

ÖZET

Ülkemizde çok zengin bir bitki florası vardır. Bunların çoğu da halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır. *Viscum album* (ökse otu)’da bunlardan birisidir. Bu bitki ile bir çok çalışmalar yapılmış, (in vivo) antikanser, antispazmatik, antispetik sindirim, diüretik, narkotik, damar açıcı, damar sertliği, sara, kalp hastalıkları, yüksek tansiyon gibi durumlarda etkin olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ise amaç bitkinin yapraklarından elde edilen ekstratın in vitro ortamda, seçilen beş bakteri suşuna karşı antibakteriyel bir etkisinin olup olmadığını gözlemlemektir. Bunun için bitki yaprakları kurutulup, özel bir değirmende dövülüp, toz haline getirilir. Daha sonra bunlar sokslette etil alkolle tüketildi. Kalan madde etil alkolden ayrıştırılarak sırasıyla *E. coli* ATTC 11229, *B. subtilis* KUEN 6633, *S. aureus* ATCC 29213, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *P. auroginosa* ATTC 9027 suşlarında denendi. Agar Difüzyon Yöntemiyle E.Ava emdirilmiş diskler kullanılarak, ekstraktın etkin olup olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak bu suşlardan *E. coli* ve *B. subtilis* hariç diğerlerinde etkin olduğu saptandı. Daha sonraki aşamada ise seri dilüsyon yöntemi kullanılarak bu maddelerin hangi ortamlarda etken olduğu tespit edildi. *S. aureus* için 1/ 8, *P. auroginosa* ve *S. enteritidis* için ise 1/ 4 oranlarında etkin olduğu belirlendi.

SUMMARY

Our country has a highly rich flora. Most of these plants have been used as a potential drug in treatment of **diseases**. *Viscum album* (Mistletoe) is the one of them. Its anticarcinogenic, antispasmodic, antiseptic, digestive, diuretic, emetic, narcotic, stimulant, vasodilator effects were investigated. Mistletoe has been recommended for such illnesses as apoplexy, arthrosis, asthma, arteriosclerosis, cancer, chilblains convulsions, epilepsy, heart disease, hypertension.

In this research the main purpose is to identify whether the *Ava* extract has or has not antibacterial effects on the chosen 5 bacterial strains. For this reason, plant leaves were dried and grinded in a special grinder and their powder was obtained. This plant powder was consumed in the Soxhlet with the ethyl alcohol. Ethyl alcohol was evaporated in rotary evaporator and extract was obtained. This extract then diluted with 10 ml (0.9 NaCl %) physiological water and had been tried on the *E. coli* ATCC 11229, *B. subtilis* KUEN 6633, *S. aureus* ATCC 29213, *S. enteritidis* ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 strains respectively. The observation had been done by using Agar diffusion method (with the *E. Ava* absorbed paper discs). Whether the extract was effective on the strains except *E. coli* and *B. subtilis*. Then the ratio of the extract was identified by the Serial dilution method. As a result of this research the extract of *Ava* had the MIC values for the *S. aureus* was 1/ 8, *P. aeruginosa* and *S. enteritidis* were 1/ 4 ratios.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada büyük bilimsel ve manevi yardımlarını gördüğüm, danışman hocam Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e teşekkür ederim. Kendisi her zaman öğrencilerini desteklemiş, onların yanında olmuştur.

Ayrıca bu çalışmaya başlamamda desteklerini esirgemeyen, beni motive eden aileme, bitirmemde büyük yardımlarını gördüğüm değerli eşim Uğur Beyhan 'a,

Literatür araştırması sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Ebru ÇAKIR 'a,

Bilgisayar ile yapılan düzenlemelerde ki yardımlarından dolayı Funda Şentürk'e ,

Laboratuarda ki ekim aşamasında yardımlarından dolayı Meltem Akbaş'a,

Manevi desteğini ve teknik yardımlarını gördüğüm Fatma KANDEMİRLİ'ye, Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Laboratuar deney aşamalarında teknik yardımlarını gördüğüm Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

STFA Anadolu Teknik Lisesinde ki öğretmen arkadaşlarıma ve öğrencilerime,

Fotoğraf çekimlerinde ve metod kullanımında yardımlarından dolayı arkadaşım Mehmet TUNÇ'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLOLAR DİZİNİ	xi
 1.GİRİŞ	 1
2.KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR	5
2.1.Genel Bilgiler	5
2.1.1. <i>Viscum album</i> ' un sistematigi	5
2.2.Çalışmalarda Kullanılan Protojen Bakteriler	17
2.2.1. <i>Staphylacoccus aureus</i>	17
2.2.2.Görünüm ve Boyanma Özellikleri	17
2.2.3.Üreme ve Biyokimyasal Özellikler	18
2.2.4.Dirençlilik	19
2.2.5.Hastalık Yapıcı Özellikleri	19
2.2.6. <i>Bacillus subtilis</i>	20
2.2.7. <i>Eschrichia coli</i>	21
2.2.8.Görünüm ve Boyanma Özellikleri	21
2.2.9.Üreme ve Biyokimyasal Özellikler	21
2.2.10.Dirençlilik	22
2.2.11.Hastalık Yapıcı Özellikler	22
2.2.12. <i>Salmonella entriditis</i> ' in Görünüm ve Boyanma Özellikleri	23
2.2.13.Üreme ve Biyokimyasal Özellikler	23
2.2.14.Dirençlilik	23
2.2.15.Hastalık Yapıcı Özellikler	24
2.2.16. <i>Pseudomonas auroginosa</i>	25
 3.MATERYAL VE METOD	 26
3.1.Materyal	26
3.1.1.Ekstarakt	26
3.1.2.Microorganizmalar	26
3.1.3.Besiyerleri	26
3.2.Ekstrat Elde Edilmesi	26
3.3.Besiyeri ve Bakterilerin Hazırlanması	27
3.3.1.Besiyerlerinin Hazırlanması	27
3.3.2.Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması	28
3.3.3.Bakterilerin Mc Farland Bulanıklık Standartına Ayarlanması	28

3.3.4. Exstrakların Olası Antibakteriyel Aktivitelerinin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler	29
3.3.4.1. Agar Difüzyon Yöntemi	29
3.3.4.2. Agar Difüzyon Yönteminde Kullanılan Diskler	29
3.3.4.3. Agar Difüzyon Yöntemi İle Antibakteriyel Etkinin Araştırılması	29
3.3.4.4 Zon Çapı Ölçümü	30
3.3.4.5. Seri Dilüsyon Yöntemi İle Antibakteriyel Etkinliğin Araştırılması	31
4. BULGULAR	32
4.1. Agar Difüzyon Yöntemi Sonuçları	32
4.2. Seri Dilüsyon Yöntemi Sonuçları	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

A.v.a	: Ahlat <i>Viscum album</i> 'u
K.v.a	: Kavak <i>Viscum album</i> 'u
S.v.a	: Söğüt <i>Viscum album</i> 'u
ATCC	: American Tıp Committee
E.Ava	: Ahlat <i>Viscum album</i> ekstract
P.auroginosa	: <i>Pseudomonas auroginosa</i>
S.enteriditis	: <i>Salmonella enteriditis</i>
B.subtilis	: <i>Bacillus subtilis</i>
E.coli	: <i>Echerichia coli</i>
S.aureus	: <i>Staphylococcus aureus</i>
C ₂ H ₅ OH	: Etil alkol
µm	: micron 0.001mm

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Viscum album</i> (Ökse otu)	4
2.1. <i>V. albumun</i> hayat döngüsü	8
2.2. (I) Syringaresinol mono-0-gloside	14
4.1. 0,5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş petrilerde agar difüzyon yöntemine göre Ahlat viscum albumdan elde edilen ekstratın <i>S.aureus</i> üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	32
4.2. 0,5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş petrilerde agar difüzyon yöntemine göre Ahlat Viscum album elde edilen ekstratın <i>S.enteriditis</i> üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	33
4.3. 0,5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş petrilerde agar difüzyon yöntemine göre Ahlat Viscum album elde edilen ekstratın <i>P.auroginosa</i> üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	34
4.4. 0,5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş petrilerde agar difüzyon yöntemine göre Ahlat Viscum album elde edilen ekstratın <i>B.subtilis</i> üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	35
4.5. 0,5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş petrilerde agar difüzyon yöntemine göre Ahlat Viscum album elde edilen ekstratın <i>E.coli</i> üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	36

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Sarkoma gelişiminde <i>V. album</i> un etkisi	11
2.2: 20-Methylcolenthrene’le muamele edilen hayvanların sağ kalmasında <i>Viscum album</i> ekstraktının etkisi	12
2.3: <i>V. album</i> ekstarktının farklı difüzyonlarının srcoma gelişimine etkisi	12
4.1: Seri Difüzyon yöntemine göre <i>E. Viscum album</i> ’ un <i>S.Aureus</i> , <i>S.Enteriditis</i> ve <i>P.auroginosa</i> üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması.	37
5.1: Seri Dilüsyon Yöntemine Göre <i>E. Viscum album</i> ’ un üç bakteri üzerindeki MBC ve MIC değerlerinin karşılaştırılması.	39

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi gayesiyle kullanılışlarını tarif eden en eski eserler Çin kaynaklarıdır. Shen- Mung’ un “Materia Medica” kitabı M.Ö 3217 senelerinde yazılmıştır. Bu devirlerde Çinlilerin tanıdıkları bitkisel drogların miktarı 100 civarındadır. İnsanların bitkilerle hazırladıkları ilaçları kullanma tarihlerinin daha eski olduğu bilinmektedir (Baytop, 1980).

Yaklaşık 8- 10 bin senelik bir geçmiş olan tarım, insanoğlunun yarım milyon senesini kapsayan göçebelik ve bir sonraki ürününü aradığı avcılık devresini değiştirmiştir. İnsan bilimi (antropoloji) ile uğraşanlar insanoğlunun yeryüzünde bulunduğu devreleri tarımın gelişimi açısından;

- a) 3 milyon yıl tam yabani bir hayat
- b) 10000 yıl çok az değişikliğe uğrayan el ile ekim
- c) 150 yıl nüfus artışı ile birlikte modern tarıma geçiş olarak 3’ e ayrılmışlardır (Akçin, 1987).

Sümerlilerden kalan ve halen British Museum’ da bulunan tabletlerden bu kavmin milattan 4000 sene önce bir çok bitkisel drog (afyon, şeytanterisi, adamotu, banotu vs.) tanımakta olduğu ve hatta ilaç hazırlanacak olan bitkilerin gölgede kurutulmasının lazım geldiği tespit edilmiştir (Friedlander, 1952).

Eski Mısırlıların milattan 3000 sene önce nane, kişniş, nar, akasya, asma gibi bitkilerden ilaç hazırlamakta oldukları ve bu bitkilerin ziraatini yaptıkları anlaşılmaktadır. M.Ö 1555 senelerinde yazılmış olduğu tahmin edilen papiruslarda Mısırlıların en aşağı 3000 seneden beri sarısabır, adasoğanı, acımarul, pelin, çiğdem, zambak, tarçın vs. gibi drogları ,eski Yunanlıların da bugünkü drogların mühim bir kısmını tanımakta oldukları kaynaklarda belirtilmiştir.

Hipokrat (M.Ö. 460- 377), pelin, tarçın, baldıran, centiyane, ravent, papatya, adasoğanı, maydanoz, haşhaş, kuşkonmaz, bonotu, güzelavratotu, mirha gibi drogların tedavi edici özelliklerini belirtmiştir.

Aristo (M.Ö 384)' un talebesi olan Theophrast (M.Ö 371- 287) “ Historia Plantarum” isimli kitabında ise çavdarmahmuzu, biber, afyon, eğreltiotu, kitre zamkı gibi droglar üzerinde incelemeler yapmıştır.

Dioskorid (M.S 77) 1. Asırda Adana Kozan civarında yaşamış ve “ Materia Medica” adlı eserinde 500 kadar bitkisel drogdan bahsetmiştir.

Plinus (M.S 23-79) ise “Historia Naturalis” isimli 37 ciltlik eserinde 1000’ e yakın drogu tedavi tesirlerine göre (amara, emetica, adstringentia vs.) sıraya koymuştur (Baytop, 1980).

Roma İmparatorluğu’ nun parçalanmasından sonra, Türk İslam alemi Yunan ve Roma tıbbi bitkileri ile drog ilmine kendisinden de bazı şeyler katarak daha sonra gelen medeniyetlere nakletmiştir (Çelebioğlu ve Baytop, 1947).

İbni Sina (M.S 17) : “Kanun” latincesi “Conan Medica” olan ve 17’ inci yüzyıla kadar batı aleminde rehber olarak kullanılan bu eserin ikinci cildinde basit droglardan (simplica) , beşinci cildinde ise mürekkep ilaçlardan (composita) bahsetmektedir (Baytop , 1980). İbni Sina bu eserinde kargabüken, banotu, baldıran, kurboğan, kenevir, kokulu yonca, haşhaş ve kamala gibi bitkilerden bahsedip, bunlarla meydana gelen zehirlenmelere karşı antidotlar vermektedir.

Ziyaettin İbn El Baytar (1197- 1248) Malagalı büyük bir nebatatçı’dır. İspanya , Yunanistan ve Anadolu’ yu gezdikten sonra “ Müfredat- ı İbn-i Baytar Fit-Tıp” adlı eserinde 1800 kadar bitkisel drog 130 hayvansal drogdan bahsetmiştir. Bu bitkisel droglara; ebucehil karpuzu, kroton yağı, hindistan cevizi, pireotu örnek olarak verilebilir. Ayrıca bu kitapta damıtma yoluyla gül suyu hazırlanmasından ilk defa bahsedilmiştir (Baytop, 1980).

Yalnız yüksek bitkilerde bilinen tür adedi 335000 civarında olduğu halde,bugün ancak 13000 kadar tıbbi özelliğe sahip bitki tanınmaktadır , bu küçük karşılaştırma bize bitkiler aleminin formakognozık, kimyasal ve farmakolojik araştırmalar ve yeni ilaç ilkel maddelerinin keşfi için ne tükenmez bir kaynak durumunda olduğunu gösterecek niteliktedir (Baytop, 1980).

Tıbbi bitkiler eski çağlardan beri insanlar tarafından tanınmış, bilinmiş ve kendi yaşayış tarzlarına göre sağlıklarını korumak için ilaç yapımında kullanılmıştır. Bununla beraber son 20- 30 yıldan beri farmokoterapinin sentetik asıllı, yeni ilaç kaynaklarının keşfindeki başarısı, her ülkede bitkisel kaynakların bütün yönleri ile inceleme ve kullanılma probleminin önemini ortaya çıkarmıştır. Yakın zamana kadar bitkilerde bilinmeyen fizyolojik etkenli pek çok ilaç hammaddesi keşfedilmiştir (Makaklı, 1982) .

Çalışma materyali *Viscum album* Loranthaceae ailesine mensup olup; yaşadığı yere göre ectoparazittir (Bitkinin dışında yerleşip, konak bitkinin epidermisine emeçler gönderirler). Beslenme şekline göre ise yarım parazittir. Bu gruptaki parazit bitkiler yeşil renktedirler, fotosentez yaparlar. Yani; karbon asimilasyonu yönünden ototrofturlar. Yalnızca konak bitkiden su ve madensel tuzları alırlar. Bu bitki yaşadığı ağaç dallarının odun kısmına kama gibi kökler gönderir, su ve madensel maddeleri emer (Hasman , 1972).

Türkiye’ de bir müstahzar olmamakla beraber Avrupa ülkelerinde, ekstrelerinden mustahzar hazırlanmakta yararlanılır (Akçin, A., 1980).

Çekem (Fructus Visci Albi) bitkisi rezin, saponinler, organik asitler, alkaloidler taşımaktadır. Meyan kökünün yakı sakızı ile ezilmesinden elde edilen karışım Güney Doğu Anadolu’ da yakı halinde romatizma ağrıların giderilmesinde kullanılmaktadır. Ezilmiş meyvalar çıban üzerine konarak çıbanın açılması ve cerahatın dışarı çıkması sağlanır. Bitkinin diğer isimleri Burç, Çekem tohumu , Gevele, Gökçe, Göselek, Ökseotu’ dur (Baytop 1984).

- Ağrılar için karaüzümle birlikte dövülüp içilir. İdrar tutucu olarak kullanım alanı vardır.
- 20 gramı 3 su bardağı suyla kaynatılır. Günde 3 defa 1 su bardağı içilir. 3 gün süreyle içmek yeterlidir. Tansiyon düşürücü etkisi vardır.
- 1 çekem 25 gr.
2 balmumu 25 gr.
3 antep fıstığı sakızı 50 gr.
4 eğlik kökü

Tereyağında kızartılıp, süzülür. Süzülen yağ çekem, balmumu ve sakızla beraber kaba konur. Az ateşte tahta kaşıkla macun kıvamına gelene kadar karıştırılır. Dış yara merhemi olan bu macuna 1,5 kg süzme bal eklenirse eğerlik macunu olur. Verem hastaları, mide ve bağırsak ülserinden muzdarip olanlar sabah aç karnına, akşam tok karnına birer kaşık yerler.

- Tansiyon düşürücü ve damar sertliğini önleyici olarak kullanılır.

Bir yemek kaşığı drog 1 Lt. Suyla kaynatılıp, süzülür. Her yemekten sonra birer bardak içilir.

- İdrarını tutamayan çocuklar için, 50 gr *Viscum album* meyvası ezilerek macun haline getirilir. Bunlar fındık büyüklüğünde haplar olarak günde iki defa kullanılır (Baytop, 1984).

Ökseotu yaprağı tansiyon düşürücü ve damar sertliğine karşı kullanılır. Bir kaşık dolusu yaprak 1 Litre suda demlenerek her öğünden sonra 1 bardak içilir (Başer, 1986).

Antispazmatik, tansiyon düşürücü ve diüretik olarak , ayrıca halk tıbbında epilepsiye karşı da kullanılır. Bileşiminde; viskotoksin, kolin, asetilkolin, vissin denen yapışkan bir madde vardır (Karamanoğlu, 1977).



Şekil 1. 1 *Viscum album* (Ökse otu)

2.KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

2.1 GENEL BİLGİLER

2.1.1. *VISCUM ALBUM*'UN SİSTEMATİĞİ

Dicotyledonae sınıfına , *santales* takımına , *Loranthaceae* familyasına mensup olan *Viscum album* yarı parazit bir bitkidir.

İlaç yapımında kullanılan *Viscum album*, *Loranthaceae* ailesinin bir üyesidir. Türkiye’de bu cins, bir cins ve 3 alt cinsle temsil edilir. Bunlar;

- *Viscum album*, L.subs. album
- *Viscum album* subsp. *Austriacum*(wiesb)
- *Viscum album* subsp.*abietis*, köknar (fir) ağacı üzerinde yetişir (Miller,1982).

Viscum album subsp. *Austriacum* çamlarda (*Pinus L.*) yetişir (Miller ,1982). Farklı ağaç yada çalılarda yetişen yarı parazit bir bitkidir. Ormanlık, tropik veya ılıman bölgelerde yetişebilir (Golse, 1955; Nogl ve Stain , 1989; Quezel ve Santa 1963).

Ökse otu, su ve suda çözülmüş mineralleri emeçleri sayesinde konak bitkinin dallarındaki ksilem (odun) borularına kadar uzanıp, bitkinin suyunu emer. Konak bitki bu nedenle genellikle hasara uğrar (Lawence, 1989; Polinin 1969; Yakar 1976).

Türkçe’de *Viscum album* ,ökseotu olarak bilinir. Bunun nedeni, kuşları yakalamada yem olarak kullanılmasıdır (Baytop, 1984).

Türkiye’de bu bitki antik çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır (Baytop, 1984) . Buna ek olarak, Almanya ve İsviçre’de bir kaç ilaç karışımının yapılmasında ana madde olarak faydalanılmış olup, kanser ve bazı

kalp-damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Luther ve Becker, 1987; Rote liste 1994).

2.1.2. *Viscum album*'un Hayat Döngüsü

V. Album'un gelişim evresi:

*Viscum album*un erkek ve dişi çiçekleri Mart ve Mayıs aylarında tomurcuk halindedir. Yumurtanın üstünde bulunan nektar sinek arı ve böcekleri çekerek, polinasyonu garanti altına alır.

Viscum album tanecikleri ilk önce yeşildir, Aralık ayına doğru beyaz ve küresel bir yapı kazanır. Tohumlar kuşlar sayesinde yayılır. Ağaçlar yapraklarını döktüğünde , yiyecek bulamadığı durumlarda kuşlar için en çekici gıda *Viscum album* tanecikleridir. *Viscum album* tanecikleri üzüm şeklinde olup her biri bir tohum (çekirdek) taşır ve bunun etrafındaki mezokarp (yumuşak bir tabaka) ise yapışkan bir madde olan viscin ile doludur. Viscin iki nedenle çok önemlidir. Birincisi kuşlar için iyi bir gıda, ikincisi ise yapışkan olması sayesinde tohum dallara yapışabilir (fiksasyon). *Turdus viscivorus* (Amerikan bülbülü) tüm meyveyi yer. Tohumlar sindirilemediğinden kuşun sindirim kanallarından geçerek dışkı ile dışarı atılır. Kuşun dışkısının içindeki tohumla beraber ağaç dalına yapışır ve buradaki tohum çimlenir. *Sylvia atricapilla* ise , sadece taneciğin dış kısımlarını yer bu da tohumların konak ağaç üzerine düşmesine sebep olur. Buradan dağılıp, dallara yapışır ve filizlenir. (Becker, 1986; Köprülü, 1924; Salle, Frochot ve Andary, 1993).

Viscum album'un konak bitkideki döngüsü +, a,b,c,d olmak üzere (Becker, 1986; Luther ve Becker, 1987) beş evrede gerçekleşir.

Birinci Evre (+) :

Tohum viscin yardımıyla konak bitki dalına yapışır. Hypocotyl hızlı hücre bölünmesi sayesinde uzanır. 60 gün sonra hypocotyl uzunluğu ortalama 5.6 mm' ye ulaştığında bu evre tamamlanır. Bu evre sırasında konak bitkiden hiçbir uyarı gelmez. Filizlenme ve ilerleme için ışık gereklidir. En uygun sıcaklık 15- 20 °C arasındadır.

İkinci Evre (a) : Tutunma evresi

Hipokotil , konak bitkide, belli bir uzunluğa ulaştıktan sonra ucu düzleşir, emeç denilen bir şekil alır. Bu parazit bitkinin tipik bir organıdır (bir çeşit fiksasyon konisi). Konak bitki ve emeçleri arasında vakumla yapışma meydana gelir ve hava basıncı tohumun konak bitkiye tutunmasını garanti eder.

Üçüncü Evre (b) : Konak dalın kabına nüfuz etme:

Tutunmadan aylar sonra, bitkinin yukarı uç bölgesinin görüntüsü çok az değişir. Tohumun endosperm kısmı bitkinin büyüme konisinin oluşumunda kullanır, emeç uçları biraz daha gelişerek son büyüklüğüne (1.8 mm) ulaşır. Emeç meristematik bir karaktere sahiptir. Devamlı bölünerek hücre yığını yaratır. Bu da konak bitki kabuğunu parçalar ve öldürür. Bu şekilde, bölge yeni oluşan hücreler tarafından ağ şeklinde sarılır.

Dördüncü Evre (c) : Primer emeç' in gelişmesi

Bu evre boyunca ökse otunun emeçleri yayılıp, kambiyuma nüfuz eder ve ilk iki yaprak gelişir. Onların oluşumu genelde bir yılı alır, ama iki yıldan daha fazla da sürebilir.

Beşinci Evre (d) : Parazit devresi

Emeğin ksilem içine yayılmasıyla, konak bitki hücreleri ve parazit bitki hücreleri arasında direk kontak kurulmuş olur. Bitki bu evreleri tamamladığında, kendi gerçek parazitik fazına girdiği söylenebilir (Becker, 1986; Luther ve Becker, 1987; Salle, 1983).

Şekil 2.1. *Viscum album*'un hayat döngüsü

Viscum album parazit fazına girdiğinde, endofit sitemini geliştirir. Bu sistem gereğince konak bitkiden su ve mineral tuzları emerek kendini geliştirir. Yapraklar oluşarak, 3.5- 6 cm uzunluğuna, 1- 2 cm genişliğine ulaşır. Genelde iki yıllık bir yaşam süreçleri vardır. Bazıları (*Viscum album*), yapraklar geliştikten 5- 6 yıl sonra çiçek ve meyva vermeye başlar. Bundan sonra nonparazit ve parazit fazlar konak bitkide tekrarlanır (Becker, 1986; Salle, Frochot ve Andary, 1993).

Parazit yaşam biçimi nedeniyle *Viscum album* antik çağdan beri ağaçların düşmanı olarak bilinir. Türkiye’ de buna karşı bir mücadele programı yoktur. Her nasılsa, ağaçlarında *Viscum album* geliştiğini gören insanlar ağacın *Viscum album* gelişen dallarını keserek savaşmaya çalışmaktadırlar.

Loranthaceae ailesinin *viscum* türünün zehirli bileşiklerden, histamine, inositol, saponin, tyramine ihtiva ettiği tespit edilmiştir (Kingsbury, 1974).Duke (1985)’a göre bir bardak 10 gr’ lık bitki çayı içilebilir, Rose (1986)’a göre oldukça zararlı, Tyler (1986)’a göre güvenilir değildir.

Bitkinin viscotoxin denen toksik proteinlerin karışımını içerdiği, bunların da RNA ve DNA sentezini etkilediğini ve öldürücü dozların, anemiye ve karaciğerde hemoraja sebep olduğu tespit edilmiştir (Kingsbury, 1974).

Iscador (ökse otunun fermentasyonu sonucu elde edilen ekstrakt)’ın , farelerdeki 20- methylcholanthrene’ in sebep olduğu kanseri yavaşlattığı tespit edilmiştir. Haftada iki kez 15 hafta boyunca, 1 mg/ doz’ luk iscador karın zarına uygulanmış (intraperitoneal) ve bunun farelerde tümör oluşumuna neden olan ölümleri önlediği bulunmuştur. Daha düşük dozlarında da etkili olduğu saptanmıştır. 0,166, 0,0166 ve 0,00166 mg/doz’ lar uygulandığında sırayla hayvanların %67, %50 ve %17’ sinde kanser gelişmediği görülmüştür (Kuttan, et al. 1990).

Yarı parazit bitki olan *Viscum album*’ dan hazırlanan iscadorun, birkaç neoplastic durumda klinik olarak kullanışlı olduğu bulunmuştur. Iscadorun, kültürdeki dönüştürülmüş hücre hatlarının gelişimini yavaşlattığı ve hayvanların ve katı tümörlerin gelişiminin diğerlerine göre daha yavaş olduğu belirlenmiştir. Iscaddaki aktif maddenin, moleküler ağırlığı 5000 olan bir peptidin varlığından

kaynaklandığı rapor edilmiştir (Kuttan, et al. 1990). Sitotoksik lektinlerden MLI ve MLII' nin de iscadurun biyolojik aktivitesine yardımcı olduğu belirlenmiştir. Iscador ve onun aktif bileşenlerinin humoral ve hücre kökenli bağışıklık sistemini aşağıda belirtildiği şekilde uyardığı tespit edilmiştir (Kuttan, et al. 1990).

- i) neoplastic hücrelerin gelişimini yavaşlatır veya ,
- ii) neoplastic hücrelerin transformasyonunu, ancopenlerin ve diğer sinyal transduksiyon yollarının aktivasyonu yavaşlatır veya ,
- iii) transform edilmiş hücrelerin gelişimini , yavaşlatabilir veya reserve transformasyon yapabilme özelliğine sahip olmak suretiyle önleyebilir.

Iscadurun transform edilmiş hücrelere, transform edilmemiş hücrelerden daha sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu ayrıca, transform edilmiş hücrelerdeki hücresel komponentin iscadorda bulunan aktif peptite bağlanmasının gözlenmesiyle sabitleştirilmişti. Iscadordaki aktif bileşiğin hücre proliferasyonuna yol açan bazı hücresel olayların yavaşlaması ile, transforme edilmiş hücrelerin gelişiminde gerilemeye sebep olduğu bildirilmiştir (Kuttan, et al. 1990).

Kontrol grubundaki hayvanlara karsinogen uygulandıktan 40 gün sonra kanser gelişirken, iscadorla muamele edilenlerde 120 günde kanser gelişmemiştir (Tablo 2.1). Sadece hayvanlardan birinde 140 gün sonra kansere rastlanmıştır. Bu hayvandaki tümörün de, kontrol grubundakilerle karşılaştırıldığında oldukça ufak olduğu görülmüştür. Tümör gelişen hayvanla diğerleri karşılaştırıldığında gıda alımında ve vücut ağırlığında bir fark olmadığı görülmüştür. Bu da kalori alımının tümör gelişimiyle ilgili olmadığını göstermiştir (Kuttan, et al. 1990).

Tümörün histopatolojik analizi onun bir fibrosarcoma olduğunu açığa çıkartmıştır. Tedavi edilmeyen hayvanların hepsi, tümör burden nedeniyle ölmüştür. Bu deneyde tümörün metastazı söz konusu değildir.

20-methylcholantherene enjekte edilen hayvanların hayatta kalmasına Iscador' un etkisi Tablo 2.2' de verilmiştir. Kontrol grubundaki hayvanlara kanserojen madde verildikten 80 gün sonra tümör nedenli ölümler gözlenmiştir.

Iscador' la tedavi edilen hayvanların ise hepsi 180 gün sonra bile yaşamaktaydılar. Deney tamamlandığında hayvanlardan biri hariç hepsinin sağlıklı olduğu tespit edilmiştir.

Farklı dilusyonlarda Iscador verilen gruplardaki sağ kalma ve kanser gelişme etkisi Tablo 2.3.' de verilmiştir.

Kuttan ve arkadaşları (1990)' nın yaptığı bir çalışmada; methylcholanthrene uygulanan hayvanların % 50' sinden fazlasında ilk 6 hafta içinde kanser gelişmiş, tüm hayvanlarda kanser gelişmesi 11 haftayı bulmuştur. Bu gruptaki tüm hayvanlar 20. haftada ölmüşlerdir. 1/ 3 ve 1/ 5 dilusyonlarında Iscadorla muamele edilen hayvanların hiçbirinde sarcoma gelişmediği ve 20 haftadan sonra bile hayvanların hayatta olduğu görülmüştür. 1/ 30 dilusyonda Iscadorla muamele edilen hayvanların (0,166 mg/ animal) sadece % 33' ünde sarcoma geliştiği ve hayvanların % 50' sinin 20. haftada hayatta olduğu görülmüştür. 1/ 300 dilusyonda iscadorla muamele edilen hayvanların (0,0166 mg/ animal) sadece % 50' sinde sarcoma geliştiği ve hayvanların %50' sinin 20. Haftada hayatta olduğu görülmüştür. Sonraki 1/ 3000 oranındaki dilute ıscador solusyonuyla muamele edilen hayvanların (0,00166 mg/ animal) üzerinde ise sarcoma gelişimini önleyici bir işaret görülmemiştir. Hayvanların % 83' ünde sarcoma geliştiği ve hayvanların sadece %17' si 20. Haftada sağ kalabilmişti.

Tablo 2.1. Sarcoma Gelişimine *Viscum album*' un Etkisi

Sarcoma Geliştiren Hayvanların Sayısı								
<u>Tedavi</u> (muamele)	40 gün	60 gün	80 gün	100 gün	120gün	140 gün	160 gün	180 gün
Kontrol	8/ 15	8/ 15	15/ 15	-	-	-	-	-
Iscador	0/ 15	0/ 15	0/ 15	0/ 15	0/ 15	1/ 15	1/ 15	1/ 15

Bu deneyde Kuttan ve arkadaşları (1990)'nın izlediği metod aşağıdaki gibidir;

- Sabit dozda (200 mg/ 0,1 ml/ mouse) 20- methylcholenthrene farelerin sırt kısmına enjekte edildi.
- Haftada iki kez (1 mg/ 0,1 ml/ mouse)iscador 15 hafta boyunca verildi.
- Fareler 6 ay gözlemlendi.

Tablo 2.2.- Methylcholenthrene' le muamele edilen hayvanların sağ kalmasında *Viscum album* Ekstrakt' ın etkisi

Hayatta kalan hayvanların sayısı								ölen hayvanların sayısı
Tedavi	60 gün	80 gün	100 gün	120 gün	140 gün	160 gün	180 gün	
Kontrol	15/ 15	8/ 15	5/ 15	2/ 15	0/ 15	-	-	15/ 15
Iscador	15/ 15	15/ 15	15/ 15	15/ 15	15/ 15	15/ 15	15/ 15	0/ 15

Bu deneyde Kuttan ve arkadaşları (1990)'nın izlediği metod aşağıdaki gibidir;

- Sabit dozda 20 methylcholenthrene (200 mg/ 0.1 ml/ fare) farelerin sırtına enjekte edildi.
- Haftada iki kez (1 mg/ 1 ml/ fare) iscador 15 hafta boyunca verildi.
- Fareler 6 ay boyunca gözlemlendi.

Tablo 2.3.- *Viscum album* ekstraktının farklı dilusyonlarının sarcoma gelişimine etkisi

Dilusyon	<i>Viscum album</i> _Enjekte dozajı	Sarcoma gelişen hayvanların %' si	20 hafta yaşayan hayvanların %' si
	0	100	0
1/ 3	1,66 mg/ animal	0	100
1/ 5	1,0 mg	0	100
1/ 30	166 µg (0,166 mg/animal)	33	67
1/ 300	16,6 µg (0,016,6 mg/an.)	50	50
1/ 3000	1,66 µg (0,00166 mg/an.)	83	17

Bu deneyde Kuttan ve arkadaşları (1990)'nın izlediği metod aşağıdaki gibidir;

- Sabit dozda 20 methylcholenthrone (200 mg/ 0.1 ml/ fare) farelerin sırtına enjekte edildi.
- Haftada iki kez (1 mg/ 1 ml/ fare) iscador 15 hafta boyunca verildi.
- Fareler 6 ay boyunca gözlemlendi.

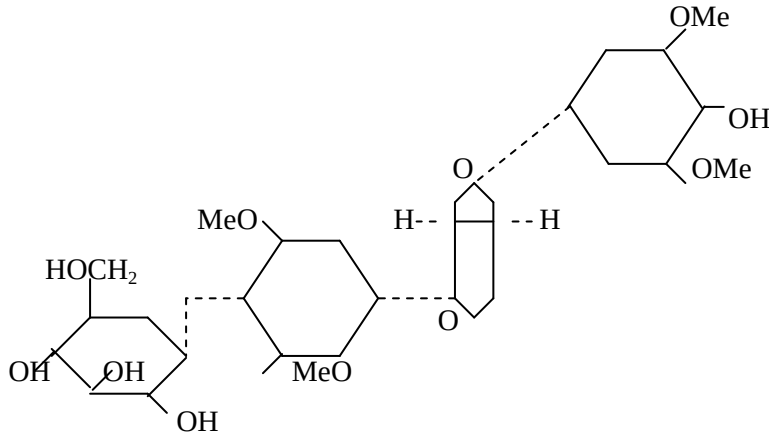
Daha önceden iscadorun kansere karşı aktivitesi tespit edilmişti (Khwaya, 1986). Ayrıca tümörün tekrarlama durumunda da yavaşlatıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Salzer, and Havelec , 1978) ve bu çalışmada iscadorla yapılan ve kimyasallarla başlatılan kanseri yavaşlatan ilk rapor olmuştur.

Iscadorun etki mekanizmasının hem hücre hem de ilik kökenli bağışıklığı uyatarak etkili olduğu tespit edilmiştir (Rentoe , 1981). Iscadorun T hücrelerini uyardığı, (Neinhans, and Keroi, 1970) ve IFN, IL- 1 ve TFN gibi sitokinlerin üretimini artırdığı gösterilmiştir.

Şimdiki bulgular , Iscadorun çok düşük konsantrasyonlardaki miktarının dahi kimyasal olarak başlatılmış kanseri yavaşlatabileceğini ispat etmektedir. Loranthaceae ailesinden olan *Viscum album*' dan elde edilen viscotoxin B performik asitle oksidize edilip, trypsin ve chymotrypsin ile parçalanmıştır. Açığa çıkan peptidler ion exchange chromatogrgohy ile ayrılıp, Edman degradation yöntemiyle amino asit sıraları belirlenmiştir. Serbest lysine, 6 tryptic ve 3 chymotryptic parçalar ilk parçalanmış ürünlerdir. Bunlar sayesinde 46 a.a' li viscotoxin B' nin a.a sırası belirlenmiştir (Samuelsson and Peterson, 1971a). Viscotoxin B: Lys- Ser- Cys- Cys- Pro- Asn- Thr- Thr- Gly- Arg- Asn- Ile- Tyr- Asn- Thr- Cys- Arg- Leu- Gly- Gly- Gly- Ser- Arg- Glu- Arg- Cys- Ala- Ser- Leu- Ser- Gly- Cys- Lys- Ile- Ile- Ser- Ala- Ser- Thry- Cys- Pro- Ser- Tyr- Pro- Asp- Lys, Burdaki Cys' teinler yarım cystein' dir. Bu a.a sırası aynı bitkideki viskotoxin A3' ün a.a sırasına çok benzemektedir (Samuelsson and Peterson 1971a).

Wagner ve arkadaşları (1986)'nın yaptığı bir araştırmada: kardioaktif ilaçların yapısında kullanılan *Viscum album*'un yaprak ve gövdesinden, 4' -0- glucoside (syringin), syringenin 4' -0- apiosyl-1- 2- glucoside, syringaresinol 4', 4'' - di- 0- glucoside (eleutheroside E) ve syringaresinol mono- 0- glucoside (I) izole edilmiştir (Şekil 2.2). İzole edilmiş bileşikler *Viscum album* ekstraktının sulu veya alc- HPLL- parmak izi analizi için uygun bulunmuştur. Bir BuOH (butanol) ekstrakt olan bu

bileşikler CAMP- phosphodiesterase inhibitor aktivitesine benzer aktivite göstermişlerdir.



Şekil 2.2.- Syringaresinol mono - O - glucoside (I)'nin formülü

Pouckova ve arkadaşları (1986)'nın bir çalışmasında ise, insan meme kanseri transplante edilmiş athymic fareye Isorel M. (elma ağacında parazit olan beyaz *Viscum album*dan hazırlanan protein preparatı) iki günde bir, kg başına 400 mg olacak şekilde enjekte edilmiştir (400 mg/ kg, 2 günde bir). Bunun tümörün gelişiminde hiç bir durdurucu etkisi olmadığı görülmüştür. Buna karşın, cyclophosphamide' in farkedilir bir şekilde tümör aktivitesini yavaşlattığı gözlenmiştir.

Bushueva ve arkadaşları (1988)'de yaptıkları bir araştırmada: pamuk yağı bitkisinin çekirdeğinin ve mistletoe (*Viscum album*)' dan alınmış lectin'in (ML1)' in karşılaştırılmasını yapmıştır. Bu toksinlerin izole edilmiş B- zincirleri, düşük pH (5-4) ve yüksek ısıda (45 °C)' de ve guanidine – HCl' nin denature edici etkisi sonucu yapısal farklılaşmaya tabi tutulmuştur. Düşük pH ve yüksek ısıda gözlenen protein konformasyonları aynı olmamasına rağmen benzer olduğu gözlenmiştir. Bu yapı farklılığının doğal bir pH 7 , 25 °C den kaynaklandığı buaraştırmacılarca açıklanmıştır. Böylece azalmış floresans şiddeti ve tryptophan parçacıklarının seçkin geçirgenliği göze çarpmıştır .Bu konformasyon farklılığı protein konformasyonunun guanidine- HCl tarafından açılmış olmasından da kaynaklanıyordu.

Parçalı denature protein yapısının, düşük PH ve yüksek ısıda B- zincirinin fonksiyonel olarak önemli ara durumu gözlenmiştir ve hücre zarıyla toksik proteinlerin ilgili olduğu sonucuna varmıştır.

Viscum album' dan elde edilen (Mistletoe) lectinin (ML- A) ökaryotik ribozomlar üzerindeki etki bölgeleri Endo, et al, 1988 tarafından çalışılmış, ML- A ile sıçan karaciğerinin tedavisini, anilinle izole edilmiş rRNA tedavisi izlemiştir, 28S rRNA' dan yaklaşık 450 nükleotidle bir fragmetin bırakılmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra fragmetin dizisinin analizi sonucu; (28 S- RNA' da) phosphodiester bağının analine duyarlı bölgesinin A- 4324 ve G- 4325 pozisyonları arasında olduğu görülmüştür. Risin A zincirinin olduğu gibi ML- A, N- glikosidik bağını A- 4324' de, 28 S rRNA ribozomlarda bölerek inaktive ettiği açıkça görülmüştür .

Viscotoxin A3, pepsin ve trypsin' le sindirildikten sonra açığa çıkan peptitler izole edilmiş, iki peptit, S-S bağının yerini belirlemede anahtar fragmentler olduğu bulunmuştur. İki peptidin aminoasit kompozisyonları ve fragmentlerin kısmi aminoasit dizileri, performik asit oksidasyonundan sonra izole edilmiş ve sonuç olarak şunlar elde edilmiştir (Samuelsson, 1975).

Viscotoxin A3 aminoasit dizisinde ;

Bir S-S bağı; 16 (Cys) parçacığı ile 26 (Cys) parçacığını bağlamaktadır. Diğer iki S-S bağı; 3 (Cys) ve 4 (Cys) parçacığını ve 32 (Cys) ve 40 (Cys) parçacıklarını ve S-S bağlarının dizilişi viscotoxin A3' e çok sıkı (60- pact) bir yapı vermektedir ki bu maddelerin , örneğin ısıya karşı farkedilir stabilitesinde de aksettirilmiştir (Samuelsson, 1975).

Becker ve Schwarz (1971) tarafından *Viscum album* ekstraktları; antihipertensif olarak yüksek kan basıncı tedavisi için ve arteriosklerosis vakalarında ağızdan , tümör ve anthroses'a karşı ise damardan verilmiştir. Aktivite farklılıklarının hasat zamanına ve konak hücre türüne göre değiştiği gözlemiştir. Uniform maddeler kallus kültüründen elde edilmiştir. Tüm bitkilerin hydroponic kültürleri başarılı olmamıştır. Kallus kültürleri, Murashige ve Skoog (1962) 'nun nutrient solusyonlarına ; α - naphthylacetic asit veya 2, 4- dichlorophenoxyacetic asit

ve kinetinin farklı konsantrasyonlarda eklenmesiyle ve %10 hindistan cevizi sütü eklenerek hazırlanmıştır. Kallus oluşumunda tohum kullanılmasıyla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Becker ve Schwarz (1971)'in görüşüne göre Rf' ün üzerinde bulunan sarı- yeşil bölgeler flavonoidlerden (eg. Quercetin – glycosidleri) kaynaklanmaktadır. Ara Rf sıralarında bulunan flavanoidler ise ethyl acetate ekstraktında daha iyi gözlenmekteydi. 6A

AA- 1 çözücü sisteminde (a.a leri ayırmak için), chromatograma NP/ AEG uygulaması sonucu (mavi floresans bölgeler) Rf sırasının üstü ve ortasında mavi floresans bölgeler açığa çıkarır ve Rf Ca 0.9' da flavonoidler tekrar çözünmemiştir. 6B Ninhydrin reagenti ile muamelesi sonucunda Rf sırasının aşağısında ve ortasında, yaklaşık 10- kırmızı- mor dan kırmızı- kahverengi amino asit bölgeleri üretilir. Belirlenen diğer aminoasitlerden , L- lysine ve L- arginine proline, L- serine, alanine, threonine, glutamic asit (kahverengi bölgenin tam üzerine örter) ve tyrosine ve leucine (Rf 0.5) yüksektir.

Wagner (1984)'e göre göre en az 18 serbest aminoasit bulunmaktadır, tüm viscum ilaçlarının TLC amino asit yolları birkaç değişiklikte aynıdır ve bu nedenle de tanımlama amacıyla kullanılır .

Viscum album ekstraktının (Helixor) natural killer hücre (NK) stotoksitesinin in-vitro ortamda insan peripheral kan mononükleer hücrelerini (PBMC , Peripheral blood mononuclear cells) etkileme gücü araştırılmıştır (Planck, 1989).

2.2. Çalışmalarda Kullanılan Patojen Bakteriler

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

İnsan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen *Staphylococcus* genusu bakterileri oldukça eski zamanlarda bazı araştırmacılar tarafından enfeksiyonlarda görülmüş olmakla beraber ilk *Staphylococcus* adı 1880’de Ogston tarafından kullanılmıştır. Üremeleri esnasında birbirlerinden ayrılmayarak üzüm salkımı şeklinde, düzensiz kümeler oluşturmalarına bakılarak bu bakterilere bu ad uygun bulunmuştur.

Staphyococcus aureus adı altında anılan tür özellikle, koagülaz olumlu, manyetolü aerop ve anaerop koşullarda asit oluşturarak parçalayan alfa toksin yapan, novobiocin’e duyarlı, insan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda geniş çapta piyogen toksik ve besin zehirlenmesi niteliğinde enfeksiyonlara neden olan stafilokoklar toplanır. Doğada oldukça yaygın olan toz, toprak, eşya, insan ve hayvan deri mukozası, ağız ve nazofarinks floralarında bulunan *Staphylococcus aureus* bakterilerinin günümüz için en önemli özelliği kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin bir çoğuna hızla dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlara daha sık rastlanmasıdır (Pelczar, 1989).

2.2.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Teker teker incelendiklerinde stafilokok hücreleri diğer koklara göre daha çok olmak üzere tam yuvarlağa yakın şekildedir. Stafilokoklar yaklaşık 1 mm çapındadırlar. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünce çoğaldıklarından üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Burada kokların şeklinin tam yuvarlak ve bakterilerin birbirine benzer görünürde olması stafilokoklar için karakteristik ise de streptokoklarla bir arada bulundukları zaman ikisini görünümüne göre ayırt etmek olanaksızdır. Bu takdirde stafilokokları streptokoklardan ayırt etmekte kullanılan en yararlı yöntem katalaz testidir ve stafilokoklarda test olumlu olduğu halde, streptokoklarda olumsuzdur.

Stafilokoklar çeşitli bakteriyolojik bağlarla kolay boyanırlar ve gram (+)' dirler. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdürler. Bazı kökenlerinde belirgin bir kapsül ya da mukus katmanı olur. Hücre çeperleri özel yapıda olup peptidoglycan, teithoic asit ve türe özgü prsipitinogen protein birimlerini içerir. Bazı kimyasal maddeler ve özellikle penicilinlerin, lizostafin ve asitlerin etkisiyle erirler veya L formlarına dönüşürler. Lizozimin eritici etkisine dirençlidirler (Bilgehan , 1995).

2.2.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerlerinde ürerlerse de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalırlar. Fakültatif anaeropturlar. Oksijenli ortamda üremeyi tercih ederlerse de az miktarda oksijenle hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler. Optimal olarak 37 °C' de ve pH 7.4' te ürerler. Jeloz besiyerinde bolca ürer ve yuvarlak kenarlı, mat, S tipinde ve 1.2 mm çapında koloniler yaparlar. Uygun ortam bulurlarsa koloniler 6- 8 mm çapına ulaşabilirler.

Genellikle altın sarısı renginde pigment oluştururlar ve koloniler bu renktedir. Ayrıca porselen beyazı renginde koloni oluşturan stafilokoklar'da vardır. İnsanlardan hastalık etkeni olarak ayrılan stafilokok kökenleri bu ikisi arasında sarı ve turuncunun çeşitli renklerinde koloni yapabilirler.

Buyyonda başlangıçta bir bulanıklık meydana getirerek ürerler. Sonra besiyeri durulur ve dipte ince bir çökelti oluşur. Kanlı jeloz besiyerinde üretilen stafilokoklardan çoğu kolonilerin etrafında tam hemoliz yaparlar.

Stafilokoklar başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratları parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Fakat gaz oluşturmazlar. Ancak şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri özellik taşımakta olup bu karbonhidratı yalnız koagülaz pozitif (patojen) stafilokoklar parçaladıkları halde koagülaz negatif olanlar parçalayamazlar. Bu nedenle manitole etki, bir patojenlik deneyi olarak kullanılmaktadır ve koagülaz testinden sonra *Staphylococcus aureus*' u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı yöntemdir. %1 glikoz içeren besiyerlerinde üretilince daha belirgin olarak katalaz (+), oksidaz (-)dirler. Nitratları, nitritlere indirgerler (Okar, 1989 ve Beka, 1991).

2.2.4. Dirençlilik

Stafilokoklar oldukça dayanıklı bakterilerdir. Diğer bakterilerin çoğu 60 °C' de 30 dakika bekletilmekle öldükleri halde stafilokoklar bir saat sonra bile canlılıklarını muhafaza edebilirler. Aynı şekilde sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklılıkları da fazladır. Bazı dezenfenktanların alışlagelmiş konsantrasyonlarına dayabilirlerse de kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların, alçak konsantrasyonları dahi onları öldürebilmektedir.

Genel olarak sofonamid ve antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre dayanıklı oldukları gibi, stafilokoklar hızlı kemoterapötiklere direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen suşlar haline dönüşürler (Bilgehan, 1995).

2.2.5. Hastalık Yapıcı Özellikleri

Stafilokoklar hastalık meydana getirebilme bakımından çeşitli durumlar gösterirler. İnsanların %10- 40' ının burunlarında *Staphylococcus aureus* bulunabilir. Burun dışında nazofarinks, deri , perineum, gastroentestinal sistem ve genital bölgede *S. aureus* kolonizasyonlarına rastlanmaktadır. Bunun dışında aşağıda da açıklanacağı gibi stafilokoklar besin zehirlenmelerinden, lokal iltihaplanmalar ve nihayet ağır sepsislere varacak kadar çeşitli ve değişik derecede hastalık yapıcı özelliği gösterebilirler (Okar, 1989).

2.2.6. *Bacillus subtilis*

Endospor oluşturan, gram (+) çomaklardır. *Bacillus* cinsi içerisinde birçoğu saprofit aerob, sporlu, çomakçıklar bulunmaktadır.

Bacillus subtilis' in sporları doğada çok yaygın olup toz, toprak gübre, bitki ve hayvanlar ile süt ve sularda bulunan bu bakteri, yaklaşık 1.5- 3 µm boyunda, 0.5- 0.8 µm eninde tek tek, bazen zincirler yapan, çomakçık şeklindedir. Peritrih kirpikleri bulunduğundan hareketli olup, sporları oval şekilde ve subterminaldir. Bakterinin kalınlığını aşmaz ve hücre şeklini bozmazlar. Kapsülü yoktur, gram (+)'dirler. Bazı kapsüllü, hareketsiz ve uzun zincir yapan varyantları üreyebilirler. Bu yolla hafif bir bulanıklık ve yüzeyde kalın ve buruşuk bir zar yaparak üremesi karakteristiktir. Jelozdaki kolonileri kirli beyaz, gri renkte mat olup kenarları pürüklü, yüzeyi bol granürlü R tipindedir. Zamanla bol üreyerek, besiyerinin yüzeyini buruşuk bir zar gibi kaplar. Bazı suşları kırmızımsı ve kahverengi, daha az olarak turuncu ve siyah pigmentli oluşturabilirler. Bu olay besiyerinin yapısı ile ilgilidir.

Jelatine yapılan batırma kültürlerinde, batırma çizgisi boyunda jelatini sütun ya da kese biçiminde eritir. Sporları çeşitli etkilere karşı dayanıklıdır. Bakteri aslında saprofit olmakla beraber doğrudan doğruya doku ve özellikle göz içersine girmesi sonucunda panoftalmi, iridoksilit gibi göz yangınları meydana getirebilir. Bazı besin zehirlenmelerinden sorumlu olduklarından kuşku lanılmaktadır. Ekmeğin yumuşayarak bozulmasına neden olur.

Kültür süzüntülerinden subtilin adı verilen bir kısım bakterilere karşı inhibitör etki gösteren bir madde de elde edilmiştir. Fare peritonuna verildiklerinde bazen ölüme yol açarlar. Ancak hiç bir zaman *B. anthracis* kadar tehlikeli değildirler (Bilgehan, 1995).

2.2.7. *Escherichia coli*

Enterobacter familyası içerisinde yer alan bu tür, hafif hareketli, genelde hareketsiz , gram (-) , çomakçıklar biçimindeki bakterilerdir. Endospor oluşturmazlar, değişebilen anaeropturlar. Fermantatif metabolizmaları var olup, glikozu parçalayarak asit ve gaz oluştururlar.

2.2.8. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

E. coli yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1.0- 1.5 µm eninde , düz uçları yuvarlak çomakçık şeklinde bakterilerdir. Genelde etraflarında bulunan kirpikleri sayesinde yavaşta olsa hareketlidirler. Bazen de hareketsiz görünebilirler. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram (-) negatiftirler. Etraflarında kapsül maddeleri bulunmakla beraber organizmada bağırsak dışındaki yerlerden soyutlanan kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur.

2.2.9. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

E. coli buyyon ve jeloz besiyerinde kolayca ürer. Değişebilen anaerob olup, optimal üreme ısısı 37 °C' dir. 15- 45 derecelerde üreyebilirler. Özellikle 44 °C' de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden ayırtedici bir özelliktir. Ortalama pH 7.2' de ürerler. Bunyonda homojen bulanıklık yaparlar. Jelozlar hafif kabarık, düzgün 1- 2 mm çapında parlak S tipi koloniler yaparlar.

Koli basilleri birçok şekerleri asit ve gaz meydana getirerek parçalarlar. Laktoza olan etkileri, bu şekere etki etmeyen diğer bağırsak bakterilerinden ve özellikle *Salmonella* ve *Shigella*' lardan ayırt edici bir özellikleridir. *Chromopenic E. coli* kolonileri laktozu parçalayıp asit oluşturdıklarından mavi madeni parlaklık verirler. Aynı temele dayalı olarak Eozin metilen mavisi besiyerine mavi- siyah ve yeşilimsi parlaklıklı SS agar, MC Conkey Jelozu vb. Besiyerlerinde de koli basilleri kırmızı koloniler yaparlar.

E. coli bakterileri triptofandan indol yaparlar. Metil kırmızısı testi olumlu, Voges proskauer testi olumsuzdur. Simon'un sitratlı besiyerinde üremezler (Cingilli, 1997). Bu 4 karakter yani İndol (İ), Metil Kırmızısı (M), Voges proskauer (V) ve sitrat (C) birlikte incelenir ve ilk harflerin birleşmesinden oluşan İMVİC testleri adını alırlar.

Özellikle bağırsak bakterilerini bu testlerle olan ilişkilerine göre ayırt etmek mümkündür. Bu durumda *E. coli* için İMVİC testleri (+) veya (-) ' dir denir.

2.2.10. Dirençlilik

E.coli oldukça dirençli bir bakteridir. 60 °C ısıda 30 dakika, oda ısısında uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa dirençlidir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir. Malaşit yeşili, Brilliant yeşili ve fuksin gibi boyalar, safra, safra tuzları, sodium tetraiyonat, bizmut sitrat, sodium sülfat, sodium dezoksikolat selenit tuzlarına karşı dirençleri *Salmonella* ve *Shigella* gibi bakterilere göre daha azdır. Bu maddeler belli konsantrasyonlarda besiyerlerine konularak *E.coli* basillerinin inhibisyonu ile, birlikte bulundukları *Salmonella* ve *Shigella* ' lar için ayırteci ve çoğaltıcı özellikler kazandırılır (Beka, 1991).

2.2.11. Hastalık Yapıcı Özellikleri

E. coli uzun yıllar fırsatçı patojen yani; kendisi doğrudan hastalık yapmayan ancak, vücutta başka bir nedenle hastalığa bağlı olarak direnç düştüğünde fırsat bularak, kendi hastalığını yapan bir bakteri olarak tanınmış iken, 1980' li yıllardan bu yana elde edilen bulgular ile *E. coli* ' nin insanları ölüme kadar götürebilen hastalıklara neden olan ve doğrudan hastalandırma özelliğine sahip (primer patojen) ırklarının bulunduğu gösterilmiştir.

İnsanlarda *E.coli* ' nin yaptığı hastalıklar intestinal (bağırsak hastalıkları) ve ekstraintestinal (bağırsak dışı hastalıklar) olarak iki grupta incelenir. Bağırsak hastalıkları arasında gastroenteritis (ateş, diare, kramp) şeklinde ortaya çıkması önemlidir. Gastroenteritis yani *E.coli* ' ler arasında özellikle çocuklarda görülen dizanteriye ve koleraya benzer diareye neden olan ırklardan söz edilebilir.

Bağırsak dışı hastalıklar olarak idrar yolları enfeksiyonu, menenjit, eklem sertleşmesi, yara enfeksiyonları, böbrek yetersizliği, bağışıklık ile ilgili hastalıklar, safra kesesi enfeksiyonları, karaciğer apsesi sayılabilir (Robert and Bryan, 1986).

2.2.12. *Salmonella Enteritidis*'in Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Salmonella bakterileri yaklaşık olarak 2.0- 5.0 µm boyunda 0.7- 1.5 µm eninde çomakçık şeklinde peritrih kirpikleri aracılığıyla hareketli, sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar ve gram (-) negatiftirler.

2.2.13. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

Salmonella bakterileri alışılmış birçok besiyerinde ürerler. Aerop ve fakültatif aneropturlar. 37 °C' de en iyi ürerlerse de üreme ısıları sınırları oldukça geniştir. (20 °C- 40 °C) Optimum üreme pH 7.2 seviyesinde olmaktadır. Buyyon ve benzeri sıvı besiyerlerinde homojen bulanıklık yaparlar. Jelozda ise büyük 1- 3 mm çapında, yuvarlak, çoğu kez kabark, düzgün yüzeyli ve düz kenarlı koloniler yaparlar. Ama bunun yanında daha ufak çaplı küçük koloniler yapan türleri de vardır.

Salmonellalar laktoza etki etmezler. Bu karakterleri onları *Escherichia*' lardan ilk ayırımında önem taşır. İçerisinde laktoz ve uygun bir ayıraç bulunan selektif plak besiyerine (Endo- EMB) ekilen bu bakterilerden laktoza etkili olanlar koyu kırmızı, siyah, yeşilimsi parlak koloniler yaparlar. Laktozdan başka *salmonella*'ların hiç bir türü şekerlerden genellikle sukroz, adenitol ve salisine etki etmezler.

2.2.14. Dirençlilik

Bu bakteriler , kuyu sularında ve toprakta uzun süre canlı kalabilirler. Soğuğa karşı çok dirençlidirler. Liyofilize durumlarda yıllarca canlı kalabilirler.

Doğrudan temas edildiğinde antiseptikler çabuk etkilidirler. Normal konsantrasyonlardaki klor, sulardaki *Salmonella*' ları öldürür. Ancak dışkı parçaları

ve diğer organik maddeler içindeki *Salmonellalar'* a bu maddenin etkisi daha az olabilmektedir.

Salmonellalar' ın saklanması %1 agar ve %2 NaHPO₄ 12H₂O bulunan dik jeloza batırma kültürü yapıp, üretildikten sonra sıkıca kapatılmak suretiyle yapılmaktadır.

Bu şekilde aylarca canlı kalabilirler. Ayrıca *Salmonella'* lar liyofilize edilebilirler (Unat, 1982).

2.2.15. Hastalık Yapıcı Özellikler

Gram (-) negatif diğer bakterilerdeki gibi *Salmonella'*lar da da endoksinler bulunmaktadır. Endotoksin etkisinin *Salmonella'* ların hücre çeperindeki lipopolisakkaritlerde bulunduğu, bunların polisakkarit kısmının 0 antijenleri niteliğinde oldukları, lipid kısmının ise toksik olduğu bilinmektedir. Endotoksinlerin organizma üzerindeki belli başlı etkileri şöyle özetlenebilir: Ateş yükselmesi, lökopeni, lökositoz, önce hiper sonra hipoglisemi, kan basıncının düşmesi ve letal şok.

Salmonellaların yaptığı hastalıklar 3 tipte toplanırlar:

- I- Genel enfeksiyon niteliğindeki hastalıklar
- II- Entero- kolitler (Besin zehirlenmeleri)
- III- Sepsis ve lokalize organ hastalıklar

Salmonella enteritidis hayvanlarda patojendir. Hayvanlardan insanlara, süt, yumurta, krema ve bunlardan yapılan çeşitli besin maddeleriyle kolayca bulaşırlar. Bunların yenilmesi ile insanlarda kısa süreli akut ateşli veya çoğu kez ateşsiz şiddetli kronik, bulantı ve kusma ile seyreden enfeksiyonlar görülmektedir (Robert and Bryan, 1986, Unat, 1982).

2.2.16. *Pseudomonas auroginosa*

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan bu tür gram (-) aerobik çomakcıklar biçimindeki bakterilerdir.

Düz veya hafif kıvrık çubuklardır ama helix şeklinde değildir. 0.5- 1.0 µm çapında 1.5- 5.0 µm uzunluğundadır. Polar flagellalar sayesinde hareketlidir. Catalase pozitif ve genelde oxidase pozitiflerdir.

Bu bakteriler toprakta ve suda çok bol bulunur. Bu cins beş grup içerir. Bütün Pseudomonaslar aerobik olarak gelişebilir, ancak bazıları nitratı elektron acceptörü olarak kullanıp enarobik olarak da gelişebilir. Birkaç türü insan ve hayvanlar için patojendir, diğerleri bitkiler için patojendir. Bazıları et ve diğer ürünlerin bozulmasına sebep olur. Gelişmesi için, karbon kaynağı olarak kullanıldığı bileşiğe bakılarak tür tayini yapılır. Bazı türler Karbon kaynağı olarak 100' den fazla bileşik kullanabilir. Şekerli medya sadece hafifçe asitlenir ve şekerlerden asit üretimine bakmak tür için yeterli değildir. Suda çözüne mavi pigment pyocyanin ve suda çözünen floresan pigment olan pyoverdini üretir. Organizma su ve toprakta saprofit olarak bulunur. Ama fırsatçı protein olarak, canlılarda uriner sistem enfeksiyonlarında görülür. Ayrıca yara ve yanıklardan da izole edilmiştir (Pelczar,1986).

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Ekstrakt

Bu çalışmada Loranthaceae familyası üyelerinden *Viscum album*' un kurutulmuş yapraklarından elde edilen ekstrakt kullanıldı.

3.1.2. Mikroorganizmalar

Kullanılan bakteriler GYTE mikrobiyoloji laboratuvarındaki suşlardan seçildi.

- | | |
|----------------------------------|------------|
| 1- <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 29213 |
| 2- <i>Salmonella enteritidis</i> | ATCC 13076 |
| 3- <i>Escherichia coli</i> | ATCC 11229 |
| 4- <i>Bacillus Subtilis</i> | KUEN 6633 |
| 5- <i>Pseudomonas auroginasa</i> | ATCC 9027 |

3.1.3. Besiyerleri

Bakteri kültürlerinin hazırlanmasında Nutrient Agar (DIFCO) besiyeri, mikroyet çalışmasında ise Muller Hinton Broth (DIFCO) besiyeri kullanıldı.

3.2. Ekstrakt Elde Edilmesi

Kavak, söğüt ve ahlat ağacından toplanan *Viscum album* (ökse otu) yaprakları ayıklanarak -20°C ' de kullanılacağı güne kadar muhafaza edildi.

Dolaptan çıkarılan yapraklar yıkanarak 30°C ' de kurumaya bırakıldı. Kuruyan yapraklar önce havanda döğüldü, daha sonra Pascal Engineering 1600 USA vidalı değirmende (çelik topla) çekildi ve kına tozu inceliğine getirildi.

Sokslet kullanılarak ekstrakt eldesi: 30 gr. numune tam olarak tartılıp, dikkatle kartuşa dolduruldu. Kartuş bir pamukla örtüldükten sonra apareyin ekstraktör kısmına yerleştirildi. Apareyin balonunun darası alındı. Balon yarısına kadar çözücü ile doldurulduktan sonra tüketmeye başlandı. Çözücü özel bir ısıtıcıda muntazam kaynatıldı. Yağlı maddenin tamamı tüketildikten sonra işleme son verildi. Tüketmenin tamamlanıp tamamlanmadığını kontrol etmek için sifondan akan sıvının son damlaları bir filtre kağıdı üzerine alınıp, çözücünün uçması beklendi. Kağıt üzerindeki yağlı bir leke numunede hala yağ olduğunu göstermektedir. Bu halde tüketmeye devam edildi. Daha sonra balon bir yatık soğutucuya bağlanarak çözücü uçurulmuştur.

Hekzan, çözücü olarak kullanılıp bitkinin yağı ayrıştırılmış oldu. Etil alkolle muamele edilerek de bitkide bulunan diğer maddeler çözüldü (Saponinler, triptenik bileşikler). Aparey 4 saniyede 1 damla damlayacak şekilde ayarlandı. Bu arada çözücü de yatık soğutucudan geçirilerek ayrıştırıldı. Çözücünün kalan kısmı ise rotary evaporator de 20 dakika döndürülerek tamamen ayrıldı. Kalan katı madde 10 ml fizyolojik su ile çözündürülüp balondan alındı. + 4 °C' de bir gece tüp içerisinde saklanmadan önce 2 µm çapındaki filtreden geçirilip sterilize edilerek, ekstrakt elde edildi.

3.3. Besiyeri ve Bakterilerin Hazırlanması

3.3.1 Besiyerlerin Hazırlanması

Bu çalışmada bakterilerin gelişimi için genel amaçlı bir besiyeri olan nutrient agar ve Muller Hinton Broth kullanıldı. Besiyerleri hazırlandıktan sonra steril 121 °C' de 1.5 atm' de 20 dakika petriyelerle beraber sterilize edildi. Nutrient agar petri kaplarına, her birine 4 mm (20 ml) olacak şekilde dökülüp, oda sıcaklığında katılaştıktan sonra +4 °C' de soğutularak kullanılacağı zamana kadar saklandı.

3.3.2. Bakteri Suspansiyonlarının Hazırlanması

Bakteri kültürleri +4 °C' de saklandı. Bunlardan 21 günde bir petri kabına pasajlar alınarak tazelendi.

Çalışma sırasında sıcaklığı oda ısısına getirilmiş bakteri kültürlerinden petrilmiş nutrient agara pasaj alınıp 37 °C' de 24 saat etüvde inkube edildi. Böylece taze bakteri kültürü kullanılmış oldu.

Burada önemli olan, tazeleme sırasında saf bakteri kültürlerinin dekontaminasyonudur.

3.3.3. Bakterilerin Mc Farland Bulanıklık Standardına Ayarlanması

Mc Farland Standart Tüpünün Hazırlanması: Mac Farland standart tüpü 0.36 N sülfirik asidin 99 ml' sine 0.5 ml baryum sülfat katılması ile hazırlandı. Bu standart tüp yaklaşık 10^8 mikroorganizma/ml bir konsantrasyona eşittir (0.5- 1 Mc Farland) (Beşe, 1989).

Antibakteriyel çalışmalarda bakteri suspansiyonları hazırlanırken Mc Farland bulanıklık standartlarından yararlanıldı. Etüvde 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiş bakteri kültürlerinden, bakteri suspansiyonu hazırlamak için %0.9 NaCl (serum fizyolojik) kullanıldı. Deney tüpüne 5 ml %0.9 NaCl konuldu.

Daha sonra iğne öze ile petrillerdeki bakteri kültürlerinden alınan bakteri kolonileri tüpün kenarında ezilerek sıvıya karıştırıldı. Deney tüpü (2- 3 saat 37 °C' lik) etüvde saklanarak besiyerinin bulanıklığı Mc Farland'a No 0.5 (0.5 Mc Farland= 10^8 CFU/ml) standart tüpüne eşit oluncaya dek bekletildi. Standart ve test tüpünü karşılaştırma, üstünde seri biçimde horizontal siyah çizgiler bulunan bir beyaz karta karşı bakılarak yapıldı (Beşe, 1989).

Organizmaların suspansiyonu standart tüpten daha açık ise tüp bir kez daha yeniden inkübe edildi.Organizma suspansiyonunun bulanıklığı standardını geçtiği durumlarda ikisi eşitleninceye kadar steril fizyolojik suyla sulandırıldı (Beşe, 1989).

3.3.4. Ekstrakt'ın Olası Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılmasında Kullanılan Yöntemler

3.3.4.1. Agar Difüzyon Yöntemi

Maddelerin antibakteriyel aktivitelerinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Bu yöntemde, standardize edilmiş besiyerlerinin yüzeylerine belli yoğunluktaki suspansiyonların ekilmeleri, sonra besiyerlerinin belirli noktalarına çeşitli yöntemlerle bırakılan etken (ekstrakt) madde emdirilmiş, disk etrafında üremenin önlendiği zon' ların çaplarının ölçülmesiyle değerlendirildi. (Dortunç 1990, Akan, v.d. , 1991).

3.3.4.2. Agar Difüzyon Yönteminde Kullanılan Disklerin Hazırlanması

Bu çalışmada 6 mm çapında in-vitro tanı koymada kullanılan boş diskler (OXOID antimikrobia Susceptibility Test Discs) kullanıldı.

20 Disk micropleyt'e yerleştirildi. 400 µl ekstrakt üzerlerine eklenerek emmesi beklendikten sonra bir gece 37 °C' lik etüvde kurutulmaya bırakıldı.

$$\text{Disklerin içerdği } Viscum \text{ album konsantrasyonu} = \frac{400 \mu\text{l (Ekstrakt)}}{20 \text{ (disk sayısı)}} = 20 \mu\text{l Ahlat } Viscum \text{ album ekstrakt/disk}$$

3.3.4.3. Agar Difüzyon Yöntemiyle Antibakteriyel Etkinin Araştırılması

Bu amaçla, 0.5 Mc Farland (10⁸ CFU/ ml) bulanıklığında standarda göre ayarlanmış bakteri suspansiyonları kullanıldı. Petrilere ekilen bakteri suspansiyonunun miktarı 0.5 ml olarak belirlendi.

Denenecek 5 bakteri suşumuz vardı , bunların kontrol edilmeleri için her bakteriye bir diskli bir de kontrol bakteri ekimi yapmamız gerekiyordu. Bu nedenle 10 adet besiyeri içeren petri kullanıldı. Bu 10 petri dolaptan alınıp, 37 °C' lik etüvde yüzeyleri kurutuldu. Bir disk için bir kontrol için olmak üzere bir bakteri suşunda 0.5 ml olmak üzere 2 petriyede dökülüp 60 °C' lik açılı ile petri döndürülerek 3 yönden eküvyon çubuğuyla yaydırıldı. Yaydırma işleminden sonra bir müddet kurumaya bırakıldı.

İnoculum kurutulduktan sonra agar yüzeyine ekstrakt emdirilmiş disklerden 4 tanesi; dış çeperden en az 14 mm, birbirlerinden 22 mm ayrı olacak şekilde steril pensin ucuyla iyice bastırılarak yerleştirildi.

Bir müddet oda sıcaklığında bekledikten sonra 37 °C' de inkubatöre konuldu.

Bu çalışmalar her bakteri türü için tekrarlandı.

18- 24 saat arası tüm ölçümler yapıldı. Standart süre olan 18 saat içindeüreme bölgelerinin kenarları çok daha belirgin ve keskin olarak gözlemlendi.

3.3.4.4. Zon Çapı Ölçümü

18 mm' lik bir bölge veya daha büyük bir bölge veren organizma 'duyarlı' kabul edilmekte veya ekstraktın minimal inhibe edici konsantrasyonu içinde olduğu bilinmektedir (Beşe, 1989).

3.3.4.5. Seri Dilusyon Yöntemiyle Antibakteriyel Etkinliğin Araştırılması

Sıvı dilusyon yöntemiyle eldeki ekstraktın antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amacıyla 0.5×10^8 CFU / ml'ye ayarlanmış bakteri suspansiyonları kullanıldı. İşlem için steril 96 WELL mikropleytler, 20- 200 µl sıvı çekme kapasitesine sahip mikropipet ve besiyeri olarak da Mueller- Hinton Broth kullanıldı. (Bu besiyeri klinik olaylarda rastlanılan önemli bakteriyel izolatların çoğunun üremesini arttırmaktadır) (Beşe, 1989).

Mikropleyitin ikinci çukurundan itibaren tüm çukurlara 100 µl besiyeri konuldu. Ardından aktivitesi belirlenecek olan ekstraktan 200 µl ilk çukura kondu ve ilk çukurdan 100 µl çekilerek, ikinci çukura aktarıldı. İkinci çukurdan başlayarak, her seferinde 3- 5 kez çekilip bırakmak suretiyle ekstrakt ve besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra yine 100 µl alınarak, üçüncü çukura aktarıldı. Böylece her çukurda bir öncekinin iki katı kadar seyreltmeler yapıldı. Sonuçta bir besiyeri kontrol çukuru olarak bırakıldı ve çukura ekstrakt konmadı.

Son olarak da; hazırlanan bakteri suspansiyonundan birinci çukurdan son çukura kadar 100' er µl eklendi ve 37 °C bir gece inkübe edildi.

Bu işlem, agar difüzyon testine göre; etkin olduğu gözlenen bakterilerden ne de ayrı ayrı uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Agar Difüzyon Yöntemi Sonuçları

Bu çalışmada *S. aureus*' un 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki standarda göre hazırlanmış suspansiyonundan petrilere 0.5 ml ekilmiş ve ekstraktın *S.aureus* üzerinde bir antibakteriyel etkisinin olduğu zon çapının 20 mm olarak ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kaynaklara göre 18 mm' lik bir zon çapı bakterinin duyarlı olduğunu söylemek için yeterlidir. Ekstraktımız *S. aureus* üzerinde oldukça etkilidir. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. 0.5 ml bakteri supansiyonu ekilmiş petrilere agar difüzyon yöntemine göre Ahlat *Viscum album*' dan elde edilen ekstraktın *S. aureus* üzerindeki etkilerinin incelenmesi

Salmonella enteritidis' in 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki standarda göre hazırlanmış bakteri suspansiyonundan petrilere 0.5 ml ekim yapıldı. Ekstraktın emdirildiği disk etrafında 16 mm çapında inhibisyon zonu oluştuğu gözlemlendi. Bu zon çapı 18 mm' den küçük olduğundan bakterinin maddemize tam duyarlı olmasa da oldukça duyarlı olduğu söylenebilir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 0.5 ml bakteri suspansiyonu ekilmiş Nutrient agarlı besiyerine sahip petrilere Agar Difüzyon Yöntemi' ne göre Ahlat *Viscum album*' dan elde edilen ekstraktın *Salmonella enteritidis* üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

P. auroginosa'nın 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki standart olarak hazırlanmış bakteri süspansiyonundan petrilere 0.5 ml ekim yapıldı. 13 ml'lik çapta hiçbir bakterinin gelişmediği gözlemlendi. Beşe (1989)'ye göre bakterilerin duyarlı olduğunun söylenebilmesi için 18 mm'lik bir zon çapı gözlenmesi gerekiyordu.

Bu da gösteriyorki *Viscum album* ekstraktı içindeki etken madde *P.auroginosa*'ya karşı antibiyotik olarak kullanılacak kadar etkili değildi, ancak 13 mm.lik bir çapta etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 0.5 ml bakteri süspansiyonu ekilmiş Nutrient Agar'lı besiyerine sahip petrilere Agar Difüzyon yöntemine göre Ahlat *Viscum album*'dan elde edilen ekstraktın *P. auroginosa* üzerindeki etkisinin incelenmesi.

B. subtilis' in 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki standarda göre hazırlanmış bakteri suspansiyonlarından petrilere 0.5 ml ekim yapıldı. Ekstrakt' ın Agar Difüzyon Yöntemi' ne göre *B. subtilis* etrafında 15 mm' lik bir zon tespit edildi, ancak belli bir süre sonra bakterilerin bu zonda da gelişmeye başladığı gözlemlendi. Buradan ekstraktın uzun süre etkili olmadığı, ilk etapta etkili gibi görüldüğü sonucuna varıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 0.5 ml bakteri suspansiyonu ekilmiş N. A' lı petrilere Agar Difüzyon Yöntemi' ne göre Ahlat *Viscum album*' dan elde edilen ekstraktın *B. subtilis* üzerindeki etkisinin incelenmesi.

E. coli' nin 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki standarda göre hazırlanmış bakteri suspansiyonlarından petrilere 0.5 ml ekim yapıldı. *A. Viscum album*' dan elde edilen ekstraktın Agar Difüzyon Yöntemi' ne göre *E. coli* etrafında hiçbir zon oluşturmadığı yani antibakteriyel etkinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 0.5 ml bakteri suspansiyonu ekilmiş N. A' lı petrilere Agar Difüzyon Yöntemi' ne göre Ahlat *Viscum album*' dan elde edilen ekstraktın *E. coli* üzerindeki etkisinin incelenmesi.

4.2. Seri Dilüsyon Yöntemi Sonuçları

(1) Üreme görülmeyen çukurlardan katı besiyerine alınan pasajlardan sonra E. Ava' nın 0.5×10^8 CFU/ ml' lik bakteri suspansiyonunda *S. aureus* üzerindeki MIC değeri 1/ 8, MBC değeri ise 1/16 olarak saptandı(Tablo 4.1).

(2) Üreme görülmeyen çukurlardan katı besiyerine alınan pasajlardan sonra E. Ava' nın 0.5×10^8 CFU/ ml' lik bakteri suspansiyonunda *S. enteritidis* üzerindeki MIC değeri 1/ 4, MBC değeri ise 1/8 olarak saptandı(Tablo 4.1).

(3) Üreme görülmeyen çukurlardan katı besiyerine pasajlar alındığında E. Ava' nın 0.5×10^8 CFU/ ml ' lik bakteri suspansiyonunda *P. auroginosa* üzerindeki MIC değeri 1/ 4, MBC değeri ise 1/ 8 olarak saptandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 : Seri Dilüsyon Yöntemi' ne göre E. *Viscum album*' un *S. aureus*,
S. enteritidis ve *P.auroginosa* üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması
Ahlat *Viscum album* ekstraktı; E. Ava

E. Ava Yoğunluğu	1 / 1	1 / 2	1 / 4	1 / 8	1 / 16	1 / 32	Kontrol
(1) <i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+
(2) <i>S. enteritidis</i>	-	-	-	+	+	+	+
(3) <i>P. Auroginosa</i>	-	-	-	+	+	+	+

(1)MBC : 1 / 1 6 MIC : 1 / 8

(2) MBC : 1 / 8 MIC : 1 / 4

(3) MBC : 1 / 8 MIC : 1 / 4

Escherichia Coli' nin 1/1' lik konsantrasyonunda Agar Difüzyon Yönteminde dahi sonuç (-) negatif olduğundan seri dilüsyona tabi tutulmamıştır. E.A *Viscum album'* un *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkisi olmadığı Agar Difüzyon Yönteminde belirlendi.

Aynı şekilde *B. subtilis'* in 1/1'lik konsantrasyonlarında uygulana Agar Difüzyon Yönteminde de sonuç (-) negatif olduğundan seri dilüsyona tabi tutulmamıştır. E.A. *Viscum album'* un *B. subtilis* üzerinde antibakteriyel etkisi olmadığı Agar Difüzyon Yönteminde saptandı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürler incelendiğinde, *Viscum album*' un genelde (MLI) lektinleri, visco toxinleri ile ilgili çalışmalar gözlenmiştir. Daha çok kansere karşı inhibitör olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Kuttan ve arkadaşlarının 1990'da yaptığı bir çalışmada *Viscum album* yapraklarının alkolde fermentasyonu ile Iscador adlı bir madde elde edilmiş ve bununla in-vivo olarak damardan enjeksiyonlar uygulanmış ve oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. Hayvanlarda suni yolla sarkoma oluşturulmuş bir kısmına, iscador enjekte edilmiş ve kontrol grubundaki hayvanların hepsinde 100. günde kanser gelişirken iscador enjekte edilen hayvanlarda 120 gün sonunda hiçbir sarkoma tümörüne rastlanmamıştır.

Med- line, kimyasal abstrakt ve biyolojik abstrak gibi bazı veri tabanları taranarak *Viscum album*' un antibakteriyel özelliği ile ilgili bir çalışma olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada A.*Viscum album*'dan elde edilen ekstraktın bazı gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerindeki direkt etkileri in vitro ortamda araştırıldı.

Bu işlemin in vitro yapılmasının sebebi;

- a) Bu ekstraktın seçilen bakteri türleri üzerine etkisinin olup olmadığını laboratuvarında gözlemlemek.
- b) Ekstraktın hangi oranlarda etkili olduğunu tesbit edebilmektir.

Agar Difüzyon Yöntemi ve Seri Dilüsyon Yöntemi' nin paralel sonuçlar verdiği kaynaklarda belirtilmektedir (Pelczar, 1989).

Tablo 5.1:Seri Dilüsyon Yöntemine göre E. *Viscum album*'un üç bakteri üzerindeki MBC ve MIC değerlerinin karşılaştırılması

E. Ava	MBC Değeri	MIC Değeri
<i>S. aureus</i>	1/ 16	1/ 8
<i>P. auroginosa</i>	1/ 8	1/ 4
<i>S. enteritidis</i>	1/ 8	1/ 4

Sonuçta;

E. Ava 'nın kullanılan beş bakteri türünden üçüne karşı etkili olduğuna Tablo 5.1 belirtilen MBC ve MIC sonuçlarına dayanılarak karar verildi.

E. Ava' nın *E. coli* ve *B. subtilis* üzerinde ise 1/ 1 oranında disk difüzyon yönteminde dahi sonuç negatif (-) olduğundan seri dilüsyona tabi tutulmadı .Pelczar (1989)' a göre disk difüzyon yöntemi ile seri dilüsyon yöntemi sonuçları paraleldir.

Maddenin antibakteriyel özelliği bakteri türlerine göre değişmektedir. Buradan yola çıkılarak bundan sonraki çalışmalarda;

1) Madde diğer bakteri türleri üzerinde de denenebilir.

2) Maddemizin etkin olduğu saptanmıştır. Özellikle de *S. aureus*'ta 20 mm zon çapı gözlenmesi, bu maddenin oldukça etkili olduğunu ispatlamaktadır.

Beşe (1989)'a göre disk etrafında 18 mm' lik zon çapı gözlenmesi test edilen bakterinin araştırılan bileşiğe karşı duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır ve etken maddenin bulunması yönünde çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

Ayrıca ekstrakt kolondan geçirilerek 1 ml' lik bölümlere ayrılıp TLC (thin layer chromatography) leri gözlenip, NMR (nukleer manyetik rezonans)' ları çekilip kimyasal bir analize tabi tutulup, in-vitro çalışmalar da yapılabilir. Bu yolla yeni bir antibiyotik madde elde edilip edilemeyeceği araştırılabilir.

3) Ayrıca *Viscum album*' un konak olarak kullandığı Ahlat ağacının yapraklarından da benzeri bir çalışma yapılabilir. *Viscum album* parazit olduğundan ahlattan aldığı mineral maddelerin de sonuçları etkilemesi mümkündür.

KAYNAKLAR

1. AKAN, Ö. Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar El Kitabı, Hacettepe- Taş Kitapçılık Ltd. Şti., Ankara , 1991.
2. AKÇİN, A., Genel Tarla Ziraatı. Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Konya, 1987.
3. BAYTOP, A., Formasotik Botanik, Iv.Ecz.Fak.İst ,176-278, 1983.
4. BAYTOP, T., Genel Farmakognozi, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul 8-12, 1980.
5. BAYTOP, T., Türkiye’de Bitkilerle Tedavi,Fatih Yayınevi, İst. 203-204, 1984.a
6. BAYTOP,T., Izgın Ve Burç Hakkında- Farmakolog 18:19, 1984.b
7. BECKER, H., SCHWARZ,G., Planta Med,2084),357-62(G Er), 1971.
- 8.BECKER. H. , BOTANY OF EUROPEAN MISTLETOE (Viscum album) . , Oncology , 43(1). 2-7(1986)
8. BİLGEHAN, Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, Özel Bakteriyoloji Ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi 9. Baskı, Bornova- İzmir, 1995.
9. BİLGEHAN, H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi 2. Baskı, Bornova İzmir, 1995.
- 10.BUSHUEVA, T.L., Tanevitski, A.G., Maisuryan, N.A., Mol.Biol.22(2),493-7 (Russ), 1988.
- 11.CHAN, E.C.S and Pelczar, M. S., Microbiology, Mc Graw- Hill Book Co-Singapore. 261-285, 1986.
- 12.ÇELEBİOĞLU, S. , BAYTOP,T. : Ortaçağ eczacılık tarihine kısa bir bakış ve ilk bitkisel droglar, İst.(1947)

- 13.DORTUNÇ, T. , Bazı uçucu yağların antibakteriyel ve Antifengal Etkileri Üzerinde Araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi). Marmara Üniversitesi , Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Mikrobiyoloji A.B.D. İstanbul 1990.
- 14.DUKE,J.A.,Handbook Of Medicinal Herbs,CRC Press New York, 512-513,1985.
- 15.ENDO, Y., TSURUGİ, K., FRANZ, HARTMUT., Febs Lett 231(2), 378-80 (Eng),1988.
- 16.FRIEDLANDER, G. : Plantes medicinales du Proche Orient dans l'ancien temps et de nos jours – Fol. Pharm 2,87(1952).
- 17.JAWETZ, E. , MERNICK , L.J. , ADELBURG , E.A. , BROOKS , G.F. , BUTEL, J.S. , ONNSTON, L.N. , Medical Microbiology Middle East Edition Lebanon , 1989.
- 18.KARAMAN, İ. *Juniperus Oxycedrus'un* Kuru Gövdesinden Elde Edilen Ekstrat'ınAntibakteriyel Özelliğinin Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze 1997.
- 19.KARAMANOĞLU , K.(Kamil) , 1977 Femosötik Botanik. Kingsbury 1.m. Poisonous Plants of the United States and Kanada 1974.
- 20.KARAMANOĞLU,K., Formasotik Botanik Ankara Üniversitesi.Ecz.Fak.Ankara ,319-322 , 1985.
- 21.KHWAGA , T.A. , Cecilia , B.D. and Pentecost , S. 1986.Recent Studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. Oncology 43, 22-50
- 22.KUTTAN (Kuttan et al. 1990), G. , Vasudevan, D.M. and Kuttan , R. ,1990. Effect of a preparation of *Viscum album* on tumour development in – vitro and in mice.. J. , 29. 35-41. J. Ethnopharmacol. , 29. 35-41.
- 23.MILLER, A.G. (1982). *Viscum album* L in “Flora of Turkey and the East Aegean Island” (Davis P.H. Ed) Vol. 7. University press , Edinburgh (1982)
- 24.NAGL. W. & STEIN, B. (1989) DNA Characterization in Host-specific *Viscum album* subspecies (*Viscoaceae*). Plant Syst. Eval. 166(3-4) , 243-8 1985.
- 25.NEINHANS , J. and Leroi , L. 1970 Tumour inhibition and thymus stimulation with mistletoe operation. Elemente Naturwissenschaft, 13. 45-54.
- 26.OKAR , i. , S. *Aveus'un* yeni aminoglikozitlerden Amiklacin'e Karşı Duyarlılığın Değişmesinde Adrenalinin Etkisi. (Uzmanlık Tezi) Marmara Univ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji A.B.D. İstanbul 1989.

27. POUCKOVA, P., POSPÍŠIL, J., BERGER, T., Cas. Lek. Cesk. 125(20), 62 (Czech), 1986.
28. ROBERT, F.B., BRAYN, G.H., Basic Medical Microbiology. Fourty Edition, U.S.A. 1986.
29. SALZER, G and HAVELEC, L. 1978. Prophylactic treatment against recurrences in cases of operated carcinoma of the bronchial tree with the mistletoe operation. Oncology 1. 264-266.
30. SAMUELSSON, G. AND PETERSON, B., Eur. J. Biochem, 86-90, 21(1), (Eng), 1971.
31. SAMUELSSON, G AND PETERSON, B., Acta Chem, 25(6), (Eng), 1971.
32. STOYONOV, N.F., Tıbbi Bitkilerimizi Değerlendirelim, (Çeviri, Basri Makaklı) Akgün Yayınevi, Yalova, 1982.
33. TANKER, M. AND TANKER, N., Formakognozi Cilt 1. Ankara Üniversitesi Ecz. Fak. Ankara, 319-322, 1985.
34. TEMİZ, A. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi. 2. Baskı, Ankara, 1996.
35. UNAT, E.K., Tıp Bakteriyolojisi Ve Virolojisi. Dergah Tıp Yayınları, 1982.
36. WAGNER, H., BLADT, S., ZGAŃSKI, E.M., Plant Drug Analysis (Verlag), 1984
37. WAGNER, H., FEIL, B., SELIGNMANN, O., PETRİCİC, J., KALOGJERA, Z., Planta Med. (2), 102-4 (Eng). 1986.
38. ZEYBEK, N. ve ZEYBEK, U. Farmasotik Botanik Ege Uni. Basım Evi Bornova-İzmir, 1994.

ÖZGEÇMİŞ

24 Ocak 1971’de Sakarya, Akyazı’da doğdu. 1988’de Antakya Merkez Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi İngilizce Biyoloji öğretmenliğine girdi. 1993 Haziran döneminde mezun oldu. 1994’de Söke Hilmi Fırat Anadolu Lisesine Biyoloji öğretmeni olarak atandı. 1996’da Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Aynı yıl öğrenim durumundan dolayı STFA Anadolu Teknik Lisesine Biyoloji öğretmeni olarak atandı. Halen STFA Anadolu Teknik Lisesinde görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.