105–117.

Thi Quynh Doan, N. ve Brogger Christensen, S. (2015). "Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development". *Current Pharmaceutical Design*, 21 (38), 5501- 5517. https://doi.org/10.2174/1381612821666151002112824.

Thormann, K.M., Saville, RM., Shukla, S. ve Spormann, A.M. (2005). Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187, 1014-1021.

Tısoğlu, S. (2016). Ampisilin ve Sülfadiazin Antibiyotiklerinin Bor Doplanmış Elmas Elektrotlar Kullanılarak Kesikli Sistemde Elektrokimyasal Yöntemle Degradasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

Toiu, A., Mocan, A.,Vlase, L., Pârvu, A. E.,Vodnar, D. C., Gheldiu, A. M.,Moldovan C. ve Oniga, I. (2019). "Comparative phytochemical profile, antioxidant, antimicrobial and in vivo anti-Inflammatory activity of different extracts of traditionally used Romanian *Ajuga genevensis* L. and *A. reptans* L. (Lamiaceae)". *Molecules,* 24 (8), 1597. https://doi.org/10.3390/molecules24081597.

Topal, Y. (2013). *Alchemilla* L. (Rosaceae) Cinsine Ait Bazı Türlerin Fenolik Bileşiklerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Bingöl.

Tozyılmaz, V. (2019). Anadolu Florasına Ait Bazı Endemik Türlerin Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antibiyofilm Aktivitelerinin İncelenmesi.Yüksek lisans tezi. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Bartın.

Türkoglu, S., Türkoglu, I., Kahyaoglu, M. ve Celık, S. (2010). "Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P. H. Davis (Lamiaceae)". *Journal of Medicinal Plants Research,* 4 (13), 1260- 1268. https://doi.org/10.5897/JMPR10.141.

Ulcay, S. (2021). "Morphological, anatomical and ecological features of *Ajuga salicifolia* (L.) Schreber (Lamiaceae) with natural spreading". *Sakarya University Journal of Science*, 25 (1), 230-239. https://doi.org/10.16984/saufenbilder.796651.

Ulukanli, Z., Ulukanli, S., Ozbay, H., Ilcim, A. ve Tuzcu, M. (2005). "Antimicrobial activities of some plants from the Eastern Anatolia region of Turkey". *Farmasötik Biyoloji*, 43 (4), 334-339. https://doi.org/10.1080/13880200590951757

Ünal, Z. Ö. ve Erdal, B. (2020). "Investigation of antifungal effects of propolis and curcumin extracts on *Trichophyton* species". *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 8 (3), 515 - 522. https://doi.org/10.37696/nkmj.808104.

Ünlü Ü. (2016). "Bazı tıbbi bitkilerin farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen özütlerinin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Karaman.

Vambe, M., Aremu, A. O., Chukwujekwu, J. C., Finnie, J. F. ve Van Staden, J. (2018). "Antibacterial screening, synergy studies and phenolic content of seven South African medicinal plants against drug-sensitive and -resistant microbial strains". *South African Journal of Botany*, 114, 250-259.

Venditti, A., Frezza, C., Maggi, F., Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L., Giuliani, C., Cianfaglione, K., Papa, F., Serafini, M. ve Bianco, A. (2016). "Phytochemistry, micromorphology and bioactivities of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (Lamiaceae, Ajugoideae): Two new harpagide derivatives and an unusual iridoid glycosides pattern". *Fitoterapia*, 113, 35–43. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.06.016.

Verma, B., Hucl, P. ve Chibbar, R. N. (2009). "Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions". *Food Chemistry*, 116, 947-954. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.060.

Vital, P. G., Lasco, J. R. N., Demigillo, J. M. ve Rivera, W. L. (2010). "Antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of *Ficus septica* Burm and *Sterculia foetida* L. leaf extracts". *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 58-63.

Weisburger, J. H. (2000). "Eat to live, not live to eat". *Nutrition*, 16 (9), 767-773. https://doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00400-7.

Wessner, M., Champion, B., Girault, J. P., Kaouadji, N., Saidi, B. ve Lafont, R. (1992). "Ecdysteroids from *Ajuga iva*". *Phytochemistry*, 31, 3785-3788.

Wu, Y., Luo, Y. ve Wang, Q. (2012). "Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method". *Food Science and Technology*, 48 (2), 283-290. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). "Inhibiting oxidation, in antioxidants in Food". J. Pokorný, N. Yanishlieva ve M. Gordon (ed.). in: *Practical Applications*. (s. 22–70).Woodhead Publishing: UK.

Yıldırım, E. E. (2011). Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonlarının Çoğul Dirençli *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. Bakterilerine in-vitro Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Yılmaz, B. (2019). "Chemical constituents of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb growing Turkey By GC-MS Method". *Internatıonal Journal Of Pharmacognosy,* 6 (3), 108-112. http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.6(3).108-12.

Yumrutas, O., Saygideger, S. D. ve Sokmen, M. (2012). "DNA Protection and antioxidant activities of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber essential oil and its volatile compounds". *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15 (4), 526 - 530. https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644082.

Zhong, Y. ve Shahidi, F. (2011). "Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (1), 4-6. https://doi.org/10.1021/jf204165g.