T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Galium incanum BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH

Danışman	**Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Songül GÜREL**
Jüri Üyesi	**Dr. Öğr.Üyesi Enis Fuat TÜFEKCİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH tarafından hazırlanan **"*Galium İncanum* Bitki Ekstraktlarının Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **Genetik ve Biyomühendislik** Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Songül GÜREL Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ Kastamonu Üniversitesi	.....

05/08/2019

Enstitü Müdürü	Doç. Dr. Nur BELKAYALI	.....

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.



Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Galium incanum BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH

Kastamonu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Ana bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Birçok antibiyotiğe karşı gelişen yüksek bakteri direnci nedeniyle, doğal bitki ve bitkisel ürünlerden yeni antimikrobiyal ilaç çalışmaları yapılmaktadır. Bunların sentetik ilaçlara göre daha güvenilir olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal ilaçlara yönelik zorluk, test ve geliştirme olanaklarının eksikliğidir. Çalışmamızın amacı, *Galium incanum* bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliklerini farklı bakteri suşlarına karşı test etmek ve DNA koruma özelliklerini kontrol etmektir. Bu bitkinin belirgin antimikrobiyal özelliği ve mükemmel DNA koruma etkisi tespit edilmiştir. Etil asetat ve metanol ekstraktları, gram pozitif ve gram negatif bakteri suşlarını etkilemiştir. Ancak bu bitkinin su ekstraktı diğerleri kadar etkili olmamıştır. Etil asetat ekstraktı, *E. coli, Serratia marrecens, Staphylococcus epidermis, Alpha haemolyticus streptococcus, Pseudomonas aeruginosa* ve *Listeria monocytogenes* ATCC 1304 bakteri suşları için 500 µg/ml ile en iyi MBC değerini göstermiştir. DNA koruma sonuçları, 10 mg/ml su ekstraktının en fazla etkiyi gösterdiğini (%74) ve %66 DNA koruma kabiliyeti ile ardından metanol ekstraktının geldiğini göstermiştir. Bu çalışma, *Galium incanum*' dan üç farklı bitki ekstraktının biyolojik potansiyeli hakkında bilgiler sunmaktadır. Araştırmanın sonucu, gelecekteki bilim adamlarının, bitki ekstraktlarından elde edilen antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesi üzerine çalışmaları için birçok kapı açmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Rubiaceae*, Bitki ekstraktları, DNA koruma, Antimiktobiyel etkinlik

2019, 32 Sayfa

Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
Galium incanum PLANT EXTRACTS

Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH
Kastamonu University
Graduate School Of Natural And Applied Sciences
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Abstract: Due to the high bacterial resistance to many antibiotics, new antimicrobial drug studies are being conducted from natural plants and herbal products. They are thought to be more reliable than synthetic drugs. Moreover, the challenge to antimicrobial drugs is the lack of testing and development opportunities. The aim of our study was to investigate the antimicrobial activities of the *Galium incanum* plant extracts against different bacteria strains and to check their DNA protection property. This plant had some remarkable antimicrobial effect and displayed great DNA protection effect. Ethyl acetate and methanol extracts affected the different strains of gram positive and gram negative bacteria but it was less for water extract for this plant. The ethyl acetate extract showed the best MBC value which was 500 µg/ml for *E. coli, Serratia marrecens, Staphylococcus epidermis, Alpha haemolyticus streptococcus, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes* ATCC 1304. DNA protections results showed that 10 mg / ml water extract had the most protection activity (74%), followed by methanol extract with 66% DNA protection. This study provides additional insights into the biological potential of three different plant extracts from the *Galium incanum*. The outcome of the research has opened many doors for the future scientists to work on the development of antimicrobial drugs from the plant extracts.

Key Words: *Rubiaceae*, Plant extracts, DNA protection, Antimicrobial activity

2019, 32 Pages
Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye ve Doç. Dr. Songül GÜREL'e tez boyunca yaptıkları rehberlik, verdikleri cesaret, tavsiye ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Genetik ve Biyomühendislik Bölümündeki değerli Öğretim Elemanlarına ve meslektaşım Mustafa ÖCAL'a tez çalışması süresince verdikleri destekler için teşekkürlerimi sunuyorum.

Anne ve babam başta olmak üzere, ailemim tüm bireylerine destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

Bana bu fırsatı sağlayan Ülkem Libya'ya ve Kastamonu Üniversitesi'ne şükranlarımı sunuyorum.

Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH
Kastamonu, Ağustos, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ii
TAAHHÜTNAME iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
TABLOLAR DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
1.1. Bitki Ekstraktlarından Elde Edilen Geleneksel Ilaçların Tarihçesi 1
1.2. *Rubiaceae* Bitki Familyası 1
1.3. Tıbbi Bitki Kaynakları 3
1.3.1. *Galium incanum* 3
1.4. *Galium incanum* Bitki Ekstraktlarının Önemi Ve Tıbbi Aktiviteleri Ve Kullanım Alanları 5
1.5. Çalışmanın Amacı 9
2. LİTERATÜR TARAMASI 10
3.MATERYAL VE YÖNTEM 12
3.1. Bitki Ekstraktı 12
3.2. Mikroorganizmalar 12
3.3. MİK Deney Prosedürü 12
3.3.1. Besin Agarı Ortamı Hazırlanması 13
3.4. Bitki Ekstraktlarının Dilüsyonu 16
3.5. MBC ve MİK Ölçümü 17
3.6. DNA Koruma 18
3.6.1. Plazmid İzolasyonu 18
3.6.2. DNA ve Fenton Reaktif Hazırlama 19
4. SONUÇLAR 21
4.1. Bitki ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerine etkisi 21
4.1.1. *Galium incanum* su ekstraktı 21
4.1.2. *Galium incanum'*un Metanol Ekstraktı 22
4.1.3. *Galium incanum*'un Etil Asetat Ekstraktı 23
4.2. Bitki Ekstraktlarının DNA Koruma Etkisi 25
5. TARTIŞMA 26
6. SONUÇ 28
KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. *Galium incanum* bitkisi 3
Şekil 3.1. Besin agarı 13
Şekil 3.2. Hassas Terazi 14
Şekil 3.3 Ortamın çözünmesi 14
Şekil 3.4. Otoklav 14
Şekil 3.5. İnkübatör 15
Şekil 3.6. 0.5 McFarland bakteri ölçümü 16
Şekil 3.7. Bitki ekstraktları 17
Şekil 3.8. Mikrotitre plakası 17
Şekil 3.9. MBC Ölçümü 18
Şekil 3.10. Elektroforez ekipmanı 20
Şekil 4.1. *Galium incanum*'un su ekstraktının farklı bakteri suşları üzerine etkisi 22
Şekil 4.2. *Galium incanum*'un Metanol ekstraktının farklı bakteri suşları üzerine etkisi 23
Şekil 4.3. *Galium incanum* etil asetatının farklı bakteri suşları üzerine etkisi 24
Şekil 4.4. DNA koruma (%) 25

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. *Rubiaceae'nin Bilimsel Sınıflandırılması*……...……....	2
Tablo 3.1. Bakteri suşları…….……	15
Tablo 3.2. Beş tüpün içeriği…….....	19
Tablo 4.1. *Galium incanum* su ekstraktı……..……...…..	21
Tablo 4.2. *Galium incanum*'un Metanol Ekstraktı……..…...	23
Tablo 4.3. *Galium incanum*'un etil asetat ekstraktları……..……..	24

1. GİRİŞ

1.1. Bitki Ekstraktlarından Elde Edilen Geleneksel İlaçların Tarihçesi

İnsanlar tıbbi gerekçelerle şifalı otların kullanımına yönelmişlerdir. İlaçlara olan erişimin sınırlı oluşu ve modern ilaçların tıbbi ve farmasötik işlemlerinin yüksek maliyetleri nedeniyle, bitkisel ilaçların ve şifalı bitkilerin kullanıma yönelik geleneksel inançlar geçerliliklerini korumaktadır (WHO, 2004).

Davis (2003) bakteriyel patojenlerin, enfeksiyon hastalıkların tedavisinde gelişigüzel kullanılmamasından dolayı mevcut antibiyotiklere dirençli olduklarını bildirmiştir. Bu nedenden dolayı, bitkiler gibi diğer kaynaklardan yeni ve etkili antimikrobiyaller keşfetme sorunu karşımıza çıkmaktadır.

1.2. *Rubiaceae* Bitki Familyası

Rubiaceae, çiçekli bir bitki familyasıdır. Karasal ağaçlar, çalılar, lianaslar veya interpetiolar stipüllere sahip basit, zıt yapraklar ile tanınan bitkilerden oluşur. Aile 611 cinsinde yaklaşık 13.500 tür içerir ve bu da onu dördüncü en büyük angiyosperm ailesi yapar. (De Block ve Robbrecht, 1997). Bu familya küresel dağılıma sahiptir, ancak en büyük tür yelpazesi subtropikal bölgede yoğunlaşmıştır. Ekonomik açıdan en önemli türler arasında kahve, Cinchona, Alkaloid, Alkinoids, dekoratif türler (örneğin, Gardenia, Pentas vb.) bulunmaktadır. Rubiaceae farklı çevre koşullarına adapte olmuştur. Bu nedenle, bu bitkiler tüm dünyada mevcuttur. Ancak çöl ve kuzey kutbu hariç tutulabilir. Igli bölgesinde, otsu bitkiler çoğunlukla Rubiaceae tarafından temsil edilir ve birçok tropik alanda, özellikle de ağaçsı bitkiler olarak bulunur. Bu bitkinin sınıflandırması Tablo 1.1'de gösterilmektedir.

Tablo 1.1. *Rubiaceae'nin Bilimsel Sınıflandırılması*

Alem	**Bitki Dünyası**
Tür	Angiosperms
Tür	Eudicots
Tür	Asterids
Takım	Gentianales
Familya	Rubiaceaelus

Familyanın ismi, "kırmızı" anlamına gelen kediotu anlamında Latince rubia kelimesinden gelir. İsim Pliny tarafından verilmiştir. Rubiaceae, dünyanın hemen her yerinde (Antarktika kıtası, Kuzey Kutbu dağ zinciri, Orta Afrika kısmı ve Asya kısmı hariç) bulunsa da, nemli tropik bölgelerde çok çeşitlidir. Familya farklılaşması örneği, bitki çeşitliliğinin küresel yayılımına çok benzerdir. Familyaya ait birçok tür Kolombiya, Venezuela ve Yeni Gine'de bulunmaktadır. Kolombiya ve Küba, en çok Venezüella bölgesi düzenlemelerinden ayrılmaktadır. Madagaskar'da çok sayıda tür keşfedilmiştir, çoğunlukla çamur altında bulunmakla birlikte çevresel bozulma nedeniyle tehlikededir. Rubiaceae'nın fosil tarihi en azından Eosen'e kadar uzanmaktadır. Bu fosillerin coğrafi bölünmesi, bir sonraki kristalin veya Paleosen'in kaynağı olabilir. Aslında, familya üç alt aile ile birleşmiştir. Her ne kadar tebeşir ve Paleosen fosilleri çeşitli yazarların evine yollanmış olsa da, bu fosiller Rubiaceae cinsinin bir parçası değildir. Emmenopterys'in en verimli fosili, Washington eyaletinde, 48 ila 49 milyon yıllıktır. 44 milyon yıl önce Emmenopters, Oregon'da meyve ve verimli türlerin fosil istilası keşfedilmiştir.

Rubiaceae kolayca tanınabilir; tüp şeklindeki simetrik korol ve küçük oval basit ve eksiksiz yaprakları vardır. Bazı özel durumlarda, bazı bitkilerin birbirlerinden farklı olarak her çekirdekte yalnızca bir yaprağı vardır. Bu durumlarda, her bir düğümde tek bir şekle basılı alternatif bir düzeni oluşturulur. Rubiaceae familyası farklı büyüme tiplerine sahiptir. Toprak en yaygın olmasına rağmen, aile üyeleri ağaçlar, zambaklar ve otlar olabilir.

Çiçekler 4-5 cm, genellikle 4-5 yaprak, 4 veya 5 petal yaprağı ile biseksüeldir. Ayrıca, ailenin temel özellikleri ağaç veya otları; alternatif veya çelişkili; interpetiolar veya intrapetiolar, çiçekli kozoz; 4- veya 5-mer çiçek, hermafrodit, epitel, korol, gamopeto, bir veya daha fazla oosit; meyve kapsülü veya yosun

içermektedir. (Razafimandimbiso, S., ve B. Bremer 2002). Dallanmış ve silindirik odunsu veya otsu bir kök ile birlikte çok dallı bir kök sistemine sahiptirler. Rubiaceae çeşitli çevresel koşullara (toprak tipi, yükseklik, sosyal yapı vb.) dayanabilir ve familyanın çoğu zaman araştırmalarında kullanılmış olmasına rağmen, belirli bir yaşam ortamına dikkat edilmemiştir.

1.3. Tıbbi Bitki Kaynakları

1.3.1. *Galium incanum*

Rubiaceae familyasına ait yıllık otsu bir bitkidir. Yaklaşık 650 bitki türünü içerir ve bunu en büyük çiçekli bitki cinslerinden biri yapar. Galium, kuzey ve güney yarım kürelerin orta bölgelerinde, Rubiaceae familyasında ortaya çıkan yıllık ve çok yıllık çimlerden oluşan geniş bir ailedir. Bazı türlere boş yatak denir. 2013'ten bu yana 600'den fazla *Galium incanum* türü tespit edilmiştir. Bazen bazı odunsu türler *Galium incanum* gibi bulunmaktadır (Ehrendorfer vd. 2005). Toprakta ve / veya diğer bitkilerde yetişen sürünen gövdeleri vardır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Galium incanum* bitkisi

Gövdenin küçük tüyleriyle ve yaprakların uçlarıyla birleşirler. Bu plakalar açılı veya kare olarak 90-100 cm boyunda veya daha fazla olabilir. Yapraklar basittir ve altı ila sekiz cm düzlüktedir. *Galium incanum*, Japonya'dan Avrupa'ya, Kuzey Afrika'ya ve Asya'ya, İngiltere ve Kanarya Adaları'na geniş bir şekilde dağılım göstermektedir. Bu bitki ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Meksika, Orta Amerika, Güney Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda, bazı adalar ve Afrika'nın geniş

bölgelerinde yoğun olarak bulunur. Kuzey Amerika tartışmalı olsa da literatürde bahsedilmektedir.

Popülasyonun bulunduğu birçok bölge zararlı olarak kabul edilir. Bu bitki kullanılarak yapılan domuz ekmeği yenilebilirdir. Meyveler ortaya çıkmadan önce hasat edilirse, yapraklar ve meyveler yapraklı sebzeler halinde pişirilebilir. Ancak, bitkinin küçük kulpları daha az lezzetlidir. Kahve ile aynı familyadandır. Yaprakların meyveleri genellikle kurutulur ve pişirilir, daha sonra daha az kafeinli bir kahve yerine kullanılır. Bitkiler çitler ve atıklarla, kireçtaşı ortamında, çimlerle ve baklagillerle büyüyebilir. Nemli ve düşük drenajlı aalanları tercih eder. Daha yüksek seviyelerde orta derecede azot ve fosfor içeren daha ağır topraklarda ve pH 5,5 ile 8,0 arasında olan bölgelerde hüküm sürer. Posaso ısırıkları ve toksinleri azaltmak için kullanılır. Bu gibi durumlarda tüm bitki doğrudan etkilenen bölgeye uygulanır. Ayrıca lenfatik sistem için de kullanılır, çünkü lenf bezlerinin toksinleri uzaklaştırmasına yardımcı olur.

İlkbahardan yaza kadar, yıldız şeklinde küçük beyaz-yeşil çiçekleri vardır. Çiçekler, yaprak ekseninden alınan iki gruba veya üç gruba ayrılır. Corolla'nın dört yaprağı vardır. Amarant bir veya üç tohumdan oluşan bir yapıdadır, doku tohumları tohumun dokusuna katkıda bulunan tüylerle kaplıdır.

Birçok çiçek, özellikle terminal ve aksiller (bazen sadece aksiller), panoculi formları veya alt formlar, özellikle yüksek yüzey eksenlerinde (veya bazen yapraklar), düşürülen kemikleri, çiçek yaprakları veya pedleri olan pedicelleri olmayan briketleri azaltır. Bazen cinsel olmayan genellikle biseksüel olanlar ve özel çiçekler, hermafrodit ve andromonocne, bazen veya heteroaril dioik, pedicellate sedilne genellikle çok küçüktür.

Kaygan fincan neredeyse hiç yoktur ve histerektominin bir kısmı yumurtalıklara bağlıdır. Corolla beyaz, sarı, sarı-yeşil, yeşil, kırmızı, pembe, kırmızı, macenta veya mor veya rastgele geniş halka tasarımlı renklerde, maruz kalan tüpler iç yaprakları serbest olacak şekilde azaltılabilir; gövde (3 veya 4) (veya bazen 5), tomurcuklar daha azdır. Stamenler (3 veya 4) (veya bazen 5) korolla boru tabanına maruz bırakılır ve lif gelişimini azaltır ve anterler düzenlenir.

1.4. *Galium incanum* Bitki Ekstraktlarının Önemi ve Tıbbi Aktiviteleri ve Kullanım Alanları

Binlerce yıldır, şifalı bitkiler dünyanın pek çok yerinde hastalıkların geleneksel tedavisi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde önemli bir ilaç kaynağı olarak kullanılmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, insanların yaklaşık %80'i tedavi amaçlı geleneksel ilaçlara başvurmaktadır (Korir vd. 2012).

Bitkilerden elde edilen birçok doğal ürün, yeni bir ilacın kimyasal bileşiminin geliştirilmesinde temel olan zengin bir biyoaktif bileşik kaynağıdır. Mikrobiyal etkilere gelince, antibiyotikler ve antiviral maddeler gibi terapötik maddelere birçok yaygın patojene karşı artan direnç, yeni anti-enfektif bileşiklerin tespit edilmesine yeni bir ilgi yaratmıştır. Dünyada fitokimyasal çalışmaların sadece yaklaşık %1'i mevcuttur, çünkü yaklaşık 500.000 bitki türü vardır ve yeni biyoaktif bileşiklerin tespit potansiyeli büyüktür.

Ağız hastalıklarının tedavisi için geleneksel bitkilerin ve doğal ürünlerin özellikle *Galium incanum* bitki ekstraktlarının kullanımı hakkında birçok bilgi vardır. Geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin çoğu tıpta enfeksiyonların tedavisi için bir bileşen olarak kaydedilmiştir ve bazılarının son zamanlarda oral patojenlere karşı etkinliği araştırılmıştır.

Tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünler gibi esansiyel yağların genel antibakteriyel aktivitesi daha önce incelenmiştir. Sürekli hastalığa, sıklığa, antibiyotiğe ve kemoterapiye dirençli hastalıklara (özellikle gelişmekte olan ülkelerde) yol açan bakterilerdeki mevcut artışın, hastalığın zararlarını artmasını önlemek amacıyla kullanılması, güvenli, etkili ve ekonomik küresel talep için de bireysel fırsatçı enfeksiyonların ve gelişmekte olan ülkelerde finansal etkileri ağız hastalıklarında mevcut alternatif tedavilere ve ürünlere ihtiyaç duyulmasını sağlamıştır (Trease ve Evans, 2002).

Piyasada satılan birkaç ilaç olmasına rağmen, *Galium incanum* kimyasal bitki ekstraktları, mikroorganizmaları değiştirebilir ve lekelenme, kusma ve ishal gibi zararlı yan etkilere neden olmayabilir.

Bu bitkinin fitokimyasal araştırması, steroidal alkaloitler, şeker alkaloitleri, antioksidanlar (flavonoidler ve klorojenik asitler), saponinler ve hatta kanserojenleri içerdiğini göstermektedir. Bitki ekstaktı, anti-analjezik, antipiretik, antispazmodik, anoksik, anoreksi, hipoglisemik, antibakteriyel, anti-schistosomal, antifungal ve antikanser aktivitesine sahiptir. Bu nedenle, şifalı bitkiler dünyadaki insanları etkileyen birçok hastalığa karşı yeni, uygun fiyatlı ve etkili terapötik maddelerin ana kaynağı olabilir (Chukwujekwu vd. 2013).

Bu araştırma *Galium incanum*' un farmakolojik etkilerini araştırmak ve araştırmacılara bitki ile ilgili gerekenleri ve gelecekteki araştırmaları anlamalarına yardımcı olabilecek önemli bilgiler sunmayı amaçlamaktadır. *Galium incanum* bitki ekstraktları, hormonlar, herbisitler veya salisilik asit gibi evrimsel avantajlara yol açan kimyasal bileşikler üretir. Bitkilerin korunmasında, bu fitokimyasal ajanlar ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahiptir ve bu bitkilerin şifalı bitkilerde ve tanınmış farmakolojik aktivitelerin içeriği, bilimsel olarak onaylandıklarında modern tıbbın kullanımında bilimsel olarak gerekçelendirilmektedir. Örneğin narcissus alkaloid, Alzheimer hastalığına karşı kullanım için galantamin ruhsatı dahil 9 gruba sahiptir. Alkaloitler lezzetli ve toksiktir ve bir bitki gibi bitkinin kısımlarında bitkiler tarafından tüketilebilen bir kök olarak konsantre edilir; Parazitler. Modern bilgi işlem tesisleri, 2011 yılı için neredeyse otuz türün transkripsiyonuna çok sayıda referans sunan transkriptomik şifreler very tabanında sistematize edilmiştir.

Son yıllarda, bitkilerden elde edilen ilaç ve besin takviyelerinin kullanımı ve araştırmaları hızlanmıştır. *Galium incanum*, böcek ilacı tedavisinde geliştirilebilecek fitokimyasalların yerini alıp ve "liderlerini" değiştirebilecek doğal ürünlerden botanikçi, mikrobiyolog ve doğal ürünlerden oluşan kimyagerler tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut ilaçlar bitkilerin %25 ila %50'sini içermesine rağmen, bunların hiçbiri antimikrobiyal ajan olarak kullanılmamaktadır.

Ancak, *Galium incanum*' un antimikrobiyal özellikleri nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir. Geleneksel terapistler bitkileri, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek için uzun süredir kullanmışlar ve batı tıbbı bu başarılarını tekrarlamaya çalışmaktadır (Yağız vd. 2017).

Bitkiler, sekonder metabolitlerle, tapinler, terpenoitler, alkaloitler ve flavonoidler gibi *in vitro* antimikrobiyal özellikler bakımından zengindir. Fitokimyasalların yapısı ve antimikrobiyal özellikleri, *Galium incanum*'un önemini artıran birçok araştırmacı tarafından da dikkate alınmıştır. Birçok mevcut, yönetilmeyen botanik preparatların ve genel halkın mevcudiyetindeki hızlı artış nedeniyle, klinik uzmanlar bu ilaçları kullanarak tedavi olan hastaların sonuçlarını dikkate almalıdır. *Galium incanum,* foliküler kuru boğaz, boğaz ağrısı, karın ağrısı, otitis ortam, yılan ısırıkları, ülserler, karaciğer hastalığı, cilt hastalıkları (konvülsiyonlar), kramplar, iltihaplanma, ülser, karaciğer hastalığı, cilt hastalıkları (konvülsiyonlar), kramplar, iltihaplanma, ağrı ve Afrika'daki sıtma gibi çeşitli hastalıklar için çok önemlidir.

Bitkilerin iyileştirici gücünü bulmak eski bir fikirdir. Tüm kıtalarda yaşayan insanların, yerel bitkilerin tarih öncesinden beri binlerce enjeksiyona başvurduğu bilinmektedir. 60.000 yıl önce yaşayan Neandertallerin şu anda Irak olarak bilinen bölgede *Galium incanum* gibi bitkileri kullandıklarını ve etno tıbbı dünyasında hala yaygın olarak kullanıldığını kanıtlanmıştır. Tarihsel olarak, tedavinin sonuçları karışıktır, sıklıkla semptomları iyileştirdiği düşünülmektedir. Zehirlenme de yüksek seviyelerde meydana gelmitir. Şu anda, dünyanın en büyük kök eczanelerinin yaklaşık dörtte biri, bakteri ve mantar kaynaklarına dayanan antibakteriyel maddeler olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. 1950'lerde antibiyotiklerin kullanılmasından bu yana, neredeyse hiçbir antibiyotik için bitki türevi kullanılmamıştır.

Dahası, *Galium incanum* ekstraktlarının analjezik, antipiretik, antispazmodik, anoksik, anoreksi, hipoglisemik, antibakteriyel, antihistozomal, antifungal, anti-tümör aktivitesi olduğu da incelenmiştir. Bu nedenle, bitkiler dünyadaki insanları etkileyen birçok hastalığa karşı yeni, uygun maliyetli ve etkili tedavilerin ana kaynağı olabilir.

Galium incanum bitkilerini korumak, hormonlar, herbisitler veya salisilik asit gibi evrimsel avantajları olan bileşikleri ortaya çıkaracaktır. Bu fitokimyasallar, modern tıbbı bilimsel açıdan iyi bir ilaç ve tıbbi malzeme, bu bileşenlerin içeriği ve bilimsel olarak tanınan ve iyi bilinen farmakolojik aktiviteler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Bitkinin meyvesi yapraklı sebzeler halinde pişirilebilir ve çıkmadan önce yapraklar kullanılabilir. Ancak, bitkilerin daha küçük kolları yenildiğinde çok lezzetli değildirler. Kahve ile aynı familyadandır. Yaprakların meyveleri genellikle kurutulur ve pişirilir ve daha sonra daha az kafeinli olarak kahve yerine kullanılır. Ayrıca duman ve toksinleri azaltmak için kullanılır.

Galium incanum'un bazı bitki ekstraktları tıbbi ürünler olarak etkilidir ve ciddi hastalıklar ve organ yetmezliği ile ilişkilidir. Bu nedenle, bu bitkinin güvenlik ve etkinlik değerlendirmesi önemli bir konudur. Bilimsel hayatı etkiler ve insan aktivitesinin etkileşimi, farklı bulaşıcı hastalıkların tıbbi sisteminin gelişmesine yol açan farklı şifalı bitkileri, halk anlayışını kanıtlar (Adenisa vd. 2000).

Rubiaceae, özellikle *Galium incacum*, doğal ve tartışmasız bir anti-enfeksiyöz deposudur ve bilimsel açıdan yeni ilaç veya olarak direnç açısından tatmin edici ve etkilidir. Antibiyotiklerin antimikrobiyal ajanlar olmasına rağmen, üreme yönteminin geleneksel farmakopesi tedavisi için çok önemli olmasına rağmen özellikle bitkilerin tıbbi bileşiklerinin hazırlanmasının gelişimi antibiyotikleri sağlık sorunu haline getirmektedir.

Galium incanum'un antibiyotiklerde kullanımı, özellikle klinik tıpta, tarım ve veterinerlikte ve yaygın ve bulaşıcı hastalıklarda antibiyotiklere karşı özellikle dirençli olmasından kaynaklanmaktadır. Mikrobiyal suşlar sonunda çok ciddi bir problem olmuştur. Patojenik mikroorganizmaların tedavisinde insanların yeni antibakteriyel maddeler bulmasına yönlendirmiştir. Bu çalışmalarda temelde bitki ekstraktlarını açığa çıkarmaya odaklanılmaktadır. *Galium incanum*'un yeni kimyasal yapısı, antimikrobiyal anomaliye karşı mücadelede çok önemlidir. Bu doğal ürünler genellikle bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen orta metabolitlerdir. Beslenme değişiklikleri gibi dış uyaranlara cevap vermek önemlidir. İlaç alanında kullanılan dikkatli yapıların çeşitliliği nedeniyle geniş bir alana yayılmıştır. Yüzyıllar boyunca enfeksiyöz hastalıkların enkarnasyonunun tedavisi için farmakolojik etki açısından *Galium incanum* yeni bir antibakteriyel ilaçların önemli bir kaynağıdır. Bitki ekstraktları, kökleri, yaprakları veya çiçekleri dahil bitkilerin antibakteriyel etkisini test etmek için kullanılır. *Galium incanum*'un bitki ekstraktları, bakteri

direncinin geliştirilmesinde kullanılır ve günümüzde birçok antibiyotik mevcuttur (Kajangwe vd. 2008).

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, *Galium incanum*'un yaprak ve çiçekden elde edilen su, metanol ve etil asetat gibi farklı ekstraktlarının çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etklinliğini belirlemek ve DNA koruma özelliğini tanımlamaktır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

Galium Türkiye'de yaygın olarak yayılan ve 10 bölümde toplanan 101 türden oluşan Rubiaceae familyasının bir cinsidir. Galium türleri, birçok ilacın aktif maddesidir ve yüzyıllardır acı tonik, yatıştırıcı, yaralara, öksürüğe, cilt hastalıklarına karşı ve / veya hipotansif olarak kullanılmaktadır

Kaneezet vd., (1998) bazı tıbbi bitkilerin geleneksel tıpta önemli bir rol oynadığını bildirdmişlerdir. Galium türleri, kimyasal bileşimlerindeki bir enzim nedeniyle sütün pıhtılaşmasına neden olur. Bu sebeple bu bitkiye " Yoğurt bitkisi " denir. (Ergun vd. 1999).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve Reaktif azot türleri (RNS) ve ağır metallerin reaktivitesini içeren toksik maddeler Fenton reaksiyon hasarından (Jackson ve Bartek, 2009) salınır. Bunlar mutasyonlara, hasarlı DNA'ya, genomik kararsızlığa ve birçok insan travmasına neden olur (Kastan vd., 1991). Demir kombinasyonu, Fenton reaksiyonunun oluşturulmasıyla meydana gelir. Anyon süperoksit ve hidrojen peroksit, lipitlerin peroksitini meydana getiren hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olur.

Özellikle, ROS ayrıca etkili bir enflamatuar meme hastalığı oluşturur (Jaiyesimi vd., 1992; Wiseman ve Halliwell, 1996) ve akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve prostat kanserinde önemli bir rol oynar.

Yağız vd. (2017) beş tür patojenik bakteriye karşı Galium türünden elde edilen esansiyel yağın mükemmel bir antimikrobiyal sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Senior vd. (2018) *Galium incanum* yerine bu Rubiaceae bitkisi'nin diğer suşlarının bazı patojenik mikroplara doğrudan etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır. *Galium aparin* bitkisi, antimikrobiyal özellikler bakımından yapılabilecek benzer sonuçlar ortaya koyarken, bu ekstrakt en düşük (1.85-15 mg / mL) MİK ve (3.75-7.5 mg / mL) MBC değerini sergilemiştir.

Başka bir çalışma, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının (MRSA), Rubiaceae, Fabaceae ve Poaceae bitkilerinin metanolik yaprak ekstraktlarından, disk difüzyon deneyi ve etüt dilüsyon yöntemi ile değerlendirildiğini göstermiştir. Sonuçlar, toplam 177 *S. aureus* izolatından, 92'sinin (%51.97) bir antibiyogramda metisiline dirençli olduğunu göstermiştir.

300 mg / L konsantrasyonda maksimum inhibisyon bölgeleri gösteren tüm bitki ekstraktları için test edilen mikroorganizmalar üzerinde doza bağlı inhibisyonlar kaydedilmiştir. *L. aphaca, G. aparine* ve *H. murinum*, MRSA suşlarında pozitif kontrole kıyasla en yüksek antibakteriyel etkinliği göstermiş ve ayrıca diğer bitki ekstraktlarından daha yüksek toplam polifenol ve flavonoid içeriği kaydedilmiştir (Sharifi-Rad, 2016).

Vlase vd. (2014) yaptığı araştırmada, Galium'un çeşitli ekstraktlarının, özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı önemli bir etkinlik sergilediği belirlenmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Ekstraktı

Su, metanol ve etil asetat ekstraktlarını elde etmek için, 10 g kurutulan bitki, 200 ml adı geçen solventlerle oda sıcaklığında 25°C'de bir gün boyunca yumuşatılmıştır. Sonra, ekstraktları 40°C'de konsantre etmek için buharlaştırılmışlardır. Su ekstraktını elde etmek için, toz haline getirilmiş numuneler yarım saat boyunca iki yüz elli ml damıtılmış su içinde kaynatılmıştır. Ayrıca, su ekstraktı filtre edilmiş, iki gün boyunca liyofilize edilmiş (- 80 ° C) ve tüm ekstraktlar kullanılana kadar karanlıkta + 4 ° C'de tutulmuştur. Ek olarak, her bir yüz ml ekstrakt, deneye başlarken 900 ml DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözülmüştür.

Aşağıdaki malzemeler ve kimyasallar, MİK ve DNA koruma deneyi için kullanılmıştır: Petri kapları, hassas laboratuvar terazisi, otoklav, manyetik karıştırıcı, laminer akış dolabı, damıtılmış su, laboratuar tüpleri, tüp rafı, şırınga, Eppendorf tüpleri, McFarland, 96 oyuklu plaka, spektrofotometre, mikro santrifüj tüpü, Elüsyon Tamponu, RedSafe nükleik asit boyama çözeltisi, Besin agar, mikrodalga, elektroforez makinesi, Jel görüntü analiz yazılımı.

3.2. Mikroorganizmalar

Tablo 3.1'de gösterildiği gibi, bu çalışmada toplam 10 patojenik Gram pozitif ve Gram negatif bakteri kullanılmıştır.

3.3. MİK Deney Prosedürü

MİK (Minimum inhibitör konsantrasyon) değeri, mikroorganizmanın büyümesini engelleyen en düşük bitki ekstrakt konsantrasyonunu temsil eder. MBC alt kültür yaklaşımı ile belirlenmiştir. Ek olarak, bu kuyucuklardan elde edilen numunelerden oluşturulan alt kültürler gözle görülür bir bulanıklık göstermemiştir, aksi halde taze hazırlanmış besin agarı plakalarında MİK tahlillerinde büyüme meydana gelirdi. Aslında, bir günlük inkübasyondan sonra, MBC ekstraktın düşük konsantrasyon

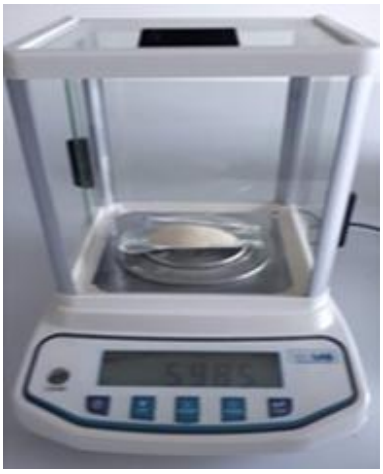
derecesi olarak kabul edilmiş ve kullanılan agar plaka yüzeyinde herhangi bir büyümeye izin verilmemiştir.

3.3.1. Besin Agarı Ortamı Hazırlanması

Besin agar ortamı, tam çözünme ve kaynama işleminden sonra, 1000 ml damıtılmış su içinde 23 gr agar kullanılarak hazırlanmıştır. Çözelti, mikroplardan herhangi bir etkiyi önlemek için gümüş ile kaplanmış, daha sonra 15 dakika boyunca sterilizasyon için otoklava konulmuştur (Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.1. Besin agarı



Şekil 3.2. Hassas Terazi



Şekil 3.3 Ortamın çözünmesi



Şekil 3.4. Otoklav

Hazırlanan agar ortamı, laminer kabinindeki petri kaplarına dağıtılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler her bir petri kabına inoküle edilmiştir.

Tablo 3.1. Bakteri suşları

	BAKTERİ SUŞLARI	GRAM BOYAMA
1	*S.aureus* ATCC 25923	+
2	*P.vulgaris*	-
3	*E.coli*	-
4	*S.marrescens*	-
5	*S. epidermis*	+
6	*S.alpha haemolyticus*	+
7	*P.aeroginosa*	-
8	*L.monocytogenes* ATCC 7644	+
9	*E.durans*	+
10	*E.aerogenes* ATCC 13048	-

Kaplar döndürülmüş ve inkübatörde 24 saat 37°C'de tutulmuştur (Şekil 3.5).

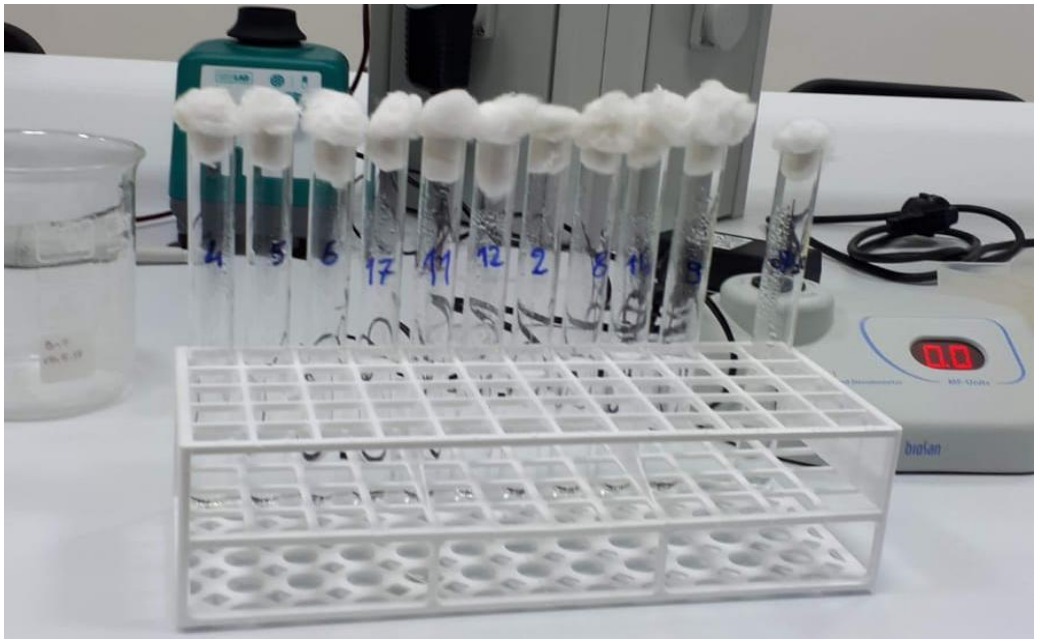


Şekil 3.5. İnkübatör

24 saat sonra, 1000 mL için 8 gr konsantrasyonda LB bulyon hazırlanmıştır. Bu çalışma için gereken miktar 50 µL idi. Yukarıdaki yüzdeyi takip etmek için, hassas laboratuar terazisi kullanılarak 0.4 gr ölçülmüş ve 50 mL distile suya eklenmiştir. Bundan sonra, çözeltiyi karıştırmak için manyetik bir karıştırıcı kullanılmıştır. Tamamen çözüldükten sonra çözelti 15 dakika sterilize etmek için otoklava konulmuştur. Hazırlanan bulyon daha sonra her biri için 10 µL olan 5 Eppendorf tüpüne dağıtılmıştır. Tüpler bakterilere göre numaralandırılmıştır. Petri kabındaki

bakteriler alınmış ve daha sonra bir tüpe koyulmuştur ve 37 ° C sıcaklıkta bir gece boyunca inkübatörde bırakılmıştır.

Her bakteri 10 ml damıtılmış suyla doldurularak ve pamuk tapalarla kapatılarak 10 bakteri türü için on cam tüp hazırlanmış, daha sonra 15 dakika sterilizasyon için otoklava konulmuştur. Bakteri, damıtılmış su tüplerine, konsantrasyon 0.5 McFarland'a ulaşana kadar ilave edilmiştir, çözeltiyi 10 dakika boyunca karıştırmak için manyetik bir karıştırıcı kullanılmıştır. Konsantrasyon tekrar kontrol edilmiş ve gerektiğinde distile su ile ayarlanmıştır. Tüpler tekrar etiketlenmiş, kapatılmış ve tüp rafının içine koyulmuştur (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. 0.5 McFarland bakteri ölçümü

3.4. Bitki Ekstraktlarının Dilüsyonu

Üç bitki ekstraktı, Şekil 3.7'de gösterilen metanol, su ve etil asetattır. 1900 µL Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren bir tüpe toplam 100 µL bitki ekstraktı eklenmiştir.



Şekil 3.7. Bitki ekstraktları

Şekil 3.8'de gösterildiği gibi kabinde 96 hücreli plaka hazırlanmıştır. Pozitif kontrol için G sütunu, negatif kontrol için H sütunu belirlenmiştir.



Şekil 3.8. Mikrotitre plakası

3.5. MBC ve MİK Ölçümü

Her bir hücreye, seyreltilmiş bitki ekstraktına 100 µL LB besi yeri ilave edilmiş ve H kolonu hariç tüm hücrelere 10 µL bakteri ilave edilmiştir, çünkü bu kolon sadece kontrol amaçlı kabul edilmiştir. Bitki ekstraktından 100 µL, A kolonuna ilave edilmiş ve sonra karıştırılmıştır. Karışımdan 100 µL alınmış ve F sütununa ulaşılıncaya kadar B sütununa eklenmiştir. Hepsi bir gece boyunca inkübatörde bırakılmış ve ölçümler spektrofotometre ile alınmıştır. MİK ölçümleri yapılmış ve negatif konsantrasyonlarla karşılaştırılmıştır. En düşük konsantrasyon daha sonra yeni petri

kaplarında kültürlenmiş ve spektrofotometre (Şekil 3.9) kullanılarak MBC ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.9. MBC Ölçümü

3.6. DNA Koruma

3.6.1. Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Peletlenmiş hücreler 250 µL süspansiyon çözeltisinde yeniden süspansiyona alınmış, hücre süspansiyonu bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüpe 250 µL Lizis çözeltisi ilave edilip ve karıştırılmış ve daha sonra 350 µL Nötralizasyon çözeltisi ilave edilmiş ve tüp 6 kez yatırılarak tamamen karıştırılmıştır. Solüsyon daha sonra hücre döküntülerini ve kromozomal DNA'yı ayırmak için beş dakika boyunca santrifüjlenmiş, bundan sonra elde edilen süpernatan yüzer boşaltılarak tedarik edilen GeneJET spin kolonuna aktarılmıştır.

Yine çözelti bir dakika santrifüjlenmiş, ve akıntı atılmış ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir. GeneJET spin kolonuna 500 µL yıkama çözeltisi eklenmiş ve 60 saniye santrifüjlenmiştir. Akıntı atılmış ve tüp aynı toplama tüpüne geri döndürülmüştür. Yıkama prosedürü, 500 µL yıkama çözeltisi kullanılarak tekrarlanmış, akıntı atıldıktan sonra geri kalan herhangi bir ilave yıkama çözeltisini çıkarmak için bir dakika daha santrifüjlenmiştir.

GeneJET spin kolonu, taze bir 1.5 mL mikro santrifüj tüpüne aktarılmış ve plazmid DNA'yı ayrıştırmak için kolona 50 µL Elüsyon Tamponu ilave edilmiş ve daha sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edip 2 dakika santrifüjlenmiştir. Kolon çıkarılmış ve saflaştırılmış plazmid DNA, -20 ° C'de tutulmuştur.

3.6.2. DNA ve Fenton Reaktif Hazırlama

0.03 µL H_20_2, 0.044 gr EDTA ve 0.12976 gr $FeCl_2$, hassas laboratuvar terazisi kullanılarak ölçülmüş ve 10 mL damıtılmış suyla konik bir şişeye konulmuştur. Daha sonra çözeltiyi karıştırmak için manyetik bir karıştırıcı kullanılmış ve 5 dakika kaplanmıştır.

Beş tüp şu şekilde etiketlenmiştir:

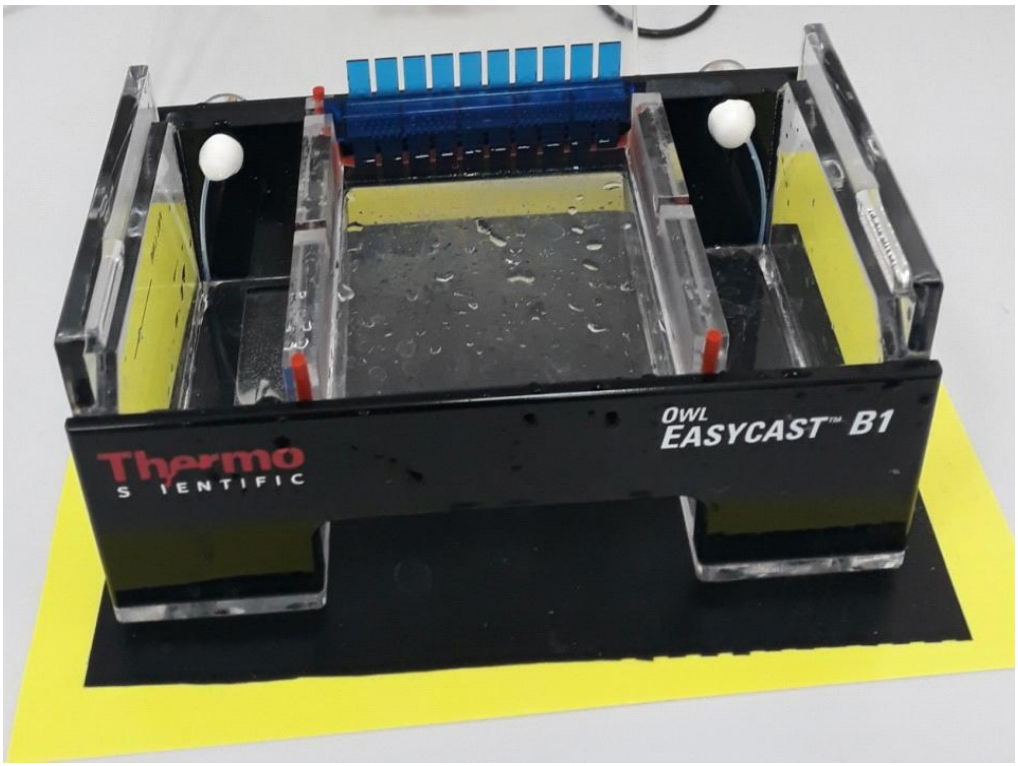
1- (-) Kontrol
2- (+) Kontrol
3- 3-Metanol
4- 4-Su
5- 5-Etil asetat

Beş tüpün içeriği, Tablo 3.2'de belirtilen miktarları içermektedir.

Tablo 3.2. Beş tüpün içeriği

	Plazmid	Fenton reaktifi	Distile Su	Eksrakt
Kontrol (-)	1 µL	0	19 µL	0
Kontrol (+)	1 µL	3 µL	16 µL	0
Metanol	1 µL	3 µL	11 µL	5 µL
su	1 µL	3 µL	11 µL	5 µL
Etil Asetat	1 µL	3 µL	11 µL	5 µL

Beş tüp, 37 ° C sıcaklıkta 45 dakika boyunca inkübatöre konmuştur. Agar preparatı için 0.4 gr Agaroz jeli ve 50 µL TAE tamponu karıştırılmış ve beş dakika süreyle mikrodalgaya konmuş ve 2.5 µL RedSafe nükleik asit boyama çözeltisi ile karıştırılmıştır. Jel, bir elektroforez makinesine yerleştirilmiştir. Analizi yapmak için jel görüntü analiz yazılımı kullanılmıştır. Analiz, 10 µL ekstrakt konsantrasyonu için ikinci kez tekrarlanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Elektroforez ekipmanı

4. SONUÇLAR

4.1. Bitki ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerine etkisi

Galium incanum bitkisinden elde edilen üç ekstrakt (metanol, su ve etil asetat), *Staphylococcus aurous (*ATCC-2593*), Proteus vulgaris, E. coli, Serratia marrecens, Staphylococcus epidermis, Alpha haemolyticus streptococcus, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Enterococcus durans* ve *Enterobacter aerogenes* dahil 10 bakteri suşu üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermiştir.

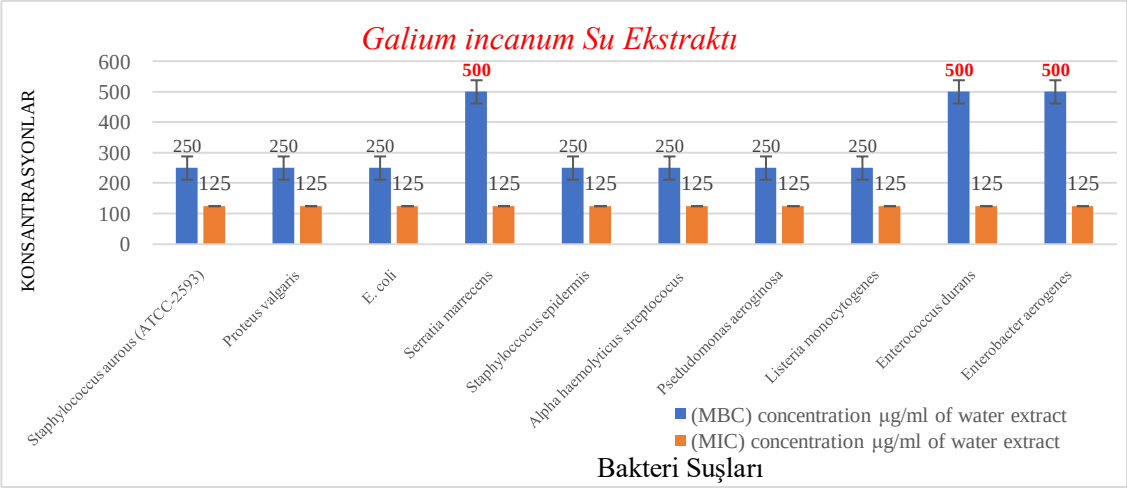
4.1.1. *Galium incanum* su ekstraktı

Galium incanum'un su ekstraktının 125 µg / ml konsantrasyondaki MİK değeri en iyi antimikrobiyal etkisi sergilemiştir. Bakterilerin tüm MİK değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Galium incanum su ekstraktları için, *Serratia marrescens, Enterococcus durans* ve *Enterobacter aerogenes*'in MBC değerini 500 µg / ml konsantrasyon olarak gösterdiğini göstermiştir. Bu üç bakteri suşunun diğerleri Gram negatif bakteridir ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Galium incanum su ekstraktı

Mikroorganizma	**µg / ml Su ekstraktı Konsantrasyonu(MBC)**	**µg / ml Su ekstraktı Konsantrasyonu(MİK)**
Staphylococcus aurous ATCC-2593	250	125
Proteus vulgaris	250	125
E. coli	250	125
Serratia marrecens	500	125
Staphylococcus epidermis	250	125
Alpha haemolyticus streptococcus	250	125
Pseudomonas aeruginosa	250	125
Listeria monocytogenes ATCC-1304	250	125
Enterococcus durans	500	125
Enterobacter aerogenes ATCC -1308	500	125



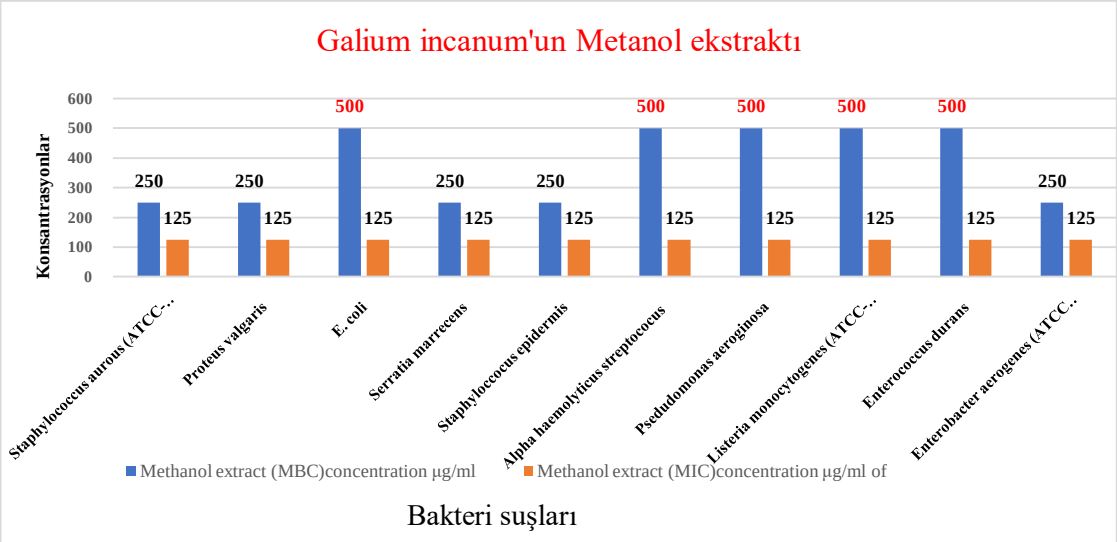
Şekil 4.1. *Galium incanum*'un su ekstraktının farklı bakteri suşları üzerine etkisi

4.1.2. *Galium incanum*'un Metanol Ekstraktı

Galium incanum metanol ekstraktı, 125 µg / ml konsantrasyonunda Gram pozitif ve Gram negatif bakteri tüm suşlar için *Galium incanum* su ekstraktı ile aynı sonucu vermiştir. Bu ekstrakt için minimum bakteri konsantrasyonları, 500 µg / ml ile beş bakteri suşunda daha fazla antimikrobiyal etki sağlamıştır. Bunlardan üçü *Alpha haemolyticus streptococcus*, *Listeria monocytogenes* ATCC-1304 ve *Enterococcus durans* dahil olmak üzere Gram pozitif bakteri ve *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere iki Gram negatif bakterilerdir. Bu nedenle, bu ekstrakt Tablo 4.2 ve Şekil 4.1'de gösterildiği gibi Gram negatif bakterilerden daha çok Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olmuştur.

Tablo 4.2. *Galium incanum'un Metanol Ekstraktı*

Mikroorganizma	**µg / ml Metanol ekstraktı Konsantrasyonu (MBC)**	**µg / ml Metanol ekstraktı Konsantrasyonu (MİK)**
Staphylococcus aurous (ATCC-2593)	250	125
Proteus vulgaris	250	125
E. coli	500	125
Serratia marrecens	250	125
Staphylococcus epidermis	250	125
Alpha haemolyticus streptococcus	500	125
Pseudomonas aeruginosa	500	125
Listeria monocytogenes (ATCC-1304)	500	125
Enterococcus durans	500	125
Enterobacter aerogenes (ATCC 1308)	250	125



Şekil 4.2. *Galium incanum*'un Metanol ekstraktının farklı bakteri suşları üzerine etkisi

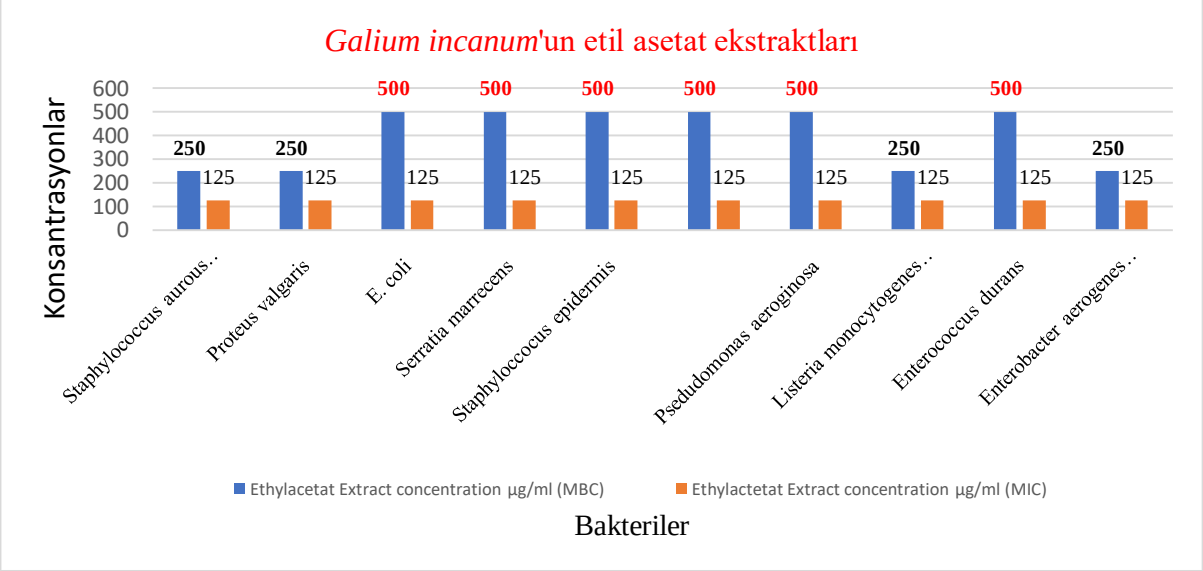
4.1.3. *Galium incanum*'un Etil Asetat Ekstraktı

Galium incanum'un etil asetat ekstraktı, bu ekstraktlar arasında diğer su ve metanol ile karşılaştırıldığında en iyi antimikrobiyal etkinliği sağlamıştır. 500 µg/ml etil asetat ekstraktı, E. *coli, Serratia marrescens, Staphylococcus epidermis, Alpha haemolyticus streptococcus, Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus*

konsantrasyonlarını içeren altı bakteri suşunu güçlü bir şekilde etkilemiştir. Tablo 4.3 ve Şekil 4.3'te gösterildiği gibi MİK, diğer ekstraktlarda 125 µg/ml için aynı sonuçları vermiştir.

Tablo 4.3. *Galium incanum'un etil asetat ekstraktları*

Mikroorganizma	**Etil asetat Ekstraktı Kon. µg/ml (MBC)**	**Etil asetat Ekstraktı Kon µg/ml (MİK)**
Staphylococcus aurous (ATCC-2593)	250	125
Proteus vulgaris	250	125
E. coli	500	125
Serratia marrecens	500	125
Staphylococcus epidermis	500	125
Alpha haemolyticus streptococcus	500	125
Pseudomonas aeruginosa	500	125
Listeria monocytogenes (ATCC-1304)	250	125
Enterococcus durans	500	125
Enterobacter aerogenes (ATCC 1308)	250	125



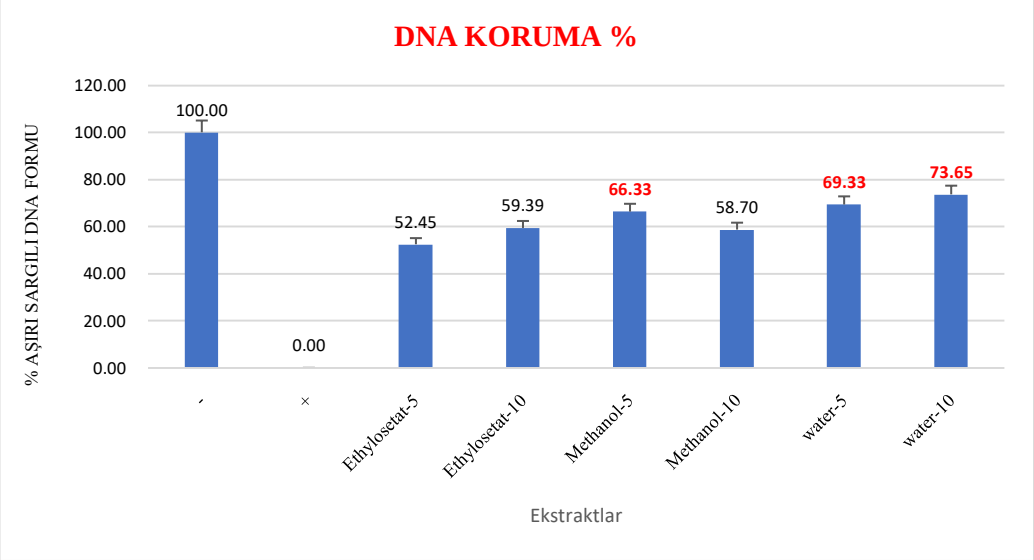
Şekil 4.3. *Galium incanum* etil asetatının farklı bakteri suşları üzerine etkisi

Sonuç olarak, her üç *Galium incanum* ekstraktının da bakteriyel suş üzerinde iyi bir antimikrobiyal etkisi olmuştur. Ek olarak, etil asetatın etkisi bazı bakteri suşları üzerinden sudan ve metanol ekstraktlarından daha yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni etil asetat içeriği olabilir ve farklı antibiyotiklerde önemli bir rol oynayabilir. Genel olarak, bütün ekstraktlar *Staphylococcus aurous* (ATCC-2593) ve *Proteus vulgaris*

bakterileri üzerinde aynı etkiye sahip çıkmış ve MBC her bakteri için 250 µg / ml olarak kaydedilmiştir.

4.2. Bitki Ekstraktlarının DNA Koruma Etkisi

Ekstraktlar iki farklı konsantrasyonda (5 ve 10 mg / ml) test edilmiştir. Her iki konsantrasyon da plazmid DNA'nın korunması göstermiştir. 10 mg / ml su konsantrasyonu en çok koruma etkisi (%74) göstermiş, ve bunu %69 koruma sağlayan 5 mg / ml su ekstraktı takip etmiştir. Bunları sonra %66 DNA koruma etkinliği sergileyen etanol ekstraktı takip etmiştir. Genel olarak, su en yüksek DNA koruması sağlamış ve ardından metanol ekstraktları gelmiştir. DNA koruma sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. DNA koruma (%)

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, *Galium incanum*'dan elde edilen üç farklı bitki ekstraktının biyolojik potansiyeli hakkında görüşler sunmaktadır. Etil asetat ve metanol ekstraktları, çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarını etkilemiş fakat bu bitkiden elde edilen su ekstratı daha az etkili olmuştur. 10 mg / ml su ekstraktı konsantrasyonu diğerlerine göre daha fazla DNA koruma aktivitesine sahip çıkmış ve bunu diğer su ekstraktları izlemiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar (3.1 -12.8 /g / ml) arasında farklı bakteri türleri üzerinde MİK elde eden Ergun vd.'nın (1999) sonuçlarıyla uyuşmaktadır. Üç ekstraktın farklı bakteri suşları üzerinde farklı etki dereceleri vardır, bu da muhtemelen ekstraktın içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Yağız vd. (2017), Galium türlerinden patojenik bakterilere karşı elde edilen esansiyel yağ ekstraktının mükemmel bir antimikrobiyal sonuç verdiğini bildirmiştir. Bu sonuç bakterilere karşı doğru antimikrobiyal etki sağlayan bulgularımızla uyumludur.

Galium incanum'un etil asetat özü, MBC için metanol ve suyla karşılaştırıldığında en iyi etkiyi göstermiştir. MBC, *E. coli, Serratia marrescens, Staphylococcus epidermis, Alpha haemolyticus streptococcus, Psedudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus durans* dahil olmak üzere altı bakteri suşunu güçlü bir şekilde etkilemiştir. Bu sonuç kimyasal yapısı farklı olan ekstratkarın içeriğinde kaynaklanıyor olabilir.

Aslında, Senio vd. (2018), Galium yerine bu bitkinin Rubiaceae türünün bazı patojenik mikrop türleri üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu gösteren bir çalışma yürütmüşlerdir. *Galium aparin*, antimikrobiyal özellikler açısından benzer sonuçlar vermiştir, bu ekstraktın en düşük MİK değeri (1.85-15 mg / mL), MBC değeri ise (3.75-7.5 mg / mL) şeklinde kaydedilmiştir. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızdan daha fazladır, çünkü mg / L cinsindendir, bizim sonuçlarımız ise µg / L değerindendir.

Çalışmamız, toplam 177 *S. aureus* izolatının 92'sinin (%51.97) bir antibiyogramda metisiline dirençli olduğunu gösteren bir çalışma olan Sharifi-Rad (2016) tarafından yapılan bir çalışma ile karşılaştırılabilir. 300 mg / L konsantrasyonda maksimum inhibisyon bölgeleri gösteren tüm bitki ekstraktları için test edilen mikroorganizmalar üzerinde doza bağlı inhibisyonlar kaydedilmiştir. *L. aphaca, G. aparine* ve *H. murinum* MRSA suşlarında en yüksek antibakteriyel etkinliği göstermiştir.

DNA koruma açısından, 10 mg / ml su ekstraktı konsantrasyonu daha fazla korumaya sahip iken (%74) ve bunu %69 DNA koruma sağlayan 5 mg / ml su ekstraktı ve %66 koruma ile metanol ekstraktları takip etmektedir. Bu durum, su ekstraktının DNA'ya kolayca bağlanabilen farklı bir bileşik içerebileceği ile açıklanabilir.

DNA koruması üzerine bu bitki için yapılan bu çalışma ile karşılaştırılabilicek başka çalışma bulunamamıştır, diğer çalışmalar sadece antimikrobiyal aktiviteler açısından inhibisyon bölgesini kullanmışlardır.

6. SONUÇ

Bu çalışma, *Galium incanum*'dan elde edilen üç farklı bitki ekstraktının, özellikle de etil asetat ekstraktının ve metanol ekstraktının biyolojik potansiyeliyle ilgili olarak, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin farklı suşlarını etkilediği fakat su ekstaktının diğerlerine oranla daha az etkili olduğu konusunda sonuçlar ortaya koymuştur. Biyolojik potansiyel için araştırılan bitki ekstraktları için çeşitli DNA korumaları alanındaki araştırmalar için yeni fırsatlar yaratarak, özellikle bu bitkinin su ekstraktından elde edilen sonuç gelecekteki yeni biyo-farmasötiklerin oluşumuna duyulan ilgiyi artıracaktır.

Sonuçlarımız, *Galium incanum*'un, antimikrobiyal ajan ve DNA koruyucusu olarak ekstraktlar için değerli sonuçlar sağladığını göstermiştir. Bu ekstraktları deney hayvanlarına uygulamak ve toksisitelerini incelemek ve gelecekte ilaç olarak kullanmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulacaktır.

KAYNAKLAR

Adenisa S.K., Idowu O., Ogundaini A.O., Oladimeji H., Olugbade T.A., Onawunmi G.O. & Pais M., (2000). Antimicrobial constituents of the leaves of Acalypha wilkesiana and Acalypha hispida. *Journal of Phytotherapy* 14: 371-374.

Chukwujekwu J.C., Amoo S. O, & Staden V. J. (2013). Antimicrobial, antioxidant, mutagenic and antimutagenic activities of Distephanus angulifolius and Ormocarpum trichocarpum. *Journal of Ethnopharmacology*, 148: 975–979.

Davis, A. P. & D. M. Bridson. (2003). Introduction to the Rubiaceae M. Goodman & J. Benstead (editors), *The Natural History of Madagascar*. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 431–434 in S.

De Block P. & Robbrecht E. (1997). On the ovary structure of Dictyandra and Leptactina compared with other Pavetteae (Rubiaceae - Ixoroideae), or evolution from multiovulate to uniovulate placentas. *Bot. Jahrb. Syst*. 119: 99-113.

Ehrendorfer, F., E. Schönbeck-Temesy, C. Puff, & W. Rechinger. (2005). Rubiaceae. Part 176 of: *K. H. Rechinger, Flora Iranica. Verlag des Naturhistorischen Museums Wien*, Vienna, Austria

Ergun, F, Deliorman, D., Velioğlu, A., Şener, B. & Bozok,C. (1999). Antimicrobial activities of galium species, *J.Fac. Pharın. Gazi*. 6 (l),7-1 l.

Jackson, S. P. & Bartek, J., (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.

Jaiyesimi, I. A. , Buzdar, A.U. & Hortobagyi, G., (1992). Inflammatory breast cancer: a review. *J. Clin. Oncol*. 10,1014-1024.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*51, 6304-6311.

Korir R, K, C. Mutai, C. Kiiyukia & C. Bii, (2012). Antimicrobial Activity and Safety of two Medicinal Plants traditionally used in Bomet District of Kenya. *Research Journal of Medicinal Plant,* 6: 370-382.

Kajangwe, V., Tomani, J. C., Mukazayire, M. J., Chalchat, J. C. & Duez, P., (2008).Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of 3 Helichrysum species. In 7th Joint meeting of AFERP, GA, PSE & SIF *(Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest),* pp-74 :117.

Sharifi-Rad, M., Iriti, M., S. Gibbons, M., J. & Sharifi-Rad, J (2016). Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of Rubiaceae, Fabaceae and Poaceae plants: A search for new sources of useful alternative antibacterials against MRSA infections. *Cell. Mol. Biol.*, 62 (9): 39-45.

Senio, S., Carla Pereira, Josiana Vaz, Marina Sokovic, Lillian Barros & Isabel C.F.R. Ferreira (2018). Dehydration process influences the phenolic profile, antioxidant and antimicrobial properties of *Galium aparine* L. *Industrial Crops & Products* 120 (2018) 97–103.

Trease, G.E. & Evans, W.C. (2002). A textbook of pharmacognosy, 15th edition. London: Academic press.

Vlase, L., Mocan, A., Hanganu, Benedec, D. & Gheldiu, A., (2014). Comparative study of polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of four *Galium* species *rubiaceae* Crișan, , vol. 9, no. 3, July - September, p. 1085 – 1094.

WHO. (2004). European Union Herbal Medicines Directive. Directive 2004/24/EC of The European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending,

as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. Off. *J. Eur. Union 47 85–90*.

Wiseman, H. & Halliwell, B., (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J*. 313, 17-29.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı	: Khawlah Mustafa Faraj ABOUSHEENAH
Doğum Tarihi ve Yeri	: 20.03.1987, Tajora-Libya
Medeni Durumu	: Evli
Yabancı Dili	: İngilizce
E-posta	: Khawlamustafa87@gmail.com
Mesleği	: Araştırma Görevlisi

EĞİTİM GEÇMİŞİ

Lise	: Elbanat Kız Lisesi, 2005
Lisans	: Tıp Bilimleri Yüksek Okulu, Tajora/Libya, 2008