BIBAD *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 1 (1): 17-22, 2008*
ISSN:1308-3961, www.nobel.gen.tr

Thymus argaeus' Boiss. & Balansa'un Organik Ekstrakt ve Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Cem Vural[1] Servet Özcan[1] Güler Toprak[2] Şeyda Erdoğan[2]

[1]Erciyes Üniversitesi, Fen-Ed. Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim dalı, 38039-Kayseri
[2]Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalı, 38039-Kayseri

Sorumlu Yazar
e-posta: vuralc@erciyes.edu.tr

Geliş Tarihi: 15 Haziran 2008
Kabul Tarihi 22 Ağustos 2008

Özet

Bu çalışmada endemik *Thymus argeus'* taksonunun antimikrobiyal aktivitesi incelendi. Beş farklı organik çözücü ile yapılan kaba ekstraksiyonların ve uçucu yağın antimikrobiyal özellikleri incelendi. Toplam miktarın % 98' ini oluşturan 57 uçucu yağ bileşeni tanımlandı. Bu bileşenlerden en önemlilerinin nerol (% 15.407), linalool butanoate (% 12.151), linalool (% 10.535), ve cymene (% 8.332) olduğu belirlendi. Elde edilen ekstraktların bazı bakteri suşları ve *Candida albicans* üzerine etkisi belirlendi. Uçucu yağın disk difüzyon ve MIC değerleri seçilmiş bazı standart test suşları kullanılarak belirlendi. Çalışmada *Thymus argeus'* un organik ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi ilk kez rapor edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Thymus argaeus*, uçucu yağ, antimikrobiyal aktivite.

Antimicrobial Activity of *Thymus Argaeus* Organic Extract and Essential Oil

Abstract

In the present work, endemic taxon *Thymus argaeus* was screened for its antimicrobial activity. Following the crude extraction from aerial parts of *Thymus argaeus* with five different organic solvents and the essential oils were tested for its antimicrobial activity. For the essential olis, 57 compounds were identified representing over the 98 % of the essential oil. The major constituents of the oil were determined as nerol (15.407%), linalool butanoate (12.151%), linalool (10.535%), and cymene (8.332%). The exracts of *Thymus argaeus* exerted activity on bacterial strains and *Candida albicans*. Organic extract and essential oils antimicrobial activity of Thymus argaeus was reported for the first time. Essential oil's disc diffusion and MIC values were determined for some selected standard test strains.

Key Words: *Thymus argaeus*, essential oil, antimicrobial activity.

GİRİŞ

Son zamanlarda, patojen organizmaların kontrol altına alınmasında antimikrobial aktiviteye sahip bazı aromatik bitki özütlerinin yada uçucu yağlarının kullanım olanaklarını araştıran çalışmalarda önemli bir artış gözlenmektedir [1,2,3]. *Thymus* L. cinsi antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi açıkça bilinen taksonlara sahiptir. Bu taksonlardan *T. vulgaris* L. geniş ölçüde araştırılmış ve doğal bir antimikrobiyal ve antioksidan kaynağı olduğu gösterilmiştir [4.5.6.7.8]. Diğer *Thymus* türlerinde de benzeri aktiviteleri gösterir çalışmalar oldukça fazladır [9.10.11.12].

Thymus cinsi ülkemizde 39 türe ait 58 taksonla temsil edilmektedir. Bu türlerin 24 tanesi endemiktir [13,14,15]. *Thymus argaeus* ülkemizde dar yayılışlı endemik bir bitkidir [16].

Çalışmadaki amacımız, Erciyes Dağında yayılış gösteren *Thymus argeus* türünün antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesidir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki Materyali

Bu çalışmada Erciyes Dağı (Kayseri) popülâsyonlarından toplanan *Thymus argaeus* örnekleri kullanılmıştır.

Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Toplanan örnekler kurutularak bir parçalayıcı yardımı ile toz haline getirildikten sonra 10 gr tartılarak 200 ml çözücü ile çözülmüşür. Çözücü olarak metanol, aseton, diklorometan, kloroform ve hekzan kullanılmıştır. Ekstraksiyon soxhlet cihazı yardımı ile 12 saat boyunca yapılmıştır. Metanol ekstraktı yapıldıktan sonra bir kez daha su ve klorofom ile süspanse hale getirilmiştir. Bu sayede ekstrakt, suda çözünen (polar) ve suda çözünmeyen (polar olmayan) kısımlarına ayrılmıştır. Elde edilen tüm örnekler daha sonra liyofilize edilmiş ve test edilene kadar +4 ^{0}C' de saklanmıştır.

Distilasyon işlemi için toz haldeki bitki örneğinden 200 gr alınmış ve 3 L suda çözülmüştür. *Clevenger* tip cihaz yardımı ile 3 saat boyunca distilasyon gerçekleştirilmiştir. Su distilasyonu ile birlikte demleme işlemi de yürütülmüştür. Soğuk su sirkülâsyonu sayesinde sistemin sürekli soğutulması sağlanmıştır. Sürenin sonunda yoğunlaşan uçucu yağ örnekleri ve demleme örnekleri toplanmıştır. Uçucu yağ örnekleri GC-MS analizi ve antimikrobiyal testleri için +4 ^{0}C' de saklanmıştır.

GC-MS Koşulları

GS-MS analizleri Agilent 6890 GC' ye bağlı 5973N Mass Selektif Dedektörden oluşan GC/MS kullanılarak yapılmıştır. Uçucu yağ örnekleri HP-5 MS kapillar kolondan geçirilmiştir (30mx0.25mmx0.25μm). Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmıştır. Akış hızı olarak 1 ml/dakika belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 60 ^{0}C olup, 15 dakikada 180 ^{0}C' ye ulaşması sağlanmış ve bu değerde sabit tutulmuştur. Örnekler 1/50 (v/v) oranında seyreltilmiştir. Bileşenler kolonda kalma sürelerine ve kütle

spektralarına göre standartlar ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada TÜBİTAK ATAL bünyesinde bulunan Wiley, Nist, Pestisit, Toksik Bileşikler kütüphaneleri çıkan spektrumların otomatik taranması ile analizler gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyal Suşlar

Araştırmada test organizmaları olarak Gram negatifler; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus feacalis* ATCC 29212, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Gram pozitif olanlar ise *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Bacillus subtilis 6633, ve maya Candida albicans ATCC 90028 klinik izolat maya *Candida albicans* türleri kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite

Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri patojen Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere ve mayaya karşı disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle *in vitro* olarak gözlemlenmiştir (screening). Mikroorganizmalar Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ve Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuarından temin edilmiştir.

Katı ortam kültürleri; -80 ^{O}C stoktan alınan bakteriler Triptik Soy Agar (TSA), ve maya için Yeast Pepton Dekstroz Agara (YPDA) ekilerek 35 ^{O}C de 24 ila 48 saat inkübe edilerek (Binder K115) tek koloni büyütülmüştür. Antimikrobiyal aktivite testleri için ise; bakteriler Mueller Hinton Agar (MHA) veya sıvı kültür için Mueller Hinton Broth (MHB); maya Yeast Pepton Dekstroz Agar (YPDA) veya bu besi yerinin broth (sıvı) formu kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için disk difüzyon testi ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Disk Difüzyon

Örnekler DMSO veya 1/2 DMSO + 1/2 dH2O (v/v) karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. DMSO veya ½ DMSO + ½ dH_2O (v/v) karışımı hazırlanarak çözünmüştür. Çözünmüş örnekler 0.22 µm steril filtreden geçirilerek 10 mg/mL stoklar halinde hazırlanmıştır. Steril stoklardan 250 µg / (Antimicrobial Sussptibility TEST DISCS, Oxoid) olacak şekilde disklere 2 kez 25 µL ve 40 ^{O}C de 1 saat kurutulmuştur. Bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri [National Commitee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS), 1997] tarafından önerilen yönteme göre disk difüzyon tekniği ile yapılmıştır. Kısaca; 100 µL10^8 c.f.u / mL (Mc Farland bulanıklık standardı 0.5) eşdeğeri hücre MHA üzerine pipetlenmiş ve steril ekivyon çubuğu ile eşit miktarda yayılmıştır. 10–15 dakika laboratuar koşullarında bekletilen petrilere diskler aseptik olarak yerleştirilerek 35 ^{O}C de 24 ila 48 saat inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite; bakteri ya da maya üremesinin olmadığı şeffaf zon çapı kumpas yardımıyla ölçülerek (6 mm disk çapı dahil) kaydedilmiştir. Her bir örnek için, iki ayrı bağımsız set düzenlenerek değerlerin ortalaması alınmıştır. Negatif kontrol olarak sadece örneklerin çözündüğü çözücü kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak bakteriler için Trimethoprim (30 µg/disk) ve Ampisilin (50 µg/disk), maya içinse Nystatin (25 µg/disk) ve Tetracycline (10 ug/disk) Spectinomycin (25 ug/disk) aktif maddeleri kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon Metodu

Sentezlenen numunelerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu [Mininal Inhibition Concentration (MIC)] mikro dilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. DMSO ya da % 50 DMSO+ dH_2O içeriğinde hazırlanan ve filtre edilen ana stoktan MHB ya da YPDB içerisinde 1000 µg/mL çalışma ara stoğu oluşturulmuştur. Ara stoktan, aynı sıvı besi yerine olmak kaydıyla, sürekli yarıya düşürülerek (500, 250, 125, 62.6, 31.25, 15.62 ve 7.8µg/mL) 10 mL sıvı besiyer içeren steril tüplerde her bir değer için bağımsız olarak çalışma stokları hazırlanmıştır.

MIC okumasının gerçekleştirilmesinde, 96 oyuklu (microwell) ELİSA kaplarının her oyuğuna 95 µL MHB ya da YPDB pipetlenmiş sıvı besiyeri üzerine yukarda oluşturulan çalışma stoklarından 100 µL eklenmiş ve pipet yardımıyla karıştırılmıştır. 195 µL üzerine 5 µL mikroorganizma inokülümü eklenip ve toplam hacim oyuk başına 200 µL ye tamamlanmıştır.

Microplate 300 rpm de 30 saniye rotary inkübatör (GFL 3031) içerisinde çalkalanarak 35 ^{O}C de 24 ila 48 saat inkübe edilmiştir. Her bir örnek için, iki ayrı bağımsız set düzenlenerek değerlerin ortalaması alınmıştır. Negatif kontrol olarak sadece çözücü kullanılmıştır. Pozitif kontroller (i); herhangi bir aktif madde içermeyen sadece MHB ya da YPDB sıvı besiyerinde ve (ii); bakteriler için Trimethoprim ve Ampisilin, maya için Nystatin aktif maddelerinden (500, 250, 125, 62.6, 31.25, 15.62 ve 7.8 µg/mL) olacak şekilde hazırlanmış örneklerden 195 µL üzerine 5 µL mikroorganizma kültürü eklenerek yapılmıştır.

Mikrobiyal büyüme mikroplate okuyucusu (TECAN SUNRISE) yardımıyla 600 nm de absorbans değerleri kontrole karşı okunarak belirlenmiştir. MIC değeri mikroorganizmal büyümenin olmadığı en düşük madde konsantrasyon olarak alınmıştır.

BULGULAR

Ekstraksiyon Verimi

Bitki ekstraksiyonu için 5 farklı çözücü kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 12 saat boyunca gerçekleştirilerek, kurutma işlemi vakum altında yapılmıştır. En verimli kuru madde eldesi Metanol ekstraktından sağlanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. *Thymus argaeus*' a ait ekstraksiyon verimi

Çözücüler	Kuru bitki materyali	Elde edilen Kuru özüt	% verim
Metanol	11 g	2060 mg	18.72
Aseton	10 g	630 mg	6.30
Diklorometan	10 g	530 mg	5.30
Kloroform	10 g	595 mg	5.95
Hekzan	10 g	298 mg	2.98

GC-MS Analiz Sonuçları

Thymus argaeus'a ait tanımlanan toplamda 57 bileşen arasında belirgin olanlar Nerol % 15.407; Linalool Butanoate %12.151; Linalool % 10.535 ve Cymene % 8.332' dir (Çizelge 2).

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Thymus örneğinin çeşitli çözücüler yardımı ile hazırlanan ekstraksiyonlarının disk difüzyon testinden elde edilen değerleri aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3). Buna göre artan konsantrasyonlara bağlı olarak oluşan disk difüzyon çaplarının da arttığı gözlenmiştir. *Thymus argaeus'* un tüm ekstraktlarının bütün mikroorganizmalar için yakın değerlerde disk difüzyon çapı oluşturduğu gözlenmiştir.

Uçucu yağ örnekleri ile yapılan disk difüzyon çalışmalarında artan uçucu yağ miktarına bağlı olarak oluşan disk çapında da artış tespit edilmiştir. *Thymus argaeus'* un *E. faecalis'* üstünde etkili olmadığı dikkate değer bulunmuştur. Ayrıca pozitif kontrol olarak 1 Ampisilin (50 ug/disk), Tetracycline (10 ug/disk), Spectinomycin (25 ug/disk), Trimetoprim (30 ug/ disk), Nystatin (25 ug/ disk), kullanılmıştır. Nistatin uygulaması yalnızca mayalara kullanılmıştır. Uçucu yağ uygulamaları antibiyotikler ile karşılaştırıldığında, *Thymus argaeus'* un antibiyotiklerden daha az etkili olduğu belirlenmiştir. *B. cereus*' a karşı hiçbir antibiyotik etki göstermezken, örneğine ait uçucu yağın bu organizma üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. *Thymus argaeus'* un, *C. albicans 90028* ve *C. albicans* kilinik suşları üstünde nistatine yakın çaplar oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4).

Mikrodilüsyon Sonuçları

Tüm *Thymus argaeus* ekstraktların en yüksek konsantrasyonlarda *E. coli* ve *E. faecalis*'i etkilediği görülmüştür. Aseton hariç diğer çözücülerin *S. aureus'* u benzer şekilde etkilediği gözlenmiştir. *S. epidermidis'* e en çok etki eden *Thymus argaeus* örneği 0,5 mg/ml ile diklorometan olurken, *P. aeruginasa'* yı 0,9 mg/ml ile metanol ekstraktı, *C. albicans* 90028 ve *C. albicans* izolatı ise aseton ekstraktı en çok etkilemiştir (Çizelge 5).

Thymus argaeus' a ait uçucu yağ sonuçlarının değerlendirilmesi ise şu şekilde yapılmıştır. *T. argeus* 5 mg/ml ile *E. coli'* nin ve *B. subtilis'* in büyümesini engellemiştir. *S. epidermidis*, *B. cereus* ve *P. aeruginasa* için etki eden değer 10 mg/ml olarak belirlenmiştir. *E. faecalis, S. aureus* ve *C. albicans* klinik izolatın hiçbir *Thymus argaeus* uygulamasından etkilenmediği görülmüştür. *C. albicans* 90028' ın ise 10 mg/ml *Thymus argaeus* 'da büyüyüp büyüyemediği kesin olarak anlaşılamamıştır (Çizelge 6).

Çizelge 2. Thymus argaeus'a ait GC-MS sonuçları

Pk[a]	RT[b]	Library/ID[c]	% oranı[d]	CAS no[e]	Qual[f]
1	4.11	α-PHELLANDRENE	0.153	000099-83-2	91
2	4.26	α-PINENE	0.523	000080-56-8	94
3	4.58	CAMPHENE	1.090	000079-92-5	96
4	5.13	β-PHELLANDRENE	0.125	000555-10-2	76
5	5.21	β-PINENE	0.287	000127-91-3	97
6	5.42	3-OCTANONE	0.800	000106-68-3	95
7	5.54	β-PHELLANDRENE	0.868	000555-10-2	87
8	5.64	3-OCTANOL	0.194	000589-98-0	83
9	5.98	DEHYDROXY-TRANS-LINALOOL OXIDE	0.068	054750-70-8	64
10	6.24	δ-2-CARENE	0.420	000554-61-0	97
11	6.47	ORTHO-CYMENE	8.332	000527-84-4	95
12	6.58	LIMONENE	0.472	000138-86-3	97
13	6.65	1,8-CINEOLE	2.667	000470-82-6	70
14	6.85	(Z)-BETA-OCIMENE	0.270	027400-71-1	94
15	7.17	(E)-BETA-OCIMENE	0.484	027400-72-2	95
16	7.50	γ-TERPINENE	2.336	000099-85-4	95
17	7.76	CIS-SABINENE HYDRATE (CIS rel.to OH vs.IP	0.060	017699-16-0	59
18	7.95	CIS-LINALOOL OXIDE (FURANOID)	0.124	005989-33-3	72
19	8.47	δ-2-CARENE	0.464	000554-61-0	94
20	8.89	LINALOOL	10.53	000078-70-6	68
21	8.98	NERYLISOBUTANOATE	0.030	002345-24-6	53
22	9.03	PHYTOL	0.329	000150-86-7	37
23	9.34	1-OCTEN-3-YL ACETATE (=1-OCTEN-3-O ACETAT	0.430	002442-10-6	78
24	9.77	3-OCTANOL ACETATE	0.142	004864-61-3	16
25	10.42	CAMPHOR	1.572	000076-22-2	96
26	10.86	NEROL OXIDE	0.156	001786-08-9	91
27	11.24	BORNEOL (=ENDO- BORNEOL)	3.080	000507-70-0	91
28	11.70	TERPINEN-4-OL	1.098	000562-74-3	94
29	12.23	α-TERPINEOL	6.315	000098-55-5	90
30	13.76	NEROL	0.928	000106-25-2	94
31	14.02	THYMOL, METHYL ETHER	4.943	001076-56-8	94
32	14.25	NERAL	0.457	000106-26-3	86
33	14.38	CARVACROL METHYL ETHER	0.495	006379-73-3	43
34	14.92	NEROL	15.40	000106-25-2	72
35	14.96	LINALOOL BUTANOATE	12.15	000078-36-4	83
36	15.48	GERANIAL	0.542	000141-27-5	50
37	16.05	BORNYL ACETATE	1.189	000076-49-3	99
38	16.43	THYMOL	5.601	000089-83-8	91
39	16.80	CARVACROL (=CYMEN-2-OL)	0.970	000499-75-2	93
40	18.88	THYMOL ACETATE	1.154	000528-79-0	91
41	19.36	NERYL PROPANOATE	1.070	000105-91-9	91
42	19.99	β-BOURBONENE	0.399	005208-59-3	91
43	20.16	GERANYL PROPANOATE	6.493	000105-90-8	90
44	21.36	E-CARYOPHYLLENE	1.084	000087-44-5	98
45	23.81	γ-CADINENE	0.320	039029-41-9	91
46	24.42	BICYCLOGERMACRENE	0.222	024703-26-3	90
47	25.01	β-BISABOLENE	0.319	000495-61-4	90
48	25.13	γ-CADINENE	0.446	039029-41-9	98
49	25.31	GERANYL N-BUTANOATE	0.137	000106-29-6	59
50	25.45	TRANS-CALAMENENE	0.048	073209-42-4	91
51	27.11	GERANYL N-BUTANOATE	0.285	000106-29-6	86
52	27.50	SPATHULENOL	0.253	006750-60-3	93
53	27.68	CARYOPHYLLENE OXIDE	0.622	001139-30-6	90
54	28.69	GERANYL ISOVALERATE	0.261	000109-20-6	90
55	28.92	1,10-DI-EPI-CUBENOL	0.187	073365-77-2	91
56	29.89	β-CEDRENE	1.299	000546-28-1	87
57	30.45	δ-SELINENE	0.291	028624-28-4	64

a: Kolondan kimyasalın çıkış sırası
b: Kolondan kimyasalın çıkış süresi
c: Tanımlanan kimyasalın referans adı
d: Kimyasal maddenin toplam uçucu yağ içerisinde % oranı
e: Kimyasal abstrakt numarası
f: Tespit edilen kimyasalın referans moleküle benzeşikliği

TARTIŞMA VE SONUÇ

Thymus cinsine ait bitkilerin sahip oldukları aromatik (hoş koku) ve tıbbi özelikler dünya genelinde bu grubu oldukça popüler hale getirmiştir. Yapılan bu çalışmada, Kayseri yöresi Erciyes Dağı üzerinde endemik yetişen *Thymus argaeus' un* kök, gövde ve çiçek kısımlarının tamamından (aerial) elde edilen özütlerin, *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.

Çizelge 3. *Thymus argaeus'* a ait disk difüzyon çapları

Mikroorganizmalar	Metanol (mg/disk)			Aseton (mg/disk)			Diklorometan (mg/disk)			Kloroform (mg/disk)			Hegzan (mg/disk)	
	1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg
E. coli	0	7.90	8.89	7.19	7.64	8.12	0	0	0	0	6.99	7.52	0	7.22
E. faecalis	0	0	10.53	0	7.83	11.28	0	7.12	9.19	7.06	8.30	10.96	6.67	7.59
S. epidermidis	0	0	8.37	0	0	7.91	0	9.98	11.65	0	7.65	8.79	7.83	8.24
S. aureus	0	6.74	8.97	0	6.98	8.28	6.94	7.62	10.38	0	8.94	10.87	7.43	9.95
B. cereus	0	8.05	9.48	0	9.36	10.42	-	-	-	7.37	8.45	10.43	6.80	6.90
B. subtilis	0	7.74	9.29	9.68	9.81	10.58	0	6.96	8.61	8.10	9.24	9.91	0	7.61
P. aeruginosa	0	7.71	11.10	0	0	9.60	0	0	10.85	6.88	8.89	10.34	0	6.87
C. albicans 90028	0	0	7.58	0	0	8.53	0	0	9.11	0	6.75	9.01	0	9.07
C. albicans (C.isolate)	0	0	9.01	0	0	9.22	0	7.15	9.42	0	0	8.83	0	7.84

Çizelge 4. *Thymus argaeus* uçucu yağlarına ait disk çapları (mm)

Organizmalar	*Thymus argaeus*		Antibiyotik				
	5 µl	10 µl	Ap	Tt	Sp	Tp	Ny
E. coli	7,89	9,95	23,22	17,84	22,39	23,22	-
E. faecalis	0	0	0	0	0	0	-
S. epidermidis	9,37	9,95	18,28	0	8,91	29,79	-
S. aureus	7,96	13,83	21,27	29,35	10,72	18,51	-
B. cereus	7,89	9,38	0	0	0	0	-
B. subtilis	10,6	11,13	7,47	19,85	0	34,81	-
P. aeruginasa	0	0	0	0	12,6	0	-
C. albicans 90028	16,07	16,18	0	0	0	0	17,3
C. albicans klinik	12,15	16	0	0	0	0	15,49

Kuru madde ağırlığı esas alındığında *Thymus argaeus* metanol extraksiyonunun diğer organik çözücülerden en az 3 ila 5 kat daha fazla verimli olduğu gözlenmiştir.

Esansiyel Yağ

Genel olarak, *Thymus* tür veya alt türlerinin esansiyel/uçucu yağ içerikleri bakımından önemli derecede farklılıklara sahip oldukları gözlenebilmektedir. Bu farklılıkların ana nedenleri olarak; örneklerin alındığı coğrafik bölgeler, iklimsel farklılıkları, toprak koşullarındaki farklılıkları, farklı orijinlerden gelmeleri veya vejetasyon döngüleri önemlilik arz etmektedir [17,18,19,20,21].

Literatürde, ağırlıklı kimyasal içerik analizlerine göre, Thymus taksomlarında tespit edilen bileşikler şöyledir: thymol (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii*, *Thymus pectinatus* var. *pectinatus*), carvacrol (*Thymus broussonettii*, *Thymus vulgaris*, *Thymus capitatus*), thymol/carvacrol (*Thymus caespititius*, *Thymus leucostomus* var. *leucostomus*, *Thymus eigii*, *Thymus spathulifolius*), limonene/thymol (*T. longicaulis* subsp. *chaubardii*), geraniol/geranyl acetate (*Thymus thracicus* var. *longidens*, *T. longicaulis* subsp. *chaubardii*), linalool/ a-terpinyl acetate (*T. longicaulis* subsp. *chaubardii*, *T. leucostomus* var. *leucostomus*), p-cymene/c-terpinene/geraniol/ geranyl acetate/thymol (*Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris*), a-terpineol (*Thymus caespititius*), linalool/(E)-nerolidol (*Thymus zygioides* var. *zygioides*) [17,18,19,20,21,22,23 ,24]. Bu çalışmada hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların GS-MS analizi sonucunda *Thymus argaeus'*un toplamda 57 farklı madde içerdiği tanımlanmıştır. Toplam kimyasal içeriğinin genel yüzdelerine bakıldığında Nerol % 15.407; Linalool Butanoate %12.151; Linalool % 10.535; Cymene % 8.332 ağırlıklı grubu oluşturduğu saptanmaktadır. İçerdiği kimyasal bakımından *Thymus argaeus'un* değişken madde içeriği dikkati çekmektedir. Uçucu yağ kimyasal tiplemesine göre bu çalışmadan elde edilen bulgular taksonlar arasında çeşitlilik gösterdiği kanısını desteklemektedir.

Antimikrobiyal Aktivite

Ekstraksiyon için kullanılan organik solvent farkı gözetmeksizin *Thymus argaeus'* un tüm ekstraktlarının kullanılan suşlarda benzer ölçülerde disk çapı oluşturduğu gözlenmiştir. DMSO, tetrahidrofuran, Tween 20

Çizelge 5. *Thymus argaeus* ekstraksiyonlarına ait mikrodilüsyon sonuçları

	E.coli	*E.faecalis*	*S.epidermis*	*S.aureus*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*P.aerugniosa*	*C.albicans 90028*	*C.albicans (C.isolate)*	MİKTAR (mg/ml)
Metanol										
A	-	-	-	-	-	+	-	+	+	3,6
B	+	+	+	+	-	+	-	+	+	1,6
C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0.9
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.45
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.225
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.1125
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.056
Aseton										
A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
B	+	+	+	+	-	-	+	-	-	1
C	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0.5
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.25
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.125
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.06
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.03
Diklorometan										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
B	+	-	-	+	-	-	-	-	-	1
C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0.5
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.25
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.125
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.06
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.03
Kloroform										
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.5
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.25
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.125
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.06
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.03

Çizelge 6. *Thymus argaeus'* a ait uçucu yağ örneklerinden elde edilen mikrodilüsyon sonuçları

	E.coli	*E.faecalis*	*S.epidermis*	*S.aureus*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*P.aerugniosa*	*C.albicans 90028*	*C.albicans (C.isolate)*	YPDP kontrol	MHB Kontrol	Miktar (mg/ml)
A	-	+	-	+	-	-	-	**?**	+	-	-	10
B	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	5
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	2,5
D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1,25
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0,625
F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0,32
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0,16
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	kont

kullanılmasına rağmen organik solvent ekstraktlarının tam anlamıyla çözünürlüğü sağlanamamıştır. Bu sebeple etkili konsantrasyon değerleri hakkında kesin değerler verilememektedir.

Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MIC değerlerinde bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa* üzerine daha etkili olduğu gözleniştir. Organik ekstraksiyon ya da uçucu yağın ökaryotik mikroorganizmalar üzerine olan etkisine bakıldığında, *Candida albicans* türlerin disk difüzyon testi veya mikrodilüsyon testi uygulamalarında bakterilerden daha fazla etkilendiği belirlenmiştir. *Thymus* grubuyla yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda örneklenen *Thymus* türlerinin uçucu yağ içeriğinde tespit edilen monoterpen, fenol, ve özelikle thymol, carvacol, terpinene, cymene ve linalol içerikleri bakımından zengin oluşları antimikrobiyal etkinliğinin göstergesidir. *Thymus argaeus'* un maya grubu üzerine olan etkisi carvacol grubu kimyasalların oransal

varlığına daha çok bağlanmaktadır. GS-MS sonucunda % 35 gibi dominant bir orana sahip olan carvacrol içeriği antimikrobiyal etkinin mekanizmasını açıklamaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından FBA-06-17 numaralı proje ile desteklenmiştir. Çalışmanın bir bölümü 23–27 Haziran 2008 tarihinde Trabzon'da düzenlenen 19. Ulusal Biyoloji Kongresinde sunulmuştur.

KAYNAKLAR

[1] Alzoreky NS, Nakahara K. 2003. Antimicrobial activity of extracts fromsome edible plants commonly consumed in Asia. International Journal of Food Microbiology, 80: 223–230.

[2] Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and Chemical Toxicology, 40(11): 1669–1675.

[3] Valero M, Salmeron MC. 2003. Antibacterial activity of 11essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology, 85(1–2): 73–81.

[4] Marino M, Bersani C, Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. Journal of Food Protection, 62(9): 1017–1023.

[5] Reddy MVB, Angers P, Gosselin A, Arul J. 1998. Characterisation and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47: 1515–1520.

[6] Ryman D. 1992. Aromatherapy. in: The encyclopaedia of plants and oils and how they help you. PIATKUS, pp.163–165. London, UK.

[7] Schwarz K, Ernst H, Ternes W. 1996. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. Journal of the Science of Foodand Agriculture, 70: 217–223.

[8] Simandi B, Hajdu V, Peredi K, Czukor B, Nobik-Kovacs A, Kery A. 2001. Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme. European Journal ofLipid Science and Technology, 103: 355–358.

[9] Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A. 2001. Antibacterialand antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. Journal of Ethnopharmacology, 76: 183–186.

[10] Rasooli I, Mirmostafa SA. 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. Fitoterapia, 73: 244–250.

[11] Ünlü V, Candan F, Sökmen, A, Donmes E, Tepe B. 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol. Extracts of thymos pectinatus Fich. et Mey. var *pectinatus* (Lamiaceae), Journal of Agriculture and Food Chemistry **51** (1): pp. 63–67.

[12] Youdim KA, Deans SG, Finlayson HJ. 2002. The antioxidant properties of thyme (*Thymus zygis* L.) essential oil: Aninhibitor of lipid peroxidation and free radical scavenger, Journalof Essential Oil Research, 14: 210–215.

[13] Jalas J, 1982. Thymus L. in: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, , vol. 7, pp. 349–382, Edinburgh, University Press.

[14] Davis PH, Mill RR, Tan K, 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh.

[15] Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC. 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 11, Edinburgh University Press, Edinburgh.

[16] Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z., Adıgüzel N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncüyıl Üniversitesi, Ankara.

[17] Baser K H C, Kirimer N, Ermin N, Kürkçüuoğlu M., TüumenG. 1996.Essential oils from our chemotypes of *Thymus zygioides* Griseb. *var. lycaonicus* (Celak) Ronniger, Journal of Essential Oil esearch, 8: 615–618.

[18] Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Arzedi E, Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29: 130–135.

[19] Mold~ao-Martins M, Bernardo-Gil MG, Beir~ao da Costa,ML. Rouzet M. 1999. Seasonal variation in yield and composition of *Thymus zygis L. subsp. sylvestris* essential oil. Flavour Fragrance Journal, 14: 177–182.

[20] Ruiz C, Ramos-Cormenzana A, Cruz T, Cabo M, Castillo M, Jimenez J. 1993. Chemical composition and ntimicrobial activity of the essential oils of different samples of *Thymus baeticus* Boiss., Phytotherapy Research, 7: 92–94.

[21] Saez F. 1995. Essential oil variability of *Thymus hyemalis* growing wild in Southeastern Spain, Biochemical Systematics Ecology, 23(4): 431–438.

[22] Baser KHC, 1994. Koyuncu M. Composition of the essential oils of two varieties of *Thymus longicaulis* C. Presl. *subsp. chaubardii* (Boiss. et Heldr. Ex Reichb. Fil.) Jalas. Journal of Essential Oil Research, 6: 207–209.

[23] Tzakou O, Verykokidou E, Roussis V, Chinou I. 1998. Chemical composition and antibacterial properties of *Thymus longicaulis subsp. chaoubardii* oils: Three chemotypes in the same population. Journal of Essential Oil Research, 1: 97–99,

[24] Tepe B. Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, Polıssıou M, Sokmen A. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl), Food Chemistry 84: 519–525.