TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Origanum onites L. UÇUCU YAĞI VE EKSTRESİNİN ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN FARKLI DİSTİLASYON VE EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİNİN ÜRÜN KALİTESİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burçin MERSİN

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN

ANKARA
2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Origanum onites L. UÇUCU YAĞI VE EKSTRESİNİN ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN FARKLI DİSTİLASYON VE EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİNİN ÜRÜN KALİTESİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burçin MERSİN

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN

ANKARA
2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum "*Origanum onites L.* UÇUCU YAĞI VE EKSTRESİNİN ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN FARKLI DİSTİLASYON VE EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİNİN ÜRÜN KALİTESİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Burçin MERSİN
Tarih : 01/07/2022
İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalında

Burçin MERSİN tarafından hazırlanan

"*Origanum onites* L. Uçucu yağı ve Ekstresinin Elde Edilmesinde Kullanılan Farklı Distilasyon ve Ekstraksiyon Tekniklerinin Ürün Kalitesine Etkilerinin Değerlendirilmesi"

adlı tez çalışması

Aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/07/2022

Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. L. Ömür DEMİREZER
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Betül SEVER YILMAZ
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen Aktan
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Botanik Bilgiler	11
1.1.1. *Origanum onites* L. Bitkisinin Sistematikteki Yeri	11
1.1.2. Lamiaceae Familyasının Özellikleri	12
1.1.3. *Origanum* Cinsinin Botanik Özellikleri	13
1.1.4. *Origanum onites* L. Bitkisinin Botanik Özellikleri	13
1.2. *Origanum onites* L. Üzerinde Yapılan Çalışmalar	14
1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	14
1.2.1.1. *Origanum onites*'in Uçucu Bileşenleri	14
1.2.1.2. *Origanum onites*'in Uçucu Olmayan Bileşenleri	16
1.2.2.Biyoaktivite Çalışmaları	17
1.2.2.1. Antioksidan Aktivite	17
1.2.2.2. Antimikrobiyal Aktivite	18
1.2.2.3. İnsektisit Aktivite	20
1.2.2.4. Antikanser Aktivite	21
1.2.2.5. Hepatoprotektif Aktivite	23
1.2.2.6. Analjezik Aktivite	24
1.3. Uçucu Yağlar	24
1.4. Uçucu Yağların Üretimi	26
1.4.1. Distilasyon	34
1.4.1.1. Su Distilasyonu	36
1.4.1.2. Su ve Buhar Distilasyonu	36
1.4.1.3. Buharı Distilasyonu	37
1.4.2. Ekstraksiyon	38
1.4.2.1. Çözücü Ekstraksiyonu	38
1.4.2.2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu	39
1.4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu	40
1.4.2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon	41
1.4.3. Mekanik Yöntemler	41
2. GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1. Bitkisel Materyal	42
2.2. Fitokimyasal Analizler	44
2.2.1. Distilasyon Çalışmaları	44
2.2.1.1. Gaz Kromatografisi	45
2.2.1.2. Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi	45
2.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	46

2.2.2. Ekstraksiyon Çalışmaları 47
2.2.2.1 Ekstraksiyon Yöntemi 47
2.2.2.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi 48
2.2.2.2.1. Analiz Yöntemi 49
2.2.2.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 50
2.2.2.2.3. HPLC Analiz Şartları 50
2.2.2.2.4. Eksternal Standart Yöntemi ile Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayinleri 51
2.3. Farmakope Analizleri 55
2.3.1. Bağıl Yoğunluk (2.2.5) 55
2.3.2. Kırılım İmleci (2.2.6) 56
2.3.3. Optik Çevirme (2.2.7) 56
2.3.4. Donma Noktası (2.2.18) 57
2.3.5. Asit Değeri (2.5.1) 58
2.3.6. Peroksit değeri (2.5.5) 59
2.3.7. Uçucu Yağlarda Yabancı Ester Aranması (2.8.6) 60
2.3.8. Uçucu Yağlarda Uçurma Artığı (2.8.9) 61
2.3.9. Uçucu Yağlarda Su Aranması (2.8.5) 61
2.3.10. Uçucu Yağların Alkoldeki Çözünürlükleri (2.8.10) 61
2.4. Aktivite Testleri 62
2.4.1. Antioksidan Aktivite 62
2.4.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi 62
2.4.2. Antibakteriyel Aktivite 63
2.4.3. Antibiyofilm Aktivite 64
2.4.4. Anti-quorum Sensing Aktivite 65

3. BULGULAR 66
3.1. *Origanum onites* Uçucu Yağının Farklı Tip Clevenger Aparatları ile Eldesi 66
3.2.1. Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrofotometrisi 67
3.3. İnce Tabaka Kromatografisi 69
3.4. Ekstraksiyon Çalışmaları 70
3.4.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi 70
3.4.1.1. Standart Bileşiklere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Doğru Denklemleri 70
3.4.1.2. Fenolik Madde Miktar Tayini İçin Elde Edilen YBSK Kromatogramları 73
3.5. Farmakope Analizleri 78
3.5.1. Bağıl Yoğunluk (2.2.5) 79
3.5.2. Kırılım İmleci (2.2.6) 79
3.5.3. Optik Çevirme (2.2.7) 79
3.5.4. Donma Noktası (2.2.18) 80
3.5.5. Asit Değeri (2.5.1) 80
3.5.6. Peroksit değeri (2.5.5) 81
3.5.7. Uçucu Yağlarda Yabancı Ester Aranması (2.8.6) 81
3.5.8. Uçucu Yağlarda Uçurma Artığı (2.8.9) 83
3.5.9. Uçucu Yağlarda Su Aranması (2.8.5) 85
3.5.10. Uçucu Yağların Alkoldeki Çözünürlükleri (2.8.10) 86
3.6. Aktivite Testleri 88
3.6.1. Antioksidan Aktivite 88
3.6.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi 88
3.6.2. Antibakteriyel Aktivite 89

3.6.3. Antibiyofilm Aktivite 90
3.6.4. Anti-quorum Sensing Aktivite 91

4. TARTIŞMA 93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 104
ÖZET 112
SUMMARY 113
KAYNAKLAR 114
ÖZGEÇMİŞ 123

ÖNSÖZ

Türkiye, kekik türlerinin önemli bir ihracatçısı haline gelmiştir. İhraç edilen kekikler arasında *O. onites* %80 pazar payı ile ekonomik açıdan en önemli türlerden biri olarak değerlendirilmiştir. *O. onites* üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar değerlendirildiğinde önceki çalışmalarda daha çok uçucu yağ içerisindeki uçucu bileşenlerin kimyasal incelemelerinin gerçekleştirildiği, bitki üzerinden çeşitli solventlerle hazırlanan ekstrelerin ise yapılarının aydınlatılması ile ilgili fazla çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmada; *Origanum onites* L. bitkisi örnek olarak ele alınıp, bu bitkinin materyal olarak kullanıldığı ekstraksiyon ve distilasyon metotlarının algoritması ile üretim yöntemlerinin kalite üzerinde etkinliğinin araştırılarak bilime katkı sağlaması amaçlanmıştır.

Çalışmam boyunca tez konumun belirlenmesi ve çalışma sürecimin her aşamasında benden hiçbir yardımını esirgemeyen, emeğini, bilgisini ve tecrübesini aktaran, sabrını ve hoşgörüsünü gösteren değerli hocam Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana destek olan tüm anabilim dalı üyesi hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bitkiyi toplama aşamasında benden desteğini esirgemeyen Emine ESGİCİ ve Engin DAĞLI'ya tüm emekleri ve destekleri için çok teşekkür ederim. Tez aşamamda çalışmalarıma destek olan, fikri ve bilgisiyle bana yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yiğit İnan'a minnet duygumu sunar, teşekkür ederim.

Sevgili aileme her koşulda bana destek oldukları ve tüm başarılarımın arkasındaki en büyük etken oldukları için sonsuz teşekkür ve minnet duygumu sunarım. Hayatım boyunca her kararımda beni destekleyen nişanlım Dorukan DOĞAN'a ve en yakın arkadaşlarım Ufuk ATAMAN ve Süleyman ŞEKER'e zorlu sürecimde hep yanımda oldukları için tüm sevgilerimi gönderiyorum.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AEF	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
A549	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
BALB/c	İmmün Kompetan Deneysel Fare Modeli
β	Beta
5RP7	cH-ras Dönüştürülmüş Sıçan Embriyonik Fibroblast Hücreleri
BHT	Bütil Hidroksi Toluen
cm	Santimetre
CFU	Colony Forming Unit
CO_2	Karbondioksit
CT26	Murin Kolon Kanser Hücreleri
DAPI	4 ’, 6-Diamidino-2-fenilindol
dk	dakika
δ	Delta
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FID	Alev İyonlaştırma Dedektörü
γ	Gama
g	Gram
GC	Gaz Kromatografisi
GC-FID	Gaz Kromatografi Alev İyonlaşmalı Dedektör
GC-MS	Gaz Kromatografi- Kütle Spektrometresi
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
GTİP	Gümrük Tarife İstatistik Pozisyon
H_2O_2	Hidrojen peroksit
Hep G2	Hepatosellüler Karsinom Hücreleri
HPLC	High-performance liquid chromatography
HT-29	İnsan Kolon Kanser Hücre Hattı
HUVEC	İnsan Endotel Hücre Hattı
*I*A	Asit değeri

IC_{50}	%50 İnhibasyon konsantrasyonu
ITC	International Trade Centre
L	Litre
LC-TOF/MS	Sıvı kromatografisi- Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
LOD	Limit of Detection
KCC	Klasik tip Clevenger Cihazı
KOH	Potasyum hidroksit
M	Molar
m	Metre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MeOH	Metanol
MIA PaCa	İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MTT	3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
nm	Nanometre
ºC	Santigrat derece
p	Para
P_c	Kritik Basınç
PTFE	Politetrafloroeten
QOD	Quantification of Detection
R	Referans
R^2	Determinasyon Katsayısı
RATEC	Sıçan Yağ Dokusu Endotel Hücreleri
SRB	Sülforodamin B
UV	Ultraviyole
UYTC	Uçucu Yağ Tayin Cihazı
T_c	Kritik sıcaklık
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi

TÜBİVES	Türkiye Bitkileri Veri Servisi
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. *Origanum onites* L. 42
Şekil 2.2. *Origanum onites* L. Herbaryum Örneği 43
Şekil 2.3. Refraktometre 56
Şekil 2.4. Polarimetre 57
Şekil 2.5. Donma Noktası Tayin Aleti 58
Şekil 2.6. Asit değeri hesabı 59
Şekil 3.1. Bitkinin uçucu yağlarının, Anisaldehit muamelesi sonucunda görünür alanda TLC kromatogramı 69
Şekil 3.2. *O. onites* bitkisinin *n*-hekzan ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları 75
Şekil 3.3. *O. onites* bitkisinin etil asetat ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları 76
Şekil 3.4. *O. onites* bitkisinin metanol ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları 77
Şekil 3.5. Yabancı ester aranmasında çözeltilerle muamele edilmiş uçucu yağ 82
Şekil 3.6. Çözeltilerle muamele edilmiş uçucu yağın su banyosunda bekleme aşaması 82
Şekil 3.7. Yabancı ester aranması deney sonucu 82
Şekil 3.8. Uçurma artığı deneyi yapım aşaması 83
Şekil 3.9. *O. onites* uçucu yağlarının su banyosu üzerinde uçurulması 84
Şekil 3.10. *O. onites* uçucu yağlarının su banyosu üzerinde uçurulması 84
Şekil 3.11. Uçucu yağ numunesinin üzerine karbon disülfür *R* ilave edildiği an 85
Şekil 3.12. Uçucu yağlarda su aranması deney sonucu 85
Şekil 3.13. 1.0 mL uçucu yağın mezüre eklenmiş hali 86
Şekil 3.14. Uçucu yağın alkol ilavesiyle çözünmüş ve berrak hali 87
Şekil 3.15. Uçucu yağın alkol ilavesiyle 20 mL'ye tamamlanmış hali 87
Şekil 3.16. Mikroplakalar üzerindeki DPPH deney sonucu 89
Şekil 3.17. *O. onites*'in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerindeki antibiyofilm aktivitesi 91
Şekil 3.18. *O. onites*'in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 üzerindeki anti-quorum sensing aktivitesi (**1**: Avrupa hidrolat **2**: Normal hidrolat **3**: Avrupa yağ **4**: Normal yağ **5**: Etil asetatlı ekstre **6:** Metanollü ekstre **7:** *n*-Hekzanlı ekstre) **K:** LB Broth 92

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mate, çay, baharat ve kahvelerin ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$) 7
Çizelge 1.2. Reçine, bitki ekstreleri ve sakızların ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$) 7
Çizelge 1.3. Kozmetik, uçucu yağlar, parfüm ve diğer kişisel bakım ürünleri ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$) 7
Çizelge 2.1. HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi 1 49
Çizelge 2.2. HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi 2 50
Çizelge 3.1. *O. onites* L.'nin topraküstü kısımlarından uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri 66
Çizelge 3.2. *O. onites* L.'nin topraküstü kısımlarından Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri 67
Çizelge 3.3. Uçucu yağ tayin cihazı ve Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrofotometrisi analiz sonuçları 68
Çizelge 3.4. *O. onites*'den elde edilen ekstrelerin verimleri ve miktarları 70
Çizelge 3.5. Sikorik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 70
Çizelge 3.6. Sinamik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 71
Çizelge 3.7. Kersetine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 71
Çizelge 3.8. Naringenine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 71
Çizelge 3.9. Arbutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD 72
Çizelge 3.10. Rutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD 72
Çizelge 3.11. Hesperidine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 72
Çizelge 3.12. Karvakrole ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri 73
Çizelge 3.13. Timole ait doğru denklemi, r^2, LOD ve QOD değerleri 73
Çizelge 3.14. Standart fenolik bileşiklerin retansiyon zamanları 74
Çizelge 3.15. *O. onites* bitkisinin toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstrelerindeki fenolik madde konsantrasyonları (mg/L) 78
Çizelge 3.16. *O. onites* uçucu yağlarının bağıl yoğunluk değerleri 79
Çizelge 3.17. *O. onites* L. Uçucu Yağlarının Donma Noktası Değerleri 80
Çizelge 3.18. *O. onites* L. Uçucu Yağlarının Asit Değerleri 80
Çizelge 3.19. *O. onites* uçucu yağlarının peroksit değerleri 81
Çizelge 3.20. *O. onites* uçucu yağlarında uçurma artığı değerleri 83
Çizelge 3.21. *O. onites*'in topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan ekstre ve uçucu yağların DPPH yöntemi ile saptanan % inhibisyon değerleri 88
Çizelge 3.22. Bütillenmiş hidroksi toluen için konsantrasyon ve % inhibisyon değerleri 88
Çizelge 3.23. *O. onites* ekstrelerinin ve standart bileşiklerin MIC değerleri (µg/ml) 89
Çizelge 3.24. *O. onites* uçucu yağ, hidrolatları ve standart bileşiklerin MIC değerleri (µg/ml) 90
Çizelge 4.1. *O. onites*'in uçucu yağ ve ekstrelerinin verim, karvakrol ve timol oranlarının literatür verileriyle karşılaştırılması 95

1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze kadar insanlar birçok alanda bitkilerden faydalanmışlardır. Bitkiler, ısınma, beslenme, barıma, yaraları iyileştirmek ve hastalıkları tedavi etmek için asırlardır kullanılmaktadır (Göktaş ve Gıdık, 2019).

Modern tıbbın günümüz koşulları kadar ileri seviyede olmadığı zamanlarda, hastalıklarla karşı karşıya kalan uygarlıklar, bitkilerde ve mantarlarda çok sayıda yararlı terapötik ajan keşfetmiş ve iyileşmek amacıyla bunlardan yararlanmışlardır. (Cock, 2011).

Türkiye, coğrafi yapısı nedeniyle birçok bitki türünün yetişmesi için verimli bir ülkedir. Bunun yanında, tıbbi ve aromatik bitkilerin ihracat potansiyeli yüksek olarak değerlendirilmekle birlikte, Türkiye'nin ihracatta istenilen seviyeye henüz ulaşılmadığı da bir gerçektir (Bayraktar ve ark, 2017).

Ülkemizde bitkisel ürünlerin "tamamen bitkisel", " yan etkisi yok", "tamamen doğal" gibi sloganlarla satılmasının toplum sağlığı açısından çok ciddi risk oluşturduğu belirtilmiştir (Ersöz, 2012). Sorunun temelinin milyonlarca insanın bitkilere güvenmesi ve bu güven sonucu bitkilerin bilinçsizce yaygın bir şekilde kullanımının olduğuna değinilmiştir. Bitkisel kaynaklı ürünler doğal olduklarından dolayı toplum tarafından sıklıkla güvenli olarak algılansa da doğal olanın her zaman güvenli olduğuna dair görüşlerin yanlış olduğu bilinmektedir. Bitkiler potansiyel olarak biyoaktif maddeler içermektedirler. Pek çok bitkide bu biyoaktif bileşenlerin organizma üzerinde toksik etkilerinin olduğu saptanmıştır (Şarışen ve Çalışkan, 2005). Sonuç olarak bitkisel ilaç kapsamına giren preparatların etkinlik ve içeriklerinin bilimsel açıdan kanıtlanmış olması; doz-etki ilişkilerinin ve doza bağlı etki farklılıklarının açıklanması; konvansiyonel ilaçlarla olan etkileşimlerinin tespit

edilmesi ve bu preparatların standardize edilmiş farmasötik formlar halinde piyasaya verilmiş olmaları gerektiği belirlenmiştir (Ersöz, 2012).

Tıbbi ve aromatik bitkiler kapsamında çok sayıda bitkinin yer alması, bu bitkilerin keskin bir sınırla belirlenip sınıflandırılmasına engel olarak görülmektedir. Bu sebeple dış satım cetvellerinde tıbbi ve aromatik bitkileri özel olarak kapsayan bir Gümrük Tarife İstatistik Pozisyon (GTİP) bulunmadığı bildirilmiştir (Kurt ve İmren, 2018). Bununla birlikte; GTİP'ye göre Bölüm 2 kısmında 6-14 numaralı fasılları içeren Bitkisel Ürünler başlığı altında kodlar oluşturulmuştur. Fasıl 12 içerisinde, parfümeride, eczacılıkta, böcek ya da mantar öldürücü veya benzer amaçlarla kullanılan cinsten olanlar şeklinde bitki ve bitki kısımlarını içeren 12.11 numara ile başlayan kodlar oluşturulmuştur (Gümrük G.T.İ.P Bölüm Başlıkları, 2022).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin standardizasyonunun sağlanması ve uygun şekilde değerlendirilmesi ile katma değeri artacak, Türkiye'nin ihracat miktarını da artıracaktır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin işlenmesi ve paketlenmesi için gerekli tesislerde kullanılacak cihaz ve makinelerin ülkemizde üretilmesi ya da yurtdışından sağlanması ile, bu bitkiler aracılığıyla ekonomide iyileşme sağlanması gerektiği vurgulanmıştır (Bayraktar ve ark, 2017).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin asırlardır, gerek tıbbi gıda olarak gerekse tıbbi uygulamalarda kullanıldığı ve öneminin giderek arttığı bilinmektedir. Bu bitkilerin yaprak, kök, meyve ve çiçek gibi bölümlerinden elde edilen bileşenlerin güncel olarak kullanılan birçok ilacın ana etken maddesini oluşturduğu görülmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkiler sadece tedavi amaçlı olarak değil, ayrıca uçucu yağlar, kozmetik preparatlar, boyar maddeler, bitki koruma ürünleri ve bu ürünler üzerinden üretimi sağlanan ara basamak ürünleri gibi pek çok ürünün üretiminde faydalanılan doğal kaynaklar olarak bildirilmiştir (Gül ve Çelik, 2016).

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından itibaren işlenmiş gıdaların ortaya çıkmasıyla birlikte, gıda endüstrisine bitkisel kaynaklı birçok katkı maddesi tanıtılmaya başlanmıştır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin bazıları güçlü antimikrobiyal

(bakterisidal ve fungisidal) özellik taşımalarından ötürü taze sebze veya et ürünleri ve konserve ürünler için gıda katkı maddesi olarak kullanımı açısından oldukça değerlidirler (Ghorbanpour ve ark, 2017).

Tıbbi aromatik bitkiler baharat olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadır (Göktaş ve Gıdık, 2019). Baharatlar, lezzetleri ve spesifik özellikleri sayesinde geçmişten günümüze hem mutfakta hem de tıbbi amaçla oldukça yaygın kullanım alanına sahiptirler (De La Torre Torres ve ark., 2017).

Son dönemlerde insanların doğal kaynaklı ürünlere yöneliminin giderek arttığı görülmektedir. Kozmetik sektörününde de bu talebi karşılamak amacıyla bitkisel kaynaklı kozmetik ürünlerin üretiminin arttırılması yönünde çalışmalar giderek hız kazanmaktadır (Polat, 2019). Kozmetik ürünlerin içerisinde aromatik sular, reçineler, tentürler, mumlar, usareler, uçucu yağlar, müsilajlar, zamk ve benzerleri, lipitler, sulu ekstreler, distilasyon ürünleri, bitkiler, saflaştırılmış bitki bileşenleri bitki ekstreleri, bitkisel yağlar bulunabilmektedir (Yapar, 2018). Örneğin *Aloe vera* hemoroit ağrılarının dindirilmesinde, güneş yanıklarının iyileştirilmesinde, yara ve yanıkların tedavisinde, nemlendirme amaçlı saç ve vücut bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Shivanand ve ark., 2010).

Bitkiler çeşitli bileşik grupları açısından oldukça zengindirler ve içerdikleri bileşiklerin büyük bir bölümü sekonder metabolitlerden oluşmaktadır. Bitkilerin içerdiği aromatik bileşiklerin çoğunluğu ise, fenollerden veya tanen gibi oksijen içerikli yapılardan oluşmaktadır. Etnobotanik çalışmaların sadece bitki bileşenleri doğrudan terapötik ajan olarak kullanıldığında değil, aynı zamanda ilaçların sentezi için başlangıç maddesi veya farmakolojik olarak aktif bileşikler için model olarak kullanıldığında, farmakolojik araştırma ve geliştirme açısından önem kazanacağı düşünülmektedir. Yaklaşık 200 yıl önce, farmakolojik olarak aktif ve saf bileşik olan morfin *Papaver somniferum* bitkisinden elde edilen Opium'dan izole edilmiştir. Bu keşif bitkisel kökenli ilaçların ve etkin maddelerin saflaştırılabileceğini göstermiştir. Bu yaklaşımın penisilinin keşfi ile güçlendirildiği bildirilmiştir. Zaman içerisinde bitkilerden ve doğal kaynaklardan elde edilen ürünlerin veya bunlardan ilham alan

anologların günümüzde ticari ilaç preparatlarının gelişimine büyük katkı sağladığı düşünülmektedir (Benzie ve Galor, 2010).

Bitkisel kaynaklı ilaçların günümüzde uygulanan modern fitoterapide geleneksel bitkisel tıbbi ürünler ve yaygın kullanılan bitkisel ilaçlar olarak iki kategoride değerlendirildiği bilinmektedir. Buna göre; Tıbbi kullanım açısından uzun bir geçmiş ve bibliyografik veriye sahip olan, etkinlikleri klinik olarak kanıtlanmamış ürünler Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler olarak tanımlanırken ikinci kategoride yer alan Yaygın Kullanılan Bitkisel İlaçlar ise etkinlikleri bibliyografik klinik verilerle kanıtlanmış olan bitkisel ilaçlar olarak tanımlanmışlardır (Saltan ve Erdem, 2019).

Dünya genelinde yaklaşık 32.000 bitki türünün olduğu bildirilmişken, Türkiye'de bulunan toplam tür ve tür altı takson sayısı, yabancı kaynaklı ve kültür bitkileri dahil 11.707, endemik takson sayısı 3.649 olarak belirtilmiştir. Endemizm oranı ise %31,82 olarak bildirilmiştir (Acıbuca ve Budak, 2018).

Bitkisel ilaçların standardizasyonun, bir kalite, etkinlik, güvenlik ve tekrarlanabilirlik güvencesi taşıyan bir dizi standartları, sabit parametreleri, kesin niteliksel ve niceliksel değerleri belirleme süreçlerini kapsadığı saptanmıştır (Folashade ve ark., 2012). Bitkisel ilaçlarda kalite ve standardizasyonun ilk olarak bitkinin yetiştirilmeye başladığı zamandan itibaren önemli olduğu bildirilmiştir (Dişli ve Yeşilada, 2019). Hasat, kurutma, depolama, taşıma ve işleme yöntemleri (örneğin, ekstraksiyon çözücüsünün seçimi, ekstraksiyon methodu, çözücünün polaritesi,vb.) gibi faktörlerin bitkisel kaliteyi etkilediği bildirilmiştir (Folashade ve ark., 2012). Gerçekleştirilen tıbbi ve aromatik bitki ihracatının çoğunluğu ham ürünlerden oluştuğu için, bu sektörde ülkemizin ekonomisine yeterince faydalı olmamaktadır. Sektördeki eksikliği giderebilmek için işlenmiş ve paketlenmiş tıbbi ve aromatik bitki ihracatına yönelik iyileştirici çalışmaların arttırılması gerektiği bildirilmiştir (Metin, Güngör ve Çolak, 2012).

Aromatik ekstreler ve uçucu yağlar; endüstride farklı alanlarda değerlendirilmektedir. Parfüm, temizlik ürünleri, kozmetik ürünler ve ilaçların

bileşiminde, gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımı açısından çeşitli sektörlerde yer aldığı bilinmektedir (Temel ve ark, 2018).

Uçucu yağların ve bitkisel ekstrelerin işlenmemiş halde ki tıbbi ve aromatik bitkilere göre katma değerinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda işlenmemiş tıbbi ve aromatik ürünler yerine standardize edilmiş uçucu yağ ve bitkisel ürünlerin ihracatına ağırlık verilmesi ülkemizin kalkınmasına fayda sağlayacaktır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin işlenmesi için gerekli tesislerin kurulması hemen gerçekleştirilebilecek bir uygulama değildir. Ülkemizdeki tesislerin bu bağlamda sayı ve işlevsellik açısından yetersiz kaldığı görülmektedir. Sektörde lokomotif güç olan tıbbi ve aromatik bitkilerin ham maddeden işlenmiş hale gelmesi konusunda sanayinin desteklenmesinin ve geliştirilmesinin günümüz koşullarında zorunluluk olduğu belirtilmiştir (Temel ve ark, 2018).

Dünya genelinde günümüz koşullarında tıbbi ve aromatik bitkilerin kalite standardı giderek önem kazanmaktadır. Kalite standartları kontrolleri yapılırken hem temel hem de spesifik araştırmalara yer verilmelidir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin pazar potansiyelini arttırmak ve bunun devamlılığının sağlanabilmesi için ürünler istenilen miktar ve kalitede olmalıdır. Bitkilerin yetiştirilmesi için elverişli ortamın sağlanmasının, bitkilerin hasat zamanının en doğru ve bitkiye spesifik olarak belirlenmesinin, hasat sonrası yapılacak işlemlerin uygunluğunun ve sıralamasının değerlendirilmesinin, işleme teknolojisinin belirlenmesi tıbbi ve aromatik bitkilerde üretim, pazar ve ihracat olanaklarının artmasına katkı sağlayacağı belirtilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin ekim alanlarının yaygınlaştırılması açısından yüksek potansiyele sahip olmaları, gıda endüstrisine hammadde olma özellikleri ve son yıllarda iyice yaygınlaşan geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamalarında kullanılmaları açısından git gide önem kazandığı bildirilmiştir. Bunun yanında ülke ekonomisine ve yetişme ortamındaki bölge halkına maddi kazanç sağlayarak tarımsal üretim bakımından değerli oldukları bilinmektedir (Bağdat, 2006).

Türkiye'de Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Daire Başkanlığı 2014 yılından beri Sağlık Bakanlığı bünyesinde faaliyetlerini sürdürmektedir. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği 29158 sayı ve 27 Ekim 2014 tarihli Resmi Gazete'de yayınlanmıştır (Şahin, 2017).

Yönetmeliğe göre uygulama merkezlerinde yapılabilecek geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları 15 başlık altında sınıflandırılmıştır (Akupunktur, Sülük uygulamaları, Kupa uygulaması, Mezoterapi, Karyopraktik, Ozon uygulaması, Larva uygulaması, Hipnoz, Fitoterapi, Homeopati, Osteopati, Proloterapi, Apiterapi, Refleksoloji ve Müzik Terapi) (Resmi Gazete, 2022).

Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin çoğu genellikle doğadan ve arazilerden toplanarak elde edilmektedir. Bu durumdan ötürü doğru istatistiki verilerin kayıtlara geçmesi güç olmaktadır. Tıbbı ve aromatik bitkilerin kapsadığı ürünler içerisinde baharat ve çeşni sıfına giren çok sayıda bitkinin yer alması söz konusu bitkilerin kavramsal olarak kesin şekilde ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Bu durumdan kaynaklı olarak dış satım cetvellerinde Tıbbi ve aromatik bitkileri özel olarak kapsayan Gümrük Tarife İstatistik Pozisyon (GTİP) numaraları bulunmamaktadır (Kurt ve İmren, 2018).

"International Trade Centre" (ITC)'ye göre tıbbi ve aromatik bitkiler kapsamında ürünlerin dış ticaret istatistikleri 3 temel başlık ile değerlendirilmektedir.

1 -Kahve, baharat, çay ve mate sınıfında; kırmızı biberler, kakule, küçük hindistan cevizi, rezene, zerdeçal, defne, vanilya, anason, biber, çay, kimyon, zencefil, kahve, yıldız anasonu, tarçın ağacı çiçekleri, kekik, köri ve safran bulunmaktadır.

2 -Reçine, sakız, bitki ekstreleri, bitki suları sınıfında; haşhaş, şerbetçi otu, arap zamkı, pire otu, Aloe vera ekstreleri, meyan kökü bulunmaktadır.

3-Kozmetik, uçucu yağlar, parfüm ve diğer kişisel bakım ürünleri sınıfında; uçucu yağlar, terpenik maddeler, rezinoitler, parfüm, diş ve saç preparatları gibi kişisel bakım ürünleri içerisinde kullanılan maddeler bulunmaktadır.

Çizelge 1.1. Mate, çay, baharat ve kahvelerin ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$)

No	Ülkeler	2018	2019	2020	Payı (%)	Değişim (%)
1	USA	22,656	21,486	58,825	22,93	159,64
2	Almanya	19,408	16,886	21,010	8,19	8,25
3	Suriye	3,407	2,404	13,718	5,35	302,64
4	UK	3,448	3,778	12,408	4,84	259,86
5	Fransa	6,058	5,109	10,938	4,26	80,55
6	Hollanda	7,166	7,803	10,689	4,17	49,16
7	Çin	177	3,444	9,186	3,58	5089,83
8	Belçika	3,856	6,821	8,915	3,47	131,20
9	Suudi Arabistan	5,364	4,808	8,213	3,20	53,11
10	Kanada	2,193	2,165	7,784	3,03	254,94
	Dünya	180,685	168,349	256,521	100,00	41,97

Kaynak: ITC,2021.

Çizelge 1.2. Reçine, bitki ekstreleri ve sakızların ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$)

No	Ülkeler	2018	2019	2020	Payı (%)	Değişim (%)
1	Almanya	3,418	2,960	6,922	23,94	102,52
2	Çin	1,986	2,573	4,602	15,91	131,72
3	İtalya	2,685	3,188	2,988	10,33	11,28
4	Kore Cumhuriyeti	1,137	1,457	2,087	71,18	83,55
5	Fransa	261	848	1,577	5,45	504,21
6	Malezya	916	927	1,386	4,79	51,31
7	İran	212	600	1,232	4,26	481,13
8	Hong Kong, Çin	731	991	1,001	3,46	36,94
9	Rusya	249	751	949	3,28	281,12
10	Japonya	541	203	816	2,82	50,83
	Toplam	16,387	18,486	28,919	100,00	76,47

Kaynak: ITC,2021.

Çizelge 1.3. Kozmetik, uçucu yağlar, parfüm ve diğer kişisel bakım ürünleri ülke ve yıllara göre Türkiye ihracatı (1.000$)

No	Ülkeler	2018	2019	2020	Payı (%)	Değişim (%)
1	Irak	74,077	70,792	103,047	10,83	39,10
2	USA	13,842	33,773	82,250	8,64	494,20
3	Hollanda	25,497	28,112	53,438	5,62	109,58
4	İran	64,585	54,784	49,604	5,21	23,19
5	Rusya	28,566	42,399	40,657	4,27	42,32
6	Almanya	37,428	29,183	38,787	4,07	3,63
7	Birleşik Arap Emirlikleri	26,051	37,123	36,353	3,82	39,54
8	Suudi Arabistan	29,230	33,025	32,411	3,40	10,88
9	Azerbaycan	13,871	16,483	29,545	3,10	112,99
10	UK	39,658	29,652	25,894	2,72	34,70
	Toplam	782,920	829,406	951,432	100,00	21,52

Kaynak: ITC, 2021.

Türkiye'nin kahve, çay, mate ve baharatların ihracatı 2018 yılında 180,6 milyon dolardan 2020 yılı sonu itibariyle 256,5 milyon dolar olarak kayıtlara geçmiştir. Bu ürün sınıfının ihracatında dünya genelinde ilk sıralarda Brezilya, Almanya, Vietnam, Hindistan ve Çin almaktadır. Türkiye 2019 yılı verilerine göre 168,3 milyon dolar ihracatla 38. Sırayı almaktadır.

Türkiye'nin reçine, bitki ekstreleri, sakız ihracatı 2018 yılında 16,3 milyon dolardan 2020 yılında artarak 28,9 milyon dolar olarak kayıtlara geçmiştir. Bu ürünlerin ihracatında dünya genelinde ilk sıralarda Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan, Çin, Fransa ve Almanya bulunmaktadır. Türkiye 2019 yılı verilerine göre 18,4 milyon dolar ihracatla 40. olarak yer almıştır.

Türkiye'nin parfüm, kozmetik, uçucu yağlar ve diğer kişisel bakım ürünlerinin ihracatı 2018 yılında 782,9 milyon dolardan 2020 yılı sonu itibariyle 951,4 milyon dolara yükselmiştir. Bu ürün sınıfı ihracatında dünya genelinde ilk sıralarda Fransa, Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Singapur ve İrlanda almaktadır. Türkiye 2019 yıl sonu verilerine göre 829,4 milyon dolar ihracatla 24. Sırayı almaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin dünya genelinde ticaret hacminin sürekli olarak artmakta olduğu sayısal veriler ile desteklenmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin International Trade Center (ITC)' a göre 3 alt grubunun içerisinde bulunan parfüm, uçucu yağlar, kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ithalatının toplam ithalatın yarıdan fazlasını oluşturduğu belirlenmiştir (Temel ve ark., 2018).

International Trade Center (ITC)'ın 2020 yılı verilerine göre Türkiye'nin kahve, çay, mate ve baharatlar ithalatı 343,7 milyon dolarken ihracatı 256,5 milyon dolar olarak saptanmıştır. Verilere göre; dış ticaret dengesine bakıldığında 87,2 milyon dolar ile kahve, çay, mate ve baharatlar ürün grubunda dış ticaret açığı olduğu söylenebilir.

International Trade Center (ITC)'ın 2020 yılı verilerine göre Türkiye'nin sakız, reçine, bitki özsu ve ekstrelerinin ithalatı 59,9 milyon dolarken ihracatı 28,91 milyon dolar olarak saptanmıştır. Verilere göre; dış ticaret dengesine bakıldığında 31,0 milyon dolar ile sakız, reçine, bitki özsu ve ekstreleri ürün grubunda dış ticaret açığı olduğu söylenebilir.

International Trade Center (ITC)'ın 2020 yılı verilerine göre Türkiye'nin uçucu yağlar, parfüm, kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ithalatı 1,1 milyar dolarken ihracatı 951,4 milyon dolar olarak saptanmıştır. Verilere göre; dış ticaret dengesine bakıldığında 207,6 milyon dolar ile uçucu yağlar, parfüm, kozmetik, diğer kişisel bakım ürünleri grubunda dış ticaret açığı olduğu söylenebilir.

Türkiye'nin dış ticaretteki açığının azaltılması için ilk olarak yapılması gerekenin, ithal edilen tıbbi ve aromatik bitkilerin ana ürün sınıflarında katma değeri yüksek olan ve dış ticaretteki açığının artmasına sebep olan ürünlerin belirlenmesi ve bu ürünlere gereken yatırımların yapılması olarak vurgulanmıştır (Ketboğa,2019).

Lamiaceae familyası ülkemizde yetişen bitki türlerinin çeşitliliği açısından 3. büyük familya olarak kayıtlara geçmiştir. Lamiaceae familyasına ait 550 türün ülkemiz topraklarında doğal olarak yetişmekte olduğu tespit edilmiştir. Bu familyaya ait türlerin tıp, eczacılık, parfümeri, kozmetik, gıda gibi sektörlerde çeşitli şekillerde değerlendirilme potansiyellerinin yüksek olması sebebiyle önemli oldukları vurgulanmıştır. Kekik bitkisi Lamiaceae familyasının içerisinde bulunan en önemli bitkilerden birisi olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde kekik bitkisine ait beş cins bulunduğu kayıtlara geçmiştir. Bu cinsler *Origanum*, *Thymus*, *Tymbra*, *Satureja* ve *Coridothymus* cinsleri olarak bilinmektedir (Bozdemir, 2019).

Türkiye, kekik türlerinin önemli bir ihracatçısı haline gelmiştir. İhraç edilen kekikler arasında *O. onites* %80 pazar payı ile ekonomik açıdan en önemli türlerden biri olarak değerlendirilmiştir. *O. onites*'in yaprakları, çiğ veya pişmiş, salata sosları, sebzeler ve baklagiller için tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. *O. onites*'in vejetatif

kısımları ve bunların biyokimyasal ekstreleri gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *O. onites*'in uçucu yağı, antibakteriyel, antioksidan, mantar önleyici, sitotoksik, böcek öldürücü ve nematosit özellikleri taşımaktadır (Ayanoğlu, Ergül ve Arslan, 2006).

Tıbbi ve aromatik bitkiler, tarihsel süreç içerisinde yüzyıllardan beri insanların günlük hayatlarında sıklıkla faydalandıkları ve kültürel açıdan birikim sağladıkları bir unsur haline gelmiştir. Hastalıklara karşı koruyucu olarak ve hastalık sonrasın semptomların hafifletilmesinde başvurulan ilk kaynak olarak, tıbbi ve aromatik bitkiler, Dünyadaki insanların ortalama %80'i tarafından kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin pazar payının insanların sağlık konusunda giderek bilinçlenmesi ve bilgilenmesi sebebiyle gün geçtikçe artmakta olduğu kayıtlara geçmiştir. Bu bitkilerin kullanımlarının yaygınlaşmasıyla, sağlık açısından daha faydalı ve güvenli hale gelebilmeleri için kalite kriterlerinin belirli sınırlar çerçevesinde olması dolayısıyla standardizasyon sağlanması gerekli görülmektedir (Varlı, Hancı ve Kalafat, 2020).

Hidrosoller veya damıtılmış sular olarak da adlandırılan hidrolatlar, aromatik suların yanı sıra uçucu yağlarla aynı izolasyon prosesinde buhar distilasyonu ile üretilmektedir (Aćimović ve ark., 2020).

Son yıllarda aromatik bitkilerin distilasyonundan elde edilen doğal ürünler olan uçucu yağlar ve hidrolatlara giderek artan bir ilgi vardır. Uçucu yağların, antimikrobiyal, immünomodülatör, antioksidan, antienflamatuar, ağrı kesici, vb., etkinlikleri hakkında birçok bilimsel makale olmasına rağmen hidrolatların biyolojik etkinliği konusunda çok az kanıt vardır. Farmakopelerde tanımlanan uçucu yağlar; buharla distilasyon, hidrodistilasyon veya bir bitkinin kuru distilasyonuyla elde edilen bazen de bazı parçaları veya uygun mekanik soğuk sıkım işlemleriyle elde edilen kokulu bir ürün olarak kabul edilirler. Benzer şekilde, 2012 yılından itibaren Fransız Farmakopesi, hidrolatları tanımlamış ve hidrolatı; aromatik bitkilerin farklı kısımlarının damıtılmasıyla elde edilen, damıtma sonunda uçucu yağdan ayrılan bir ürün olarak bildirmiştir (Di Vito ve ark., 2021).

Aynı işlemler sonucunda oluşan ürünler olsalar da, iki distilasyon ürünü kimyasal bileşim ve etkinlik açısından oldukça farklıdır. Uçucu yağlar, esas olarak terpen molekülleri ile karakterize edilen hidrofobik karışımlardır, ancak hidrolatlarda aşırı derecede seyreltik halde bulunmaktadırlar. Hidrolatlar ise; ilgili uçucu yağlarda bulunan terpenik bileşenlerin maksimum 1 g/L'ye kadar bulunduğu hidrofilik çözeltilerdir. Birçok terpenik bileşiğinin toksisitesinin yüksek olması nedeniyle, uçucu yağlar, oral yolla kullanımda veya topikal uygulamalarda özel uyarılar gerektirir. Terpenik çözeltilerin seyreltilmesi sonucu oluşan hidrolatlar ise daha az toksiktir ve aynı uygulamalar için daha kolay kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir (Di Vito ve ark., 2021).

1.1. Botanik Bilgiler

1.1.1. *Origanum onites* L. Bitkisinin Sistematikteki Yeri

Origanum onites'in TÜBİVES (Türkiye Bitkileri Veri Servisi) kayıtlarına göre sistematik olarak sınıflandırılması:

Alem	: Plantae
Alt Alem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Lamiales
Aile	: Lamiaceae
Cins	: *Origanum*
Tür	: *Origanum onites* L. (Tübives, 2021).

1.1.2. Lamiaceae Familyasının Özellikleri

Lamiaceae familyası asırlardan beri tıbbi ve aromatik bir bitki olarak değerlendirilen ve çoğunluğu Akdeniz Bölgesi'nde yayılış gösteren çok sayıda türe sahiptir (Ulcay ve Şenel, 2018). Lamiaceae (eski adıyla Labiatae), 258 cins ve 6000'den fazla tür ile Lamiales takımına dahil olarak, tıbbi ve aromatik bitkiler açısından çok önemli ailedir. Familyaya ait türlerin çoğu tıbbi ve aromatik bitki olarak sınıflandırılmaktadır ve özellikle uçucu yağ taşıyan türler kozmetik, parfümeri, gıda, tarım gibi sektörlerde ve tıp uygulamalarında oldukça değerlidirler. *Lamiaceae* türlerinin ekmek ve unlu mamüllerin korunması için antimikrobiyal ajan olarak kullanımı da bildirilmiştir (Valerio ve ark., 2021).

Lamiaceae familyası hermafrodit bazen ginodoik, aromatik eterik yağ üreten kısa saplı glandular tüylü otsu bitkiler, çalılar ya da nadiren ağaçlardan oluşur. Gövdeleri özellikle gençken genelde 4 köşeli olarak bulunmaktadır. Çiçeklenme durumu bir vertisillatta lateral simöz, tirşe ya da tek çiçekli aksillar çiçek olarak kayıtlara geçmişitir. Yapraklar, stipulasız, bazen dairesel dizilişli, karşılıklı, basit yapraklardır. Çiçekler genelde zigomorf, iki eşeyli, brakte ve brakteollü, hipogindir. Periant iki sıralı diklamid; korolla genellikle bilabiat, bazen aktinomorf ve hipantiumu yoktur. Kaliks sinsepal 5 zigomorf, bazen bilabiat lobludur. Korolla simpetal, 4 ya da 5 loblu. Stamenler 2, 4 ya da 2 verimli +2 staminodlu, dairesel, epipetaldir. Nektaryumlar ovaryum tabanında bir disk ya da yastık şeklindedir. Meyve genellikle, 4 nutletli şizokarp, drupa ya da üzümsüdür. Bitki çoğunlukla eterik yağ ve karbonhidrat stakis içerir (Simpson, 2019).

Lamiaceae familyası, 4 köşe gövdeli, karşılıklı yapraklı, çiçeklenme durumunun vertisillat ya da tirşe, çiçeklerin zigomorf, bilabiat, genellikle üst durumlu ovaryumlu; derin 4 loblu, ginobazik stiluslu; genellikle 4 nutletli şizokarp, üzümsü ya da drupa meyveli aromatik eterik yağlı otsu bitkiler ya da çalılardan olması ile ayırt edilirler (Simpson, 2019).

1.1.3. *Origanum* Cinsinin Botanik Özellikleri

Yarı çalımsı ya da çok yıllık otsu, tüylü ya da çıplak bitkiler. Gövde birkaç tane, dik veya yükselici, genellikle dallanmış, yapraklar hemen hemen sapsız ya da az çok saplı, lamina eliptik, ovat, kordat veya küremsi, kenarı tam ya da az çok dişli, tepesi obtus veya akuminat. Yalancı vertisillat 2 veya birkaç çiçekli olup spikulalar halinde toplanmış, spikulalarda genellikle panikula veya yalancı korimbus şeklinde. Brakteler şekil ve büyüklük bakımından yapraklardan daima farklı ve genellikle imbrikat. Çiçekler hermafrodit veya ginodioik. Kaliks değişken, az çok aktinomorf ve 5 dişli, veya zigomorf ve 1-2 dudaklı, 13 ya da yaklaşık 10 damarlı, boğazı genellikle halka şeklinde tüylü. Korolla mor, pembe veya beyaz, az çok eşit 2 dudaklı. Stamen 4, alttaki çift daha uzun. Nukslar küçük, ovoid ve kahverengi (Davis,1970).

1.1.4. *Origanum onites* L. Bitkisinin Botanik Özellikleri

Bitki genel yapı olarak yarı çalımsıdır. Kökler 1.5 cm çapına kadar genişlikte iken, genç sürgünler hirsut tüylüdür. Gövdeler dik-yaslanıcı, bazen tabanda dallanmış, 50-120 cm kadar uzunlukta, açık kahverengi, hirsut ve glandular pilos tüylüdür. İlk sıra dallar gövdenin 1/5 lik üst kısmından başlar. 8-10 çift, 1.0-8.0 cm uzunluğundadır. Yapraklar her gövde için 25-30 çift, en alt yapraklar kısa petiolatlı, kordat, ovat veya oval şeklinde, uçtakiler az çok akut veya akuminat, 3-22 x 2-20 mm, hirsut ve glandular pilos tüylü, peltat salgı tüyleri 1300-1500/cm2'dir . Spikalar yalancı korimbus üzerinde dizilmiş, glabros, ovoid veya dört köşeli silindirik ve 3-16 x 2-4 mm'dir. Brakteler her spikada 4-30 çift, ovat, oval veya obovat, uçtakiler akut, akuminat veya obtuz, tam, 2-5 x 1-3 mm, açık yeşil, dış yüz tomentos tüylüdür. Kaliks 1 dudaklı, 2-3 mm, ovat, obovat veya biraz romboid, dış yüz pilosellos; üst dudak tam veya dentikulattır. Korolla 2 dudaklı, 3-7 mm, beyaz, dış yüz biraz pilosellos; üst dudak 2 loblu, 0.2 mm; alt dudak 3 eşit loblu, 1-2 mm boyutunda loblardır. Stamenler dışa taşmış; filamentler 4-5 mm boyutundadır. Stil 10 mm uzunluğa kadar erişebilir. Çiçeklenme zamanı 5.-8. Aylardır (Temel ve Tokur, 2013).

1.2. *Origanum onites* L. Üzerinde Yapılan Çalışmalar

1.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

O. onites üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar değerlendirildiğinde önceki çalışmalarda daha çok uçucu yağ içerisindeki uçucu bileşenlerin kimyasal incelemelerinin gerçekleştirildiği, bitki üzerinden çeşitli solventlerle hazırlanan ekstrelerin ise yapılarının aydınlatılması ile ilgili fazla çalışma yapılmadığı görülmektedir. Bitkinin uçucu bileşenleri ve uçucu olmayan bileşenleri ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıdaki şekilde derlenmiştir.

1.2.1.1. *Origanum onites*'in Uçucu Bileşenleri

Türkiye'de yapılan bir çalışmada; *O. onites*'in toprak üstü kısımları Balıkesir'in Edremit ilçesinden Temmuz ayında toplanmıştır. Taze yapraklar ve çiçekler gölgede kurutulmuş, küçük parçalar halinde öğütülerek, 4 saat boyunca Clevenger tipi bir aparatla hidrodistilasyona tabi tutulmuştur. Uçucu yağların verimleri yaprak ve çiçekten sırasıyla %1,75 ve %4,25 olarak hesaplanmıştır. Üretilen uçucu yağlar daha sonra incelenmek üzere için amber renkli şişelerde 4°C'de saklanmıştır. GC-MS analizleri, Thermo Scientific TSQ GC-MS/MS cihazı üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre; çiçeklerden (%4,25) yaprak uçucu yağına (%1,75) göre daha fazla uçucu yağ verimi elde edilmiştir. Toplamda yaprak uçucu yağının %99,9'unu temsil eden yirmi üç bileşik ve çiçek uçucu yağının %99,6'sını oluşturan yirmi dört bileşik belirlenmiştir. Elde edilen uçucu yağların bileşenleri kimyasal yapılarına göre, oksijenli monoterpenler, monoterpen hidrokarbonlar, oksijenli seskiterpenler ve seskiterpen hidrokarbonlar olarak 4 ana başlık altında değerlendirilmiştir. Yaprak uçucu yağının ana bileşenleri karvakrol (%64,5), *p*-simen (%11,2) ve (E)-*β*-osimen (%9,1) olarak bulunmuşken, çiçeklerden elde edilen uçucu yağda ana bileşikler olarak *α*-kubeben (%36,4), *δ*-elemen (%34,6) ve karvakrol (%16,0) belirlenmiştir. Yapraklardan elde edilen uçucu yağda, hidrokarbonlar (%27,4) ve bunların oksijenli türevleri (%69,2) dahil olmak üzere yüksek monoterpen içeriği

(%96,6) ile nitelendirilirken, seskiterpenler (%3,3) olarak çok düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Çiçek uçucu yağında, seskiterpen hidrokarbonlar (%73,5) *α*-kubeben (%36,4) ve *δ*-elemen (%34,6) ile belirlenen birincil bileşik sınıfını oluşturmuştur. Oksijenli monoterpenler ve monoterpen hidrokarbonlar da çiçek esansiyel yağında ortalama yüzdede tespit edilmiştir (Özer, 2020).

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde yapılan bir çalışmada; *O. onites* bitkisi Fakülte içerisinde yetiştirilmiştir. Uçucu yağ, bitkinin yaprak, çiçek ve dallarının karışımından hidrodistilasyon ile elde edilmiştir. 40 g bitki, 1000 mL su ilave edilerek Clevenger tipi aparatta 4 saat distilasyona bırakılmıştır. Elde edilen yağ, susuz sodyum sülfat üzerine ilave edilerek kurutulmuş ve analizden önceki zamana kadar 4 °C'de amberli şişede saklanmıştır. *O. onites* uçucu yağın GC-MS analizi, yağın %95'inden fazlasını temsil eden 22 ila 24 arasında değişen uçucu bileşiklerin varlığını kanıtlamıştır. *O. onites* uçucu yağının ana bileşenleri timol, *p*-simen, γ-terpinen, ve karvakrol olarak belirlenmiştir. Birçok çalışma, *O. onites*'in karakteristik bileşeninin karvakrol olduğunu bildirmiştir fakat bu çalışmada, *O. onites*'in timol açısından zengin olduğu bulunmuştur. Monoterpen hidrokarbonlar olarak; *α*- tüyon, kamfen, *α*-felandren, *β*-pinen, *α*-pinen, sabinen, *β*-mirsen, *α*-terpinen, *dl*-limonen, *p*-simen, Trans-*β*-osimen, *γ*-terpinen, *α*-terpineol bileşikleri tespit edilmiştir. Oksijenlenmiş moneterpenler olarak; cis-sabinen hidrat, 4-terpineol, borneol bileşikleri tespit edilmiştir. Fenolik yapı olarak; timol, karvakrol ve timol asetat bileşikleri bulunmuştur. Seskiterpen hidrokarbonlar olarak ise; bisikloelemen, karyofillen, *α*-humulen, *β*-bisabolen, Δ-kadinen bileşiklerinin varlığı kanıtlanmıştır (Özdemir ve ark., 2018).

O. onites'in uçucu yağının, *Amblyomma americanum* L. ve *Aedes aegypti*'ye L. karşı kovucu aktivite için gerçekleştirilen bir çalışmada; uçucu yağın yapısı GC-FID ve GC-MS kullanılarak karakterize edilmiştir. Analiz sonucunda, karvakrol (%75,70), linalol (%9,0), *p*-simen (%4,33) ve timol (%1,9) en bol bulunan bileşikler olarak saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda, karvakrol ve timolün *Amblyomma americanum* ve *Aedes aegypti*'ye türlerine karşı kuvvetli kovucu özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Carroll ve ark., 2017).

O. onites'in uçucu yağının ve uçucu bileşenlerinin, antiprotozoal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, genel olarak, toplam uçucu moleküllerin %99,9'unu temsil eden 71 bileşik, GC-FID ve GC-MS analizleri ile karakterize edilmiştir. Kimyasal olarak, uçucu yağda %70,6 oranı ile karvakrol baskın bulunmuştur. Yağın diğer ana bileşenleri linalol (%9,7), *p*-simen (%7,0), *γ*-terpinen (%2,1) ve timol (%1,8) olarak hesaplanmıştır. Metil 2-metil-bütirat, metil 2-metil-bütirat, δ-3-Karen, β-Fellandren, furanoid, *α,p*-Dimetilstiren, *α*-Kopaen, selina-5,11-dien, aromadendren, alloaromadendren, *trans*-Pinokarveol, *trans*-Piperitol, *γ* -Muurolen, leden, piperitenon oksit, epiglobulol, viridiflorol gibi uçucu bileşikler %0,01 in altında bir oranda bulunan moleküller olarak belirlenmiştir (Taşdemir ve ark., 2019).

1.2.1.2. *Origanum onites*'in Uçucu Olmayan Bileşenleri

O. onites'in topraküstü kısımlarının metanol ile ekstre edildiği bir çalışmada; 24 saat boyunca bitki metanolle maserasyona bırakılmış, süre sonunda filtre edilerek çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılarak çözücü içermeyen bir ekstre elde edilmiş ve daha sonraki analizler için buzdolabında (+4 ºC) saklanmıştır. LC-TOF/MS yöntemi kullanılarak ekstrenin kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; rozmarinik asit (%32,05), 4-hidroksibenzoik asit (%25,46), kafeik asit (%17,64), gentisik asit (%12,11) en yüksek oranlarda bulunan bileşikler olarak olarak kategorize edilmiştir. Bunların yanında; gallik asit, vanilik asit, protokateşik asit, *p*-kumarik asit, hesperidin, apigenin-7-glukozit, 4-hidroksibenzaldehit, rutin, ferulik asit, salisilik asit, kersetin, naringenin, kemferol, sikorik asit moleküllerinin de ekstrede olduğu tespit edilmiştir (Erenler ve ark., 2018).

Muğla'dan (Fethiye civarı) toplanan *O. onites*'in topraküstü kısımları metanol ve su ile ayrı ayrı ekstraksiyona tabi tutulmuş olup bitkinin kimyasal bileşenleri HPLC kullanılarak araştırılmıştır. Analizler sonucunda metanol ile hazırlanan ekstrelerde 28 adet kimsayal molekül tespit edilmiştir. Akasetin, apigenin-7,4-dimetil eter, azelaik asit, kastisin, sirsiliol, sirsimaritin, dihidrorobinetin, ferulik asit, izoferulik asit, glisiretinik asit, nevadensin, sakuranetin, salvigenin, tüberonik asit glukoziti gibi

bileşikler ekstre içerisinde tayin edilen moleküller arasındadır. Su ile hazırlanmış olan ekstrelerin kimyasal bileşiminin akasetin, klorojenik asit, dihidrokemferol, dihidrokersetin, eriodiktiyol, ferulik asit, metil kafeat, sakkarik asit, salvianik asit A, tüberonik asit, tüberonik asit glukoziti, rozmarinik asit-*o* -glukozit izomeri, sirsilineol moleküllerinden oluştuğu saptanmıştır (Mahomoodally ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş olan *O. onites* tohumları, Süleyman Demirel Üniversitesi'nde deneme alanı olan bir bölgede uygun koşullar sağlanarak yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bitkiler, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş sonrasında, metanol – aseton – su – asetik asit (55: 40: 4.5: 0.5) karışımı ile 2 saat 40°C'de ultrasonik su banyosu kullanılarak ekstraksiyon uygulanmıştır. *O. onites* ekstrelerinin fenolik bileşik içeriğini belirlemek için farklı hasat zamanlarında toplanan bitkilerin ekstreleri HPLC analizi ile incelenmiştir. Analizler sonucunda rosmarinik asit, akasetin, apigenin, viteksin, rutin, luteolin, eriodiktiol, naringenin, genistin, naringin, hesperidin ve kafeik asit olmak üzere on iki ana fenolik madde bulunmuştur (Özkan ve ark., 2010).

Azcan ve arkadaşları tarafından *O. onites*'in yağ asidi bileşiminin incelendiği bir çalışmada; bu türden 14 farklı yağ asidi izole edildiği rapor edilmiştir. *O. onites*'in nispeten yüksek bir *α*-linolenik asit (%56,3 ve %57,0) ve linoleik asit (%21,5 ve %21,7) içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. (*Z*)-9-oktadekenoik asit, stearik asit, mirsitik asit, pentadenoik asit, palmitik asit, araşidik asit, behenik asit, trikosanoik asit gibi yağ asitleri bitkinin içeriğinde tespit edilen yağ asitleridir (Tepe ve ark., 2016).

1.2.2.Biyoaktivite Çalışmaları

1.2.2.1. Antioksidan Aktivite

O. onites'in yaprak ve çiçek uçucu yağlarının ayrı ayrı elde edilerek kimyasal içeriklerinin araştırıldığı bir çalışmada; yapraklardan elde edilen yağdaki ana bileşenin karvakrol, çiçekten elde edilen uçucu yağdaki ana bileşenin ise *α*-cubene olduğu tespit

edilmiştir. Ayrıca elde edilen uçucu yağların antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi ve *β*-karoten linoleik asit deneyleri ile belirlenerek kıyaslanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, yaprak uçucu yağının çiçek uçucu yağına kıyasla daha iyi antioksidan kapasite gösterdiği ortaya konmuştur. Karvakrol ve *p*-simenin antioksidan kapasitede önemli bir rol oynaması ile bu durum ilişkilendirilmiştir (Özer, 2020).

Uçucu yağlardaki fenolik bileşenler, antioksidan aktivitenin ana kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bu sonuçlar birçok çalışma tarafından desteklenmektedir. Yapılan bir çalışmada, uçucu yağın antioksidan aktivitesinin, fenolik bileşenlerinden ve/veya uçucu yağdaki diğer bileşenlerle etkileşimlerinden gelebileceği sonucuna varılmıştır. *O. onites* uçucu yağındaki iki temel fenolik bileşenin timol ve karvakrol olarak bulunduğu GC/ MS analizi yöntemiyle tespit edilmiştir. Uçucu yağın ve temel bileşenlerin, DPPH ve *β*-karoten/linoleik asit antioksidan testleri ile antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. Antioksidan kapasiteleri, BHT, askorbik asit ve *α*-tokoferol gibi bilinen antioksidanların aktiviteleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, uçucu yağ; BHT, askorbik asit ve *α*-tokoferol pozitif kontrollerinden daha az aktif ancak timol ve karvakrolden daha aktif olarak bulunmuştur. Ayrıca, *O. onites* uçucu yağı, diğer bazı bitki uçucu yağlarından daha yüksek antiradikal aktiviteye sahip olarak tespit edilmiştir. Aynı ekip tarafından düzenlenen başka bir çalışmada; uçucu yağın ve iki temel fenolik bileşeninin güçlü oksidan H_2O_2'ye karşı koruyucu (antioksidan) etkisi Hep G2 hücrelerinde ölçülmüştür. Uçucu yağ, H_2O_2 sitotoksisitesine karşı güçlü bir antioksidan etkiye (<90 μg/mL) sahip olarak bulunmuştur. Uçucu yağın ve iki temel bileşeninin, H_2O_2 ile muamele edilmiş Hep G2 hücrelerinde membran hasarını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Özkan ve Erdoğan, 2011).

1.2.2.2. Antimikrobiyal Aktivite

Muğla ili'nin beş farklı bölgesinden *O. onites* bitkisi toplanarak hidrodistilasyon metotuyla uçucu yağlarının elde edilerek antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada; tüm uçucu yağların Gram-negatif ve Gram-

pozitif bakterilere karşı oldukça etkili olduğu ve bu etkinin benzer düzeyde olduğu ortaya konmuştur. Ula Göleti'nden toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağın ise; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* türleri üzerinde daha yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. İncelenen uçucu yağların antibiyotik direnci gösteren bakteriler arasından *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* türleri haricindeki türlere de antibakteriyel aktivite gösterdiği bu çalışmada kanıtlanmıştır (Saraç ve Uğur, 2008).

Piyasadan ticari ürün olarak temin edilen, *O. onites* uçucu yağının GC/MS ile yapısının aydınlatıldıktan sonra antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada ise; sekiz bakteri, iki maya ve on farklı standart bakteri suşuna ve genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üreten yetmiş dokuz klinik hastane *Escherichia coli* izolatına karşı disk difüzyon ve seyreltme yöntemleri uygulanmıştır. Uçucu yağın ana bileşini olarak %51,4 oranında karvakrol tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada uçucu yağ uygulama yapılan tüm mikroorganizmalara karşı etkili olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; uçucu yağın insanlar üzerindeki toksisite ve tahriş etme potansiyeli incelendikten sonra sentetik antibiyotiklere bir alternatif olabilecek şekilde değerlendirilebileceği önerisi yapılmıştır (Kaşkatepe ve ark., 2017).

Kekik türlerinin genelininin uçucu yağları ve diğer ekstreleri, biyoaktif moleküller açısından zengin olarak değerlendirilmiş olup, özellikle karvakrol üzerinde antibakteriyel aktivitenin temellerini anlamak için bir model bileşik olarak yoğun bir şekilde çalışmalar yapıldığı kayıtlara geçmiştir (Karadayı ve ark., 2020).

O. onites'in, metanollü ve sulu ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerinin yedi farklı bakteri suşu kullanılarak değerlendirildiği başka bir çalışmada ise; metanollü ekstrenin, sulu ekstreye göre *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis* türleri üzerinde daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Bunun yanında; sulu ekstre ile metanollü ekstre *Escherichia coli* üzerinde eşit aktivite göstermiştir (Mahomoodally, 2019).

1.2.2.3. İnsektisit Aktivite

O. onites'in, kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılarak bitkinin metanollü ekstresinin hazırlandığı ve uçucu yağının elde edildiği bir çalışmada; ekstre ve uçucu yağın insektisit etkisi *Sitophilus granaries* ve *Sitophilus oryzae* türleri üzerinde değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre uçucu yağ her iki tür üzerinde oldukça kuvvetli aktivite gösterirken, metanollü ekstre sadece *Sitophilus granaries* üzerinde ortalama bir etki sağlamıştır (Erenler ve ark., 2018).

Thaumetopoea wilkinsoni Tams. güvesi üzerinde yapılan bir çalışmada; *O. onites* uçucu yağı ve dört ana bileşeni karvakrol, γ- terpinen, terpinen-4-ol ve timol laboratuvar koşullarında larvalara karşı denenmiştir. Uçucu yağ, larva başına 0.1 mL uygulandığında LD_{50} değeri 3800µL L^{-1} olarak ölçülmüştür. Karvakrol uçucu yağ içerisindeki en toksik bileşen olarak bulunmuş (LD_{50} = 3100µL L^{-1}), bu değeri 5500µL L^{-1} ile timol takip etmiştir. γ- terpinen ve terpinen-4-ol ise daha az etkili olarak değerlendirilmişlerdir. Sonuçlar, *O. onites* uçucu yağının ve onun iki bileşeni olan karvakrol ve timolün, çam kese böceği kontrolü için sentetik insektisitlere potansiyel alternatifler olabileceğini göstermiştir (Çetin ve ark., 2007).

O. onites uçucu yağının ve sıcak sulu ekstresinin, *Sitophilus zeamais*, *Acanthoscelides obtectus*, *Tribolium confusum*, *Thaumetopoea pityocampa*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Sitophilus granarius*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Ephestia kuehniella, Thaumetopoea wilkinsoni, Acleris undulana*, *Megaselia halterata*, *Plodia interpunctella* ve *Culex pipiens* türleri üzerinde, fumigant toksisitesi, insektisit, akarasit ve larvasit etkileri olduğunda dair çalışmalar ortaya konmuştur (Tepe ve ark., 2016).

Dört farklı *Origanum* türünden elde edilen uçucu yağların fumigant ve kontakt aktiviteleri *Tribolium confusum* Jacquelin Du Val, *Sitophilus granarius*, *Rhyzopertha dominica* ve *Sitophilus oryzae* türlerinin yetişkinleri üzerinde incelenmiştir. Türlerden elde edilen uçucu yağların kimyasal yapıları GC/MS analizleri ile aydınlatılmış olup, ana bileşenlerden timol ve karvakrolün miktarlarının yağdan yağa farklılık gösterdiği

rapor edilmiştir. *O. onites* ve *Origanum vulgare* uçucu yağları *Rhyzopertha dominica ve Tribolium confusum* üzerinde %100 ölüme sebep olmuştur. Tek konsantrasyonda fumigant aktivite deneyleri sonucunda *O. onites* uçucu yağı bir günlük süreç sonrasında *R. dominica*'ya karşı %91 aktivite sağlayarak, güçlü bir etki gösterdiği yönünde kanaat getirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; uçucu yağı oluşturan bileşenlerin ve uygulama yapılan insekt türününün, insektisit aktiviteyi etkileyen parametreler olduğu şeklinde değerlendirme yapılmıştır (Alkan, 2020).

1.2.2.4. Antikanser Aktivite

Tümörlü hücrelerin büyümesi ve yayılması besinlerin ve oksijenin varlığına bağlı olduğundan, tümörün yakınında yeni kan damarı oluşumunu bloke ederek kanserle savaşmak için anti-anjiyogenik kapasiteye sahip bileşiklerin, potansiyel antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda, anjiyogenezi hedefleyerek tümör büyümesini ve metastazı baskılamak için toksik olmayan anti-anjiyogenik fitokimyasalların keşfinin, seçici olmayan sitotoksik tedavilere kıyasla daha fazla pratik öneme sahip olabileceği öne sürülmüştür. *O. onites* uçucu yağının su distilasyonu metotuyla elde edildiği bir çalışmada; yağın içeriği GC/MS ile incelenmiş olup ana bileşen %64,3 oranı ile karvakrol olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağın; antiproliferatif aktivitesi (MTT ile, 3-(4,5-dimetil-2-tiyazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), antianjiyojenik aktivitesi (tüp oluşturma tahlili ile), hücre göçünü engelleme yeteneği (göç deneyi) ve apoptotik potansiyeli (DAPI boyama), sıçan yağ dokusu endotel hücreleri (RATEC'ler) ve 5RP7 (cH-ras dönüştürülmüş sıçan embriyonik fibroblastları) hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, uçucu yağın hücre canlılığını belirgin şekilde engelleyebileceği ve 5RP7 hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceği ve ayrıca *in vitro* tüp oluşumunu ve RATEC göçünü engelleyebileceği ortaya konmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, antianjiyojenik aktiviteye sahip olan uçucu yağın, anjiyogenez ile ilgili hastalıkların önlenmesinde değerlendirilebileceği ve kanserle mücadelede faydalı olabileceği öne sürülmüştür (Bostancıoğlu ve ark., 2012).

O. onites uçucu yağının ve yağın iki ana bileşeni olan timol ve karvakrol'ün hepatoma G2 (Hep G2) hücrelerinde hidrojen peroksidin indüklediği membran hasarı ve sitotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir deneyde; uçucu yağın yüksek konsantrasyonlarında, kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı ortaya konmuştur. Hep G2 hücreleri üzerinde, uçucu yağın (IC_{50}: 149,12 µg/mL), karvakrol ve timol'den (IC_{50}: 53,09 ve 60.01 µg/mL) daha az toksik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Bulgular değerlendirildiğinde, bitkinin uçucu yağının ve iki temel bileşeninin antikanser aktivite gösterdiğine kanaat getirilmiştir (Özkan ve Erdoğan, 2011).

Bitkinin uçucu yağının antikanser aktivitesinin *in vivo* ve *in vitro* olarak değerlendirildiği bir çalışmada; *in vitro* antiproliferatif aktivite, dört tümör tipinden insan kanser hücre hatlarına karşı sülforodamin B (SRB) tahlili ile değerlendirilmiştir. Bir kolorektal kanser hücre dizisi olan HT-29, uçucu yağın antiproliferatif aktivitesine en duyarlı olan hücre dizisi olarak belirlenmiştir. Uçucu yağın sırasıyla insan (HT-29) ve murin (CT26) kolon kanseri hücrelerine karşı proapoptotik ve antimigratör potansiyelini araştırmak için yara iyileştirme deneyi ve Annexin V-PI boyaması metotları kullanılmıştır. Uçucu yağın, metastazı hafiflettiği ve her iki hücre hattında da apoptoza bağlı morfolojik değişiklikleri indüklediği değerlendirilmesi yapılmıştır. Bir BALB/c (İmmun kompetan) deneysel fare modelinde yağın profilaktik oral uygulamasının, sinjenik CT26 kolon tümörlerinin büyümesini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Bu çalışma, oral yoldan uygulanan *O. onites* uçucu yağının antitümör potansiyeline ilişkin ilk rapor olarak kayıtlara geçmiştir (Spyridopoulou ve ark., 2019).

O. onites uçucu yağının, A549 insan akciğer kanseri, MIA PaCa insan pankreas kanseri ve HUVEC insan endotel hücre hatları üzerinde fizyolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmada; bulgular, tüm konsantrasyonlarda (4.79–191.6 µg/mL, 24 saat) uçucu yağın hücre çoğalmasını engelleyebileceğini ve A549 ve MIA PaCa hücre dizilerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermiştir. 24 saat boyunca, ≤19.16 µg/mL uçucu yağ ile muamelenin, HUVEC hücre hatlarında hücre çoğalmasını inhibe etmese de, uçucu yağın daha yüksek konsantrasyonlarının (≥38.32 µg/mL) hücre çoğalmasını

önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, uçucu yağın umut verici antikanser etkileri olduğu gösterilmiştir.

O. onites uçucu yağının HepG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla düzenlenen başka bir çalışmada; hücre canlılığı ve sitotoksisitesi, uçucu yağ farklı konsantrasyonlarda (100 µg/ml- 500 µg/ml) uygulanarak, MTT ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra 500 µg/ml ile muamele edilmiş hücrelerde, 100 µg/ml ile muamele edilmiş hücrelere göre canlılıkta önemli bir düşüş olmuş ve 48 saat sonra daha da azalmıştır. Sonuç olarak, *O. onites* uçucu yağının HepG2 hücreleri için doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik olduğu ve hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip olabileceği öne sürülmüştür (JARED, tez 2020).

1.2.2.5. Hepatoprotektif Aktivite

Yapılan bir çalışmada; sıçanlarda etanol kaynaklı oksidatif strese karşı *O. onites*'in hepatoprotektif ve antioksidan aktivitesinin ölçülerek değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada, her bir grup 7 adet sıçan içerecek şekilde 4 adet grup oluşturulmuştur. Kontrol grubunda sıçanlara sadece standart sıçan yemi ve su verilerek beslenmeleri sağlanmıştır. Oral yoldan sıçanlarda oksidatif stresi indüklemek amacıyla, 2. grup sıçanlara standart sıçan yemi yanında %20 etanol uygulaması yapılmıştır. 3. gruba standart sıçan yemi ile birlikte taze demlenmiş ve soğutulmuş %3'lük *O. onites* infüzyonu verilmiştir. 4. gruptaki sıçanlara ise; standart sıçan yemi, %20 etanol ve taze demlenmiş ve soğutulmuş %3'lük *O. onites* infüzyonu bir arada verilerek deneysel çalışma yürütülmüştür. Karaciğer hasarı serum enzim aktiviteleri, normal kontrole kıyasla %20 etanol grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunurken; parametreler, infüzyon destekli gruplarda %20 etanol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, kekik infüzyonu takviyesinin etanol kaynaklı karaciğer toksisitesine ve oksidatif strese karşı koruyucu aktivite gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (Shreen ve ark., 2020).

1.2.2.6. Analjezik Aktivite

Bir çalışmada; *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub.Mor., *Satureja cuneifolia* Ten.'in, Clevenger aparatı ile elde edilen uçucu yağlarının ve iki farklı lokaliteden toplanan *O. onites*'in uçucu yağlarının analjezik aktiviteleri, farelerde tail-flick testi kullanılarak ve standart analjezik ilaçlar olan morfin ve fenoprofen ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. *O. onites*'in toplandığı yerleşim yerleri, İzmir ve Beycik/Antalya olarak bildirilmiştir. Test edilen uçucu yağlar arasında, belirgin analjezik aktivitenin sadece *O. onites*'e özgü olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, *O. onites* yağlarının analjezik aktivitesinin, bitkinin toplandığı bölgeye bağlı olduğu tespit edilmiştir. İzmir'den toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağ kayda değer analjezik aktivite gösterirken, Antalya'dan toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağın tekrarlanan testlerde bile herhangi bir analjezik aktivite göstermediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, analjezik aktivitenin uçucu yağların karvakrol içeriği ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Aydın ve ark., 1996).

1.3. Uçucu Yağlar

Esans, eterik yağ veya eterol olarak da tanımlanan uçucu yağlar, canlı organizmalar tarafından biyosentezlenen uçucu bileşenlerin bir karışımıdır. Su, buhar, kuru distilasyon yolları ile ve *citrus* türleri için ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilmektedirler. Doğadaki oluşumları ve fonksiyonları konusunda hala aydınlatılmamış noktalar olmakla birlikte, araştırmalara devam edilmektedir. Ancak, organizmanın savunma, sinyalizasyon veya ikincil metabolizmalarının bir parçası olarak uçucu yağlar ürettiğine dair kanıtlar vardır. Uçucu yağlar, terpenoit ya da terpenoit olmayan uçucu bileşenlerden oluşmaktadır. Tümü hidrokarbon veya hidrokarbonların oksijenlenmiş türevlerinden oluşmaktadır. Bazılarında azot ve kükürt atomlarına da rastlanmaktadır. Alkol, ester, keton, sülfit, asit, epoksit, aldehit vb. formlarda var olabilirler. Seskiterpenler, monoterpenler ve diterpenlerin büyük bir kısmı uçucu yağın bileşinini oluşturmaktadır. Bunun yanında, yağ asitleri, esterler,

fenilpropanoitler ya da bunların bozunma ürünleri uçucu bileşenler olarak uçucu yağlarda bulunabilmektedirler (Başer ve Demirci, 2007).

Uçucu yağların elde edilmesi için, 100 tane tür oldukça yaygın bir şekilde değerlendirilmesine rağmen, başta Lamiaceae, Umbelliferae, Compositae familyalarında olmak üzere 60'ın üzerinde familyada ve 2000'in üzerinde bitki türünde uçucu yağ bulunduğu kayıtlara geçmiştir (Djilani ve Dicko, 2012). Uçucu yağ taşıyan türler açısından zengin olarak iyi bilinen aileler; Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Santalaceae, Zingiberaceae, Zygophyllaceae olarak tespit edilmiştir (Başer ve Demirci, 2007). Uçucu yağlar, bitkilerde yaprak, kök, kabuk, reçine, çiçek, kabuk, meyve gibi birçok farklı bölümünde bulunmaktadırlar (Tongnuanchan ve Benjakul, 2014).

Uçucu yağların kozmetik, ilaç, parfümeri, gıda sanayisi, fitoterapi ve aromaterapi alanlarında değişik amaçlara yönelik çok uzun yıllardan beri kullanılmakta olduğu kayıtlara geçmiştir (Çelik ve Çelik, 2007; Kılıç, 2008). Çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisi olarak uçucu yağların kullanımının araştırılması için çok sayıda çalışmanın yapıldığı ortaya konmuştur. Daha önceki zamanlarda, uçucu yağların tüm dünyada özellikle çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde ise; içecek ve gıda sanayinde, kozmetik ve koku sanayinde değerli parfüm yapımında kullanılması ve birçok biyolojik aktiviteden sorumlu olmaları sebebiyle uçucu yağlara verilen önem zaman içerisinde artış göstermektedir (Irshad ve ark., 2020).

Uçucu yağların endüstriyel ürünlerin üretiminde ilk kullanıldığı dönemi tam olarak belirlemek zordur. Bununla birlikte, uçucu yağların büyük ölçekli kullanımının eski Mısır'a kadar uzanmakta olduğu tespit edilmiştir. Parfümler, ilaçlar, vücutların mumyalanması ve yemeklerde aroma verici olarak kullanılması amacıyla uçucu yağlardan faydalanılmıştır. Uçucu yağların endüstriyel ürünlerde en yaygın kullanılma şekilleri koku ve tat verici olarak değerlendirilmeleridir. Gıda, sabun ve kozmetik endüstrilerinin gelişmesi, uçucu yağlar endüstrisinin genişlemesinin ve ürünlere olan

talebin artmasının temel nedeni olarak nitelendirilmiştir. Alkolsüz içecek endüstrisinin gelişiminde, özellikle narenciye kökenli uçucu yağların önemli bir kaynak olarak büyük önem taşıdığı kayıtlar geçmiştir (Bouayed ve Bohn., 2012).

1.4. Uçucu Yağların Üretimi

Uçucu yağların; tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunan bileşenlerin cinsine, bitkilerin taşıdıkları uçucu yağ miktarlarına, uçucu yağın bitkide bulunduğu organlarına göre farklı yöntemler ile elde edildiği ortaya konmuştur (Kaya ve Ergönül, 2015).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden uçucu yağ elde edilmesinde kullanılan yöntemler iki genel başlık altında değerlendirilmektedir. Klasik yöntemler ve gelişmiş ekstraksiyon teknikleri bu iki başlığı oluşturan unsurladır. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri, ekstraksiyon zamanını kısaltmak, ekstraksiyon sırasında kullanılabilecek organik solvent miktarını azaltmak, doğa kirliliğini daha aza indirgemek açısından klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiş enstrümental ekstraksiyon yöntemleri olarak nitelendirilmiştir. Klasik yöntemler ise distilasyon, ekstraksiyon ve mekanik yöntemler olarak üç başlık altında değerlendirilmiştir. (Yaman ve Kuleaşan, 2016).

Uçucu yağların üretimine başlamadan önce iklim, toprak tipi, kuraklığın etkisi ve su stresi, böcekler ve mikroorganizmaların neden olduğu stresler, üreme (tohum veya klonlar) ve yetiştirme gibi bir dizi önemli agronomik faktör dikkate alınarak uygulamalara başlanmalıdır. Diğer önemli faktörler arasında biyokütlenin hangi kısmının kullanılacağı, yağ hücrelerinin bitki içindeki yeri, hasat zamanlaması, hasat yöntemi, depolama ve uçucu yağ ekstraksiyonundan önce biyokütlenin hazırlanması gibi kesinleşmesi gereken bilgiler yer almaktadır (Baser ve Buchbauer, 2009).

İklim konusunda; en önemli değişkenler sıcaklık, güneşlenme saati sayısı ve yağış sıklığı ve yağış miktarından oluşmaktadır. Sıcaklık ve nem arasındaki ilişki ek

bir önemli parametredir. Yüksek sıcaklıklarla birleşen nem, böcek parazitlerinin ve en önemlisi mikroorganizmaların çoğalmasına elverişli koşullar üretmektedir. Bu bazen bitkilerin kendi korumaları için uçucu yağ üretimini artırmalarına neden olur (Baser ve Buchbauer, 2009).

Toprak pH'ı, yağ verimini ve yağ kalitesini önemli ölçüde etkiler. pH değerinin, topraktaki belirli elementlerin çözünürlüğünü güçlü bir şekilde etkilediğini bulunmuştur. Demir, çinko, bakır ve manganez alkali topraklarda asidik topraklara göre daha az çözünür çünkü yüksek pH değerlerinde hidroksit olarak çökerler. Ayrıca, dikim aralıkları, temel eser elementler ve besinlerle yeterli tedariki sağlamalıdır. Uygun bir iklimle birlikte optimum yerin seçimi, optimum mahsul ve uçucu yağ kalitesi için bir garanti sağlayacağından önemli bir rol oynar. Su eksikliğinin yanı sıra çok fazla suyun da bitkilerin büyümesini etkileyebileceği ve hatta onları öldürebileceği iyi bilinmektedir. İstenen bitkinin yetiştirilmesi için en uygun yerin belirlenmesi için biyokütlenin toprak nemine toleransı belirlenmelidir. Mantar büyümesi fazla sudan kaynaklandığından, çoğu bitki köklerinin çürümesini ve bitkinin zarar görmesini önlemek için iyi drene edilmiş topraklara ihtiyaç duyar, böylece uçucu yağ üretimini olumsuz etkiler. Su eksikliği, örneğin kuraklık, benzer bir zararlı etki yaratmaktadır. Su eksikliğinde, çiçekler normalden daha küçük boyutta olmakta ve uçucu yağın verimi düşmektedir (Baser ve Buchbauer, 2009).

Bitkiler, komşu bitkilerle etkileşime girebilen ve onları böcek saldırısından kaynaklanan herhangi bir yeni tehlikeye karşı uyarabilen canlı organizmalardır. Bu uyarı sinyalleri, uçucu yağ bileşiminde meydana gelen hızlı değişikliklerin sonucudur ve daha sonra komşularına aktarılır ve bu da bu bilgiyi komşularına ileterek onları da yağ bileşimlerini değiştirmeye zorlar (Baser ve Buchbauer, 2009).

Bir bitkinin su içeriği genellikle %50 ile %80 arasında değişir. Bir bitkinin kesilmesi, su ve mineral tedarikini kesintiye uğratmaktadır. Bitkinin yaşamı sürdürme süreçleri yavaşlar ve sonunda tamamen durur. Enzimlerin üretimi durur ve çürümeye ve küflenmeye yol açan bakteri aktivitesinde bir artış da dahil olmak üzere otooksidatif süreçler başlar. Koku gibi renk ve organoleptik özellikler de genellikle zararlarına göre

değişecektir. Bunun bir sonucu olarak, kontrollü kurutma veya hazırlama açısından kabul edilebilir seçenekler olmadıkça, biyokütlenin işlenerek uçucu yağ çıkarılması hızlı olmalıdır (Baser ve Buchbauer, 2009).

Bitkisel mahsulün hasat zamanlaması, uçucu yağın kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bitkinin ömrü boyunca kimyasal bileşimin değiştiği iyi belgelenmiş bir gerçektir. Bazen, uçucu yağın kalitesinin optimum seviyeye ulaşması birkaç gün alabilir. Çiçeklenme başlangıcının kesin zamanının bilinmesi, genellikle yağın bileşimi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Günümüzde, mikrodistilasyon ve gaz kromatografisi tekniklerinin bir kombinasyonunun kullanılması, yağın kalitesinin hızlı bir şekilde test edilmesini ve dolayısıyla hasatın başlaması için en uygun zamanın belirlenmesini sağlamaya yardımcı olmaktadır. Uçucu yağ verimlerinin bazı durumlarda hasat zamanından etkilenebildiği ortaya konmuştur. En iyi örneklerden biri gül yağıdır. Yaprakları sabah 6 ile 9 saatleri arasında toplanmalıdır aksi takdirde yükselen gündüz sıcaklıkları ile yağ verimi düşecektir (Baser ve Buchbauer, 2009).

Uçucu yağ elde edilmesinde kalite standartlarının karşılanması açısından, ilk adım, çoğu durumda, aranan ürünün gereksinimlerine en uygun bitki tohumunun seçilmesidir. Fideliklerin hazırlanması, bitkinin tohumdan yetiştirilmesi, fidelerin yetiştirilmesi ve dikilmesi vb. köklü tarım uygulamaları takip edilmelidir. Bir mahsulün elde edilebilmesi için gereken süre, kullanılan türe bağlıdır ve çok değişken olabilir. Limon otu, ilk mahsulün hasat edilebilmesi için ekim tarihinden itibaren 7-9 ay sürebilirken, lavanta 3 yıla kadar sürebilir. Uçucu bir yağı çıkarmanın en ekonomik yolu, hasat edilen biyokütleyi doğrudan damıtma tesisine taşımaktır. Bazı bitkiler için bu tek pratik seçenektir. *Melissa officinalis* L. kurumaya ve dolayısıyla yağ verimi kaybına çok meyillidir. Bazı hasat edilmiş bitki materyalleri, örneğin, öğütme veya ufalama, kırma veya daha küçük parçalara ayırma ve bazen sadece kurutma gibi, yağ çıkarmadan önce biyokütlenin özel muamelesini gerektirebilir. Bazı durumlarda biyokütlenin fermantasyonu yağ ekstraksiyonundan önce gelmelidir. Bitkisel biyokütlenin yanı sıra meyve ve tohumların damıtma işleminden önce kurutulması gerekebilir. Apiaceae, Piperaceae ve Myristicaceae familyalarının tohumları ve meyveleri genellikle buharla damıtma işleminden önce öğütülmeyi gerektirir. Çoğu

durumda, ufalanma gerçekleşmeden önce tohumun kurutulması gerekir. Malzeme ne kadar ince öğütülürse, yağ verimi o kadar iyi olur ve daha kısa damıtma süreleri sayesinde yağın kalitesi de o kadar iyi olur. Tohum veya meyvenin parçalanması sırasında buharlaşarak uçucu madde kayıplarını azaltmak için öğütme işlemi su altında, tercihen kapalı bir aparatta da gerçekleştirilebilir. Günümüz mekanize hasat yöntemleri, biyokütlenin parçalanmasını otomatik olarak etkiler. Bu aynı zamanda biyokütlenin hacmini azaltır, böylece distilasyon makinesinde paketlenebilecek malzeme miktarını arttırır ve işlemi daha ekonomik hale getirir (Baser ve Buchbauer, 2009).

Aromatik bitkilerden uçucu yağların damıtılması için genellikle dört teknik kullanılmaktadır; su distilasyonu (hidrodistilasyon), su buharı distilasyonu, buhar distilasyonu, kohobasyon ile distilasyon (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Hidrodistilasyon, bitkilerden uçucu yağlar elde etmek için mevcut en basit ve en eski işlem olarak bildirilmiştir. Su distilasyonunda dikkate alınması gereken önemli bir faktör, tankta bulunan suyun damıtma işlemi boyunca her zaman yetecek kadar olması gerektiğidir, aksi takdirde bitki materyali aşırı ısınabilir ve kömürleşebilir (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Su distilasyonunun bazı dezavantajlarını ortadan kaldırmak için distilasyon ünitelerinde zaman içerisinde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Bitki malzemesini desteklemek ve sıcak fırın tabanıyla doğrudan temasını önlemek için distilasyon ünitesine delikli bir ızgara yerleştirilmiştir. Su seviyesi ızgaranın altında tutulduğunda, uçucu yağ, kaynayan sudan yükselen buharla distile edilir. Bu distilasyon şekli su buharı distilasyonu olarak adlandırılmıştır. Alan distilasyon ünitesi olarak bilinen endüstriyel ölçekli su buharı distilasyonu üniteleri, gelişmekte olan ülkelerdeki uçucu yağ üreticileri arasında son derece popüler olarak kayıtlara geçmiştir. Basit yapıları, düşük maliyetleri ve kolay kullanımları nedeniyle tercih edilme sıklıkları giderek artmaktadır. Bu ünitelere tek seferde genellikle 100-2000 kg bitki materyali yüklenebilmektedir ve distilasyon için toplam süre yaklaşık 6-8 saat ideal olarak

değerlendirilmiştir. Mevcut sınırlı ısıtma yüzeyi nedeniyle, alan distilasyon ünitelerinde buhar üretim hızı her zaman yeterli olmayabilir. Bu durumun sonucu olarak, distilasyon süresinin uzaması ve bazen daha düşük yağ verimi eldesi kayıtlara geçmiştir. Yetersiz buhar hızı nedeniyle yağın distilasyon cihazına geri akışının, ayrışma reaksiyonlarına ve daha düşük yağ kalitesine neden olabileceği tespit edilmiştir. Bu sorunlara çözüm bulabilmek adına, Hindistan Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Merkez Enstitüsü geliştirilmiş alan distilasyon üniteleri tasarlamıştır. Üniteler, distile edilecek bitki materyalleri göz önünde bulundurularak yüksek kaliteli yumuşak paslanmaz çelikten imal edilmektedir. Geliştirilmiş distilasyon ünitesi, suyun ısıtma süresini azaltan, yüksek oranda buhar üretimi ve daha düşük yakıt tüketimi (%20-%30) sağlayan duman borularına sahip kare bir kazan üzerine yerleştirilmiş silindirik bir damıtma tankından oluşturulacak şekilde tasarlanmıştır. Fırın, hava çekişini en üst düzeye çıkarmak ve işyerinde dumandan kaynaklanan kirliliği kontrol etmek için optimum yükseklikte bir bacaya bağlanmıştır. Yoğunlaştırılmış yağ-su karışımının daha sonra özel olarak tasarlanmış paslanmaz çelik yağ ayırıcıdan geçmesine izin verilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu gelişmiş üniteler üretilerek, Hindistan'ın farklı bölgelerindeki girişimcilere ve çiftçilere tedarik edilmiştir (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Modern buhar distilasyon ünitelerinde yüksek basınçlı buhar kullanımı, uçucu yağların çok daha hızlı ve eksiksiz distilasyonuna izin verildiği görülmüştür. Buhar distilasyon ünitelerinde yağların ekstraksiyonu için gereken süreyi azalttığı kayıtlara geçmiştir. Bir su buharı distilasyonu yapan alana distilasyon ünitesinde Java sitronella uçucu yağı için 5 saate kadar sürebilen bir işlem, bir buhar distilasyon ünitesinde iki ila 3 saat sürdüğü belirlenmiştir. Sermaye maliyetlerinin diğer ünitelere göre daha yüksek olması sebebiyle daha büyük üreticilerin bu üniteleri kullanmaları tercih ettiği kayıtlara geçmiştir. Ünitelerin kapasiteleri, parti başına 1 ila 3 ton bitki materyali alacak şekilde tasarlanmıştır (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Uçucu yağların verimini ve kalitesini etkileyen parametreler; distilasyon metotu, distilasyon ekipmanının uygun tasarımda olması, ekipmanın imal edildiği

malzeme, bitkisel materyalin durumu, distilasyon süresi, kazanlara yüklenen hammadde miktarı ve ortamdaki buhar miktarı, kazan ve ekipmanın durumu ve operasyon parametreleri olarak belirlenmiştir. Distilasyon tekniği, buharın ısı içeriği ve sıcaklığı distilasyon özelliklerini değiştirebileceğinden, uçucu yağın kaynama noktası ve bitkinin doğası dikkate alınarak seçilmelidir. Odunsu yağlar (örneğin sandal ağacı, sedir ağacı) ve kökler (örneğin *Cyperus*) gibi yüksek kaynama noktasına sahip yağlar için, yağ, kazanla çalıştırılan buhar distilasyon üniteleri kullanılmalıdır. Kazan, kondenser veya separatörlerin hatalı tasarımı petrol kaybına ve yüksek sermaye yatırımlarına neden olabilir. Kazanın yüksekliği:çap oranı önemli olarak belirtilmiştir. Kondansatörün ayırıcı paslanmaz çelik gibi dayanıklı bir malzemeden yapılması tercih edilmektedir. Paslanmaz çelik (304 veya 316 kalite) genellikle imbik yapımında kullanılır, çünkü dayanıklıdır, uçucu yağların kimyasal bileşenleri paslanmaz çelikle reaksiyona girmez ve her damıtmadan sonra temizlenmesi kolaydır. Bazı malzemeler, çıkarılamayan az miktarda uçucu yağı emme eğilimindedir ve sonuç olarak, belirli bir koku her zaman damıtma cihazına yapışacaktır, bu da başka bir tür yağın kokusunu kolayca bozabilir ve dolayısıyla değerini azaltabilir (Guenther, 1948).

Paslanmaz çelik ve cam, emici özellikleri olmadığı için her damıtma işleminden sonra temizlenmesi de kolaydır. 304 ve 316 paslanmaz çeliğin temel özellikleri şunlardır:

- Mükemmel korozyon direncine sahiptir.
- Kolay temizlenebilir ve ürün saflığı için mükemmel bir hijyen faktörüne sahiptir, gıda maddelerine bulaşma ve lekelenme olmaz.
- Mükemmel kaynak özellikleri göstermektedir.
- Yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılık göstermektedir.
- Mükemmel fabrikasyon özelliklerine sahiptir.

316 kalite paslanmaz çelik, klorür ortamlarında çukurlaşma ve çatlak korozyonuna karşı daha yüksek bir dirence sahiptir. Bununla birlikte, 304 kalite paslanmaz çelik (Grade 316'dan daha ucuz), malzeme şiddetli bir klorür ortamına maruz kalmadığından distilasyon sistemi için uygundur (Mortimer, 2004).

Doğada aşındırıcı olan uçucu yağlar, tercihen alüminyum, bakır veya paslanmaz çelik gibi dayanıklı malzemelerden yapılmış distilasyon ünitelerinde damıtılmalıdır. Tank yine de yumuşak çelik veya galvanizli demir gibi daha ucuz bir metalden yapılabilir ve kondansatör ve ayırıcı paslanmaz çelik gibi dayanıklı bir malzemeden yapılabilir. Tankta hala sadece buhar bulunduğundan, pas ve diğer korozyon ürünleri yağa bulaşmayabilir. Bu, ekipmanın sermaye maliyetinde önemli tasarruflar sağlayabilir. Gül, agarwood, kewda, sandal ağacı ve lavanta gibi pahalı, değeri yüksek uçucu yağlar paslanmaz çelik sistemlerde damıtılmalıdır. Bakır, eski zamanlardan beri damıtma imbiklerinin imalatında en yaygın malzeme olmasına rağmen, bulunabilirliği azalmakta ve paslanmaz çelik gibi üstün alaşımların gelişiyle yavaş yavaş sahneden kaybolmaktadır (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Tank ve diğer ekipmanlar paslanmamalıdır. Paslanmış ise, tank seyreltik kostik solüsyonlarla temizlenmelidir. Delikli ızgaralar paslanmamalı veya bitki materyalinin tankın dibine çökmesine ve yanık kokusu yaymasına izin verecek büyük boşluklara sahip olmamalıdır (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Conta malzemesi olarak teflon kullanılması tavsiye edilir. Teflon, korozyona son derece dayanıklı, emici özelliği olmayan ve 400°C'den büyük bir sıcaklık indeksine sahip olan ve dolayısıyla erimeyen bir politetrafloroeten (PTFE) plastiktir (Talanda, 2005).

Eksiksiz bir uçucu yağ damıtma sistemi tasarlarken, tüm sistem bileşenlerinin birbiriyle dengede olması hayati önem taşır. Bu, kazanın, günlük gerekli miktarda bitki materyalini işlemek için gerekli miktarda buharı sağlamak üzere uygun şekilde boyutlandırılması gerektiği anlamına gelir.

Kondenserin işlevi, tüm buharı ve beraberindeki yağ buharlarını sıvıya dönüştürmektir. Ayrılma süresini azaltmak için kondensin, yağ ve suyun en iyi ayrılacağı sıcaklığa soğutulması önemlidir. Kondenser yüzeyinin, çok yüksek distilasyon hızında bile damıtığı yeterince soğutmak için yeterince büyük olması

gerektiğinden, bir kondansatör gerekenden biraz daha büyük tasarlanmalıdır. Yavaş distilasyonun, esterlerin hidrolizi, bitki yükünün ıslanması ve kümelenmesi gibi birçok dezavantajı vardır. Bunlar yağ veriminde düşüşe neden olabilir. Buharın içinden geçtiği boruların, gerekli basınçta buhar akışını sağlayacak şekilde boyutlandırılması gerekir. Borular gereğinden fazla boyutlandırıldığında, borular, vanalar, bağlantı parçaları gereğinden daha pahalı olacak ve daha fazla ısı kaybı nedeniyle daha fazla hacimde yoğuşma oluşacaktır. Bu, nemi uzaklaştırmak için ya daha fazla buhar hapsi gerekeceği ya da kullanım noktasına ıslak buhar iletileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, borular küçük boyutlu ise, kullanım noktasında daha düşük bir basınç mevcut olacaktır ve ayrıca buharın yetersiz kalması riski de vardır.

Yağ separatörü, genel ürün geri kazanımında ve tesisin karlılığında en kritik bileşendir. Kondens, kondenserden separatöre akar ve işlevi, yağın yoğunlaşmış sudan hızlı ve eksiksiz bir şekilde ayrılmasını sağlamaktır. Uçucu yağ ve su karşılıklı olarak çözünmezler ve özgül ağırlıklarındaki farklılıklar nedeniyle iki sıvı iki ayrı katman oluşturur. Yağ tabakasının konumu (üst veya alt), yağın özgül ağırlığına bağlıdır. Yoğunlaşan suyun toplam hacmi her zaman yağdan daha büyük olacağından, damıtma işlemi sırasında hidrosolün (su bileşeni) sürekli olarak uzaklaştırılması gerekir. Yağ ve su genellikle yağ ayırıcıda hemen ayrılmaz. Distilat veya kondensat bu nedenle ayırıcıya çok hızlı akmamalı ve ayırma süresini azaltmak için herhangi bir türbülanstan kaçınılmalıdır. Sonuç olarak, giriş borusunda hava kilitlerinin oluşmasını önleyen bir girdap ve dolayısıyla bir girdap oluşturmak için kondens separatöre kavisli bir çıkışla alttan girmelidir. Separatör, çözeltinin çökmesi ve yağın ayrılması için yeterli zaman olacak, hidrosol alt çıkıştan sürekli olarak boşalacak ve yağ sürekli olarak üst çıkıştan dökülecek şekilde tasarlanmalı veya boyutlandırılmalıdır (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Uçucu yağların çoğu uygun koşullar altında uzun süre saklanabilir. Susuz olmalı, hava veya doğrudan güneş ışığı ile temas etmemelidir ve ayrıca serin tutulmalıdır. Yağ ayrıldıktan sonra, yağın içine giren kalıntıları gidermek için filtrelenmelidir. Yağın herhangi bir yaşlanma reaksiyonunu önlemek için yağda bulunan az miktardaki çözünmüş su uzaklaştırılmalıdır. Bu, yağın bir susuz sodyum

sülfat yatağından filtre edilmesiyle yapılır. Yağlar kuru olduklarında genellikle bulanıklık göstermezler (Talanda, 2005). Nem ve safsızlıkların varlığı, yağın muhafaza kalitesini olumsuz etkiler ve polimerizasyonu ve diğer istenmeyen reaksiyonları hızlandırır. Yağa susuz sodyum sülfat gibi bir kurutma maddesinin eklenmesi, gece boyunca bekletilmesi ve ardından filtrasyon, nemi giderecek ve yağı askıdaki safsızlıklardan arındıracaktır. Uçucu yağları berraklaştırmak için yüksek hızlı santrifüj kullanımı yaygındır (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Yağlar kuru, temiz yeni varillerde depolandığında bile, yağ ile tamburun üst kısmı arasındaki az miktardaki havada bulunan oksijenin (oksidasyon) etkisinden dolayı üründe kötü kokular veya tatlar oluşabilir. Bu, havanın kuru nitrojen gazı ile değiştirilmesiyle en aza indirilebilir. Renkli cam kaplar genellikle az miktarda yağı depolamak için kullanılırken, daha büyük miktarlar her zaman metal varillerde depolanır. Epoksi reçine ile kaplanmış hafif çelik variller çok popülerdir. İkinci el variller kullanıldığında, uçucu yağ ile doldurulmadan önce iyice temizlenip kurutulmaları önemlidir (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

1.4.1. Distilasyon

Distilasyon kelimesi, düşmek veya damlamak anlamına gelen Latince *destillare* fiilinden türemiştir. M.Ö. 3500 civarında Sümerler, bitkilerden uçucu yağları çıkarmak için veya bir maddeyi rafine etmek için bir sıvının buharlaşmasını ve yoğunlaştırılmasını ilk uygulayan uygarlık olarak kayıtlara geçmiştir. Distilasyon, en eski uygarlıklardan beri insanlık için önemli olmuştur; damıtılmış ürünler dünyadaki kültürel gelişmeleri belirlediği ve etkilediği kayıtlara geçmiştir. Bu tür ürünlerin önemli örnekleri etil alkol ve petroldür. Geçmişten günümüze kadar distilasyon işlemi için, süreçlerin ve aygıtların geliştirilmesi üzerinde pek çok insanın çalıştığı ortaya konmuştur. Çin, Japonya, Hindistan veya Moğolistan'da distilasyonun eski zamanlarda bilindiği ve belirli bir sanata göre geliştirildiği kayıtlara geçmiştir. Erken Orta Çağ'da bilgi, Araplardan Güney Avrupa şehirlerine kadar tüm Avrupa'ya yayılmış

ve alkol eldesi, tıbbi ürünler ve parfüm eldesi amaçlarıyla distilasyon kullanılmıştır (Kockmann, 2014).

Distilasyon çok bileşenli karışımları ayrı ayrı bileşenlerine ayırmak için kullanılan en önemli ve en etkili teknoloji olarak değerlendirilmiştir. Uygulama alanı olarak petrol rafinerileri, kimyasal madde endüstrisi ve gıda endüstrisi başta olmak üzere, endüstri branşlarının tümünde distilasyon metotu kullanılmaktadır (Stichlmair ve ark., 2021).

Cellier-Blumenthal ve Pistorius'un icatları, 200 yıl önce mevcut ekipman ve yöntemleri ustaca bir araya getirmiş ve verimli ve sağlam distilasyon ünitelerinin elde edilmesine aracı olmuştur. 100 yıldan uzun bir süre önce Hausbrand, McCabe, Kirschbaum ve Onken tarafından geliştirilmiş, damıtma kolonları ve ekipmanları tasarlamak için mühendislik araçları geliştirdiği kayıtlara geçmiştir (Kockmann, 2014).

Uçucu yağların distilasyon metotu ile elde edilmesinde işlem süresinin genellikle 1 saat ile 10 saat arasında değişmekte olduğu belirlenmiştir. İşlem sonucunda elde edilen uçucu yağ miktarı, distilasyon süresine, ortam sıcaklığına, basınca ve bitkisel materyalin türüne göre değişkenlik göstermektedir. Distilasyon sırasında drog, kaynayan suya içerisinde yer almakta veya buhara maruz bırakılırken, drog içerisindeki uçucu yağ buharlaşarak sisteme dahil olmaktadır (Stratakos ve Koidis, 2016).

Yenilik, yeni ve eski kavramların bir kombinasyonundan doğmaktadır, artan saflık, daha düşük enerji talebi ve değişen maliyet durumu gibi avantajlar yeni distilasyon ünitelerinin tasarımlarının geliştirilmesi için itici faktörler olarak değerlendirilmiştir (Kockmann, 2014).

1.4.1.1. Su Distilasyonu

Su distilasyonu yöntemi kullanılarak uçucu yağların üretimi işlemi sırasında, bitkisel materyal tamamen suya daldırılır ve kaynamaya maruz bırakılır. Bu işlemin temel özelliği, kaynar su ile bitki materyali arasında doğrudan temas olmasıdır. Su distilasyonun pratik avantajları, imbiklerin ucuz olması, yapımının kolay olması ve saha çalışması için uygun olmasıdır. Bunlar hala birçok ülkede taşınabilir ekipmanlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Abdul-Majeed ve ark., 2013).

Su distilasyonunda uçucu yağın kaynayan su uzun süre maruz kalmasının sonucu olarak, yüksek sıcaklık ve suyun asitleşmesi durumları yüzünden elde edilen uçucu yağların yapısında değişiklikler gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu durumun distilasyon ile elde edilen uçucu yağların içerisindeki uçucu bileşiklerin bozunmasına neden olabileceği ortaya konmuştur. Distilasyon sırasında uçucu yağdaki esterlerin asit ve alkole hidroliz olabildiği ve hidrolizasyon sonucunda uçucu yağın kalitesinin düşebildiği gözlemlenmiştir. Bazı uçucu yağlarda bozunmadan ötürü tekrar distilasyon işlemine ihtiyaç duyulduğu kayıtlara geçmiştir. Tekrar distilasyon işlemi ile istenmeyen safsızlıklardan uçucu yağı ayırarak, uçucu bileşenlerin kabul edilebilir koku verici bileşenler olarak elde edilmesine olanak sağlanabilmektedir (Stratakos ve Koidis, 2016).

1.4.1.2. Su ve Buhar Distilasyonu

Bu yöntemde, buhar, bitkisel materyalin bulunduğu kap ya da kazan içerisinden ayrı olacak şekilde üretilmektedir. Su-buhar distilasyonunda bu durumdan farklı olarak, suyun bitiş hizasının üzerine ızgaralar konarak bitkisel materyal ızgaraların üzerine yerleştirilmektedir. Uygulama şeklinden ötürü kazanın kapasitesi düşmekte ancak elde edilen yağın kalitesinde artış gözlemlenmektedir. Su-buhar distilasyon metotunda, kazanın alt kısmında bulunan ısı kaynağı ile bitkisel materyalin doğrudan teması söz konusu değildir. Öte yandan, kazanın cidarları ısıyı iyi ilettiği için özellikle kazana temas eden bitkisel materyaller üzerinde sıcaklık sebebiyle

bozunmalar meydana gelebildiği bildirilmiştir. İşlem süresince bitkisel materyal ile temas eden buharın ıslak buhar olmasından ötürü bitkisel materyal tamamen ıslanarak, distilasyon hızında yavaşlama görülebilmekte ve bu durum su-buhar distilasyonunun dezavantajlarından biri olarak nitelendirilmektedir. Su distilasyonuna göre daha hızlı bir işlem olması, elde edilen uçucu yağ veriminin daha yüksek olması ve uçucu bileşenlerin daha az hidrolize uğramaları su-buhar distilasyonun avantajları olarak kayıtlara geçmiştir (Boğday, 2004).

1.4.1.3. Buharı Distilasyonu

Su buharı distilasyonu metotunda taze bitki materyali, cam kap ya da kazan içerisine yerleştirilerek basınç yardımıyla buhara maruz bırakılır. Kap ya da kazanın içerisine yerleştirilmiş olan bitkisel materyalin içinden buhar jenaratöründe üretilmiş olan buhar geçirilmektedir. Bitkisel materyal buhar girişinin üzerinde bulunan ızgaralar üzerine konulmaktadır. Uçucu yağ damlacıkları buhar ile birlikte sürüklenerek toplama kabına ulaşır ve yağ yoğunlaştırılarak burada sudan ayrıştırılmak suretiyle işlem tamamlamlanmaktadır (Cellat, 2011; Kılıç, 2008).

Buhar distilasyonu, sıcaklığa duyarlı malzemelerin geri kazanılması için kullanılan modifiye edilmiş bir distilasyon işlemidir. En yaygın uygulamalarından biri, tıbbi ve aromatik bitkilerden uçucu yağların elde edilmesidir (Cerpa ve ark., 2008).

Uçucu yağlar solvent ekstraksiyonu, ekspresyon ve kritik sıvı ekstraksiyonu gibi farklı yöntemlerle üretilse de çoğu buhar distilasyonu ile üretilmektedir. Buhar distilasyonu ile üretilen farklı uçucu yağların oranı %93'tür ve kalan %7'si diğer yöntemlerle ekstrakte edildiği rapor edilmiştir (Masango, 2005).

İzole edilmiş uçucu yağ verimini artırmak ve ekstraksiyon işlemi sırasında üretilen atık su miktarını azaltmak için buhar distilasyonu iyi bir seçenek olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen distilat içindeki su miktarının daha az olması da metotun bir diğer avantajı olarak öne sürülmüştür (Aziz ve ark., 2018).

1.4.2. Ekstraksiyon

Çözücü ekstraksiyonu, birbiriyle temas halindeki iki karışmaz sıvı faz arasında bir çözünenin dağılımını ifade eder.

1.4.2.1. Çözücü Ekstraksiyonu

Çözücü ekstraksiyonu, birbiriyle temas halindeki iki karışmaz sıvı faz arasında bir çözünenin dağılımını ifade eder. Su buharı ile distilasyon sırasında ortam sıcaklığına tolerans gösteremeyen kırılgan veya narin droglar için geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygulanmaktadır. Ekstraksiyon için petrol eteri, metanol, aseton, hekzan ya da etanol dahil olmak üzere değişik çözücü sistemleri denenebilir(Reyes-Jurado ve ark., 2015; Tongnuanchan ve Benjakul., 2014). Uçuculuğunun yüksek olması nedeniyle en sık kullanılan çözücü *n*-hekzan olarak kayıtlara geçmiştir. Benzen ve diklorometan da yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak toksisiteleri nedeniyle yasaklanmışlardır. Çeşitli familyalara ait birçok bitkiden elde edilen uçucu yağların, çözücü ekstraksiyonu aracılığıyla elde edilebilmesi sebebiyle bu yöntemin tarımsal işletme alanında birçok uygulaması vardır (Roohinejad ve ark., 2017).

Genel uygulama yöntemi olarak, çözücü bitki materyali ile karıştırılır ve daha sonra uçucu yağı çıkarmak için ısıtılır, ardından süzülür. Daha sonra, süzüntüden çözücü buharlaştırılarak konsantre hale getirilir ve bu form reçine veya konkret olarak nitelendirilir. Uçucu yağı, konsantreden ayırmak için saf alkol ile karıştırma işleminin ardından distilasyon işlemi uygulanmaktadır. Uçucu yağ alkole geçer ve alkol buharlaştırıldığında geriye mutlak uçucu yağ kalmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntem nispeten zaman alıcı bir işlemdir, bu nedenle yağları diğer yöntemlere göre daha pahalı hale getirdiği belirtilmiştir (Tongnuanchan ve Benjakul., 2014).

1.4.2.2. Süperkritik Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvılar, kritik noktalarının üzerine belirli bir sıcaklık ve basınç altında çıktığı anda süperkritik bölgeye ulaşmış olurlar. Maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığın (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden farklı olarak yeni bir alan oluşur ve bu bölge süperkritik bölge olarak nitelendirilir. Süperkritik bölge içerisinde, ortamdaki madde sıvı ve gaz arasında süperkritik akışkan olarak adlandırılan bir yapıda bulunmaktadır. Maddenin gaz ve sıvı hallerindeki difüzyon hızı ve yoğunluğu, süperktirik akışkan haline geldiği difüzyon hızı ve yoğunluğu ile karşılaştırıldığında, süperktirik akışkan halinin difüzyon hızı ve yoğunluğunun, sıvı ve gaz halleri arasında bir değer aldığı ortaya konmuştur (Çutuk, 2019; Arslan, 2011).

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu, aromatik bitkilerden uçucu yağları çıkarmak ve izole etmek için en yaygın kullanılan yöntem haline gelmiştir. Bu teknik, etkili ve hızlı ekstraksiyon sağladığı, orta dereceli sıcaklıklarda uygulanabilir olduğu, temizleme adımlarını ortadan kaldırdığı ve zararlı organik çözücülerin kullanımını önlediği kayıtlara geçmiştir. Süperktirik akışkan olarak kullanılabilecek maddeler, karbondioksit (CO_2), etilen, propilen, *n*-hekzan, amonyak, nitröz asit, etan ve su olarak belirlenmiştir. CO_2, bitkilerden uçucu yağları çıkarmak ve izole etmek için ideal bir çözücü olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, en güvenli ve en çok kullanılan süperkritik akışkan olarak CO_2 kayıtlara geçmiştir. Patlayıcı ve toksik olmaması, kolayca bulunabilmesi ve ekstrakte edilen ürünlerden kolayca elimine edilebilir olması karbondioksit kullanımının avantajları olarak öne sürülmüştür. Genel olarak, süper kritik sıvı ekstraksiyonun verimliliği, akış hızı, basınç, sıcaklık, ekstraksiyon süresi dahil olmak üzere bir dizi parametreye bağlıdır (Yousefi ve ark., 2019; Güven, 2019).

Uçucu bileşiklerin süperkritik akışkan ekstraksiyonu için kullanılan bitkisel materyal normalde katıdır, ancak bazı durumlarda, örneğin narenciye türlerinin uçucu yağlarının elde edilmesi işleminden sonra sıvı formun da bu ekstraksiyon yöntemine tabi tutulabildiği literatüre geçmiştir (Reverchon, 1997).

1.4.2.3. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalgalar, 300 MHz ila 300 GHz arasında değişen frekanslarda iyonlaştırıcı olmayan bir elektromanyetik enerji şeklidir. Mikrodalga ışımasının kullanılmasının temel nedeni numuneyi veya ekstraksiyonda kullanılacak çözücüyü ısıtmaktır ve hem çözücü kullanılan hem de çözücüsüz yapılan ekstraksiyonlarda bu ışıma türünün kullanılabileceği belirtilmiştir. Çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda, çözücünün çözme gücü, matriksle etkileşimi, dipol moment kuvveti ve mikrodalga ışımasını absorplama potansiyeli ekstraksiyonun kalitesini etkileyen önemli faktörler olarak değerlendirilmiştir. Çözücüsüz yapılan mikrodalga ekstraksiyonunda ise taze bitkisel materyale çözücü eklenmeden kuru distilasyon metotuyla ekstraksiyonun gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Dülger ve ark., 2018).

Stashenko ve arkadaşları tarafından geliştirilen, mikrodalga destekli hidrodistilasyon, tamamen klasik hidrodistilasyon prensibine dayanmaktadır; hidrodistilasyon montaj hattının bir kısmı mikrodalga fırına yerleştirilir. Bir yan deliği olan bir ev tipi mikrodalga fırının içine bir hidrodistilasyon aparatı yerleştirilir, fırının içerisine yaklaşık 2 L hacminde balon konulmaktadır. Balonun içerisine seçilmiş olan bitkisel materyal uygun ağırlıkta tartılarak konur ve yeterli miktar su ilavesi balona yapılır. Fırın belirlenen güçte ekstraksiyon için belirlenen süre boyunca çalıştırılmaktadır. Uçucu yağ, kondensattan boşaltılır ve susuz sodyum sülfat ile kurutulur (Chemat ve Cravotto, 2012).

Çözücü içermeyen mikrodalga ekstraksiyon teknolojisi, atmosferik basınçta çözücü ve su olmadan mikrodalga fırınlar tarafından uygulanabilen uçucu yağ ekstraksiyonu için en yeni tekniklerden biri olarak kayıtlara geçmiştir. Sistem temel olarak, yalnızca işlenecek bitkisel materyalin yerleştirildiği bir reaktör, bir mikrodalga fırın, bir soğutma sistemi ve uçucu yağın geri kazanıldığı bir esans kabı olmak üzere dört bölümden oluşmaktadır (Chemat ve Cravotto, 2012).

1.4.2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu olarak da adlandırılmaktadır. Bitkisel materyal üzerine 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Uygulanan titreşimler, sıvı maddenin arasından geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana geldiği belirlenmiştir. Kavitasyon aracılığıyla sıvı içerisinde çok sayıda minik kabarcıklar üretilir ve bu kabarcıklar sayesinde bitkisel materyal mekanik olarak sarsılarak partiküller kopar (Büyüktuncel, 2012).

Uygulanan ultrasonik gücün, yalnızca ekstraksiyon verimini daha kısa sürelerde artırmakla kalmayıp, aynı zamanda bazı durumlarda nihai ürünlerin oranını değiştirerek ekstraksiyon üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceği ortaya konmuştur (Esclapez, 2011).

1.4.3. Mekanik Yöntemler

Soğuk presleme veya ekspresyon, neredeyse sadece narenciye kabuğundan uçucu yağları çıkarmak için kullanılan en eski geleneksel yöntem olarak kayıtlara geçmiştir. Ekstraksiyon sırasında, yağ keseleri ve bezleri parçalanır ve mezokarpın dış kısmında lokalize olan uçucu yağlar serbest kalır. Bu yağ, sulu bir emülsiyon verecek şekilde soğuk presleme ile mekanik olarak uzaklaştırılır. Uçucu yağ daha sonra santrifüjleme ile geri kazanılır (El Asbahani ve ark., 2015; Stratakos ve ark., 2016; Bhadra ve Parida, 2021).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

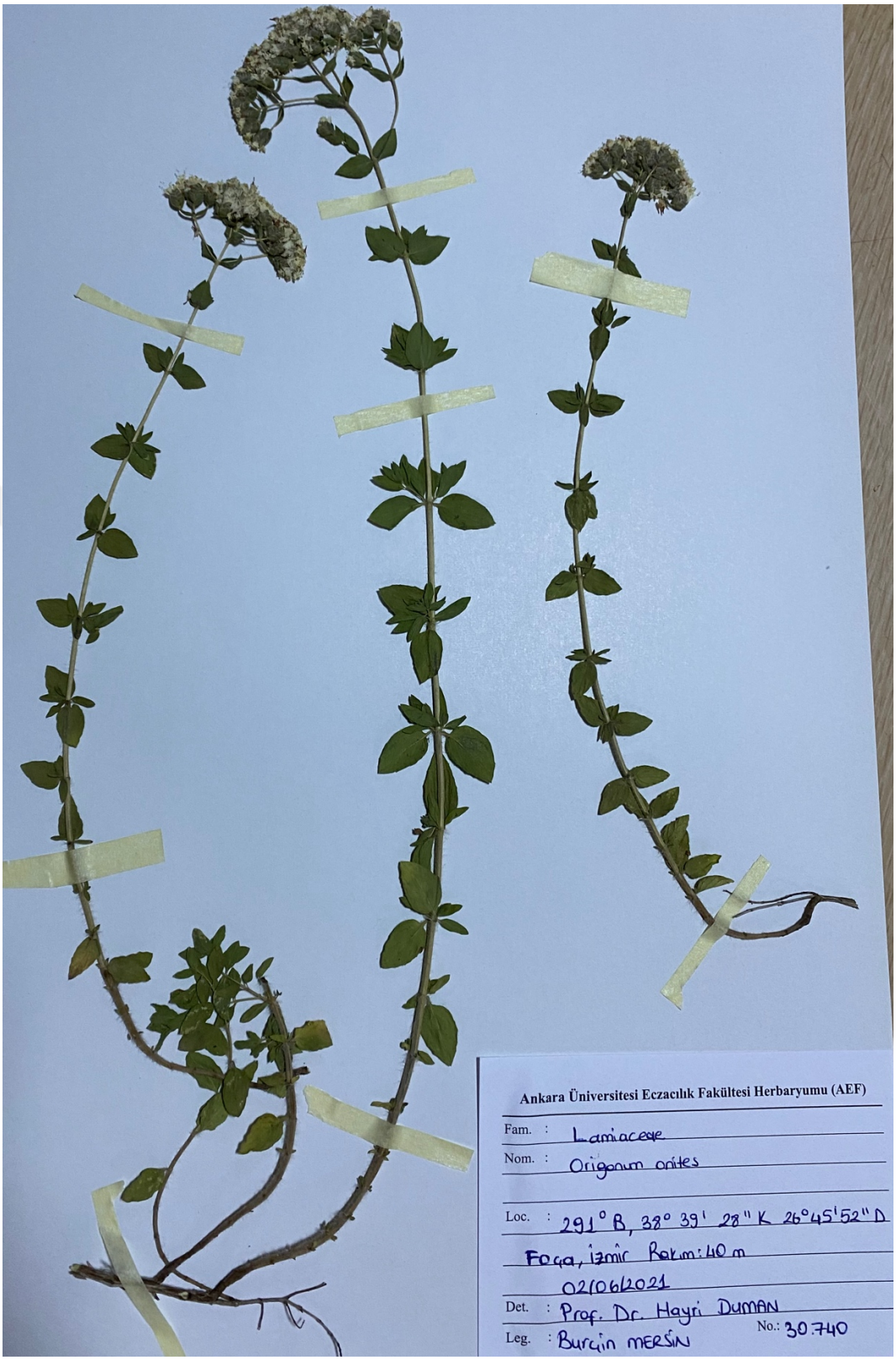
2.1. Bitkisel Materyal

O. onites L. bitkisinin toprak üstü kısımları, 2 Haziran 2021 tarihinde İzmir İli Foça İlçesi'nden 40 metre yükseklikten toplanmıştır. Bitki toplanırken, herbaryum için hazırlanan örnekler uygun şekilde preslenerek, kurutulmuştur. Herbaryum örnekleri Prof. Dr. Hayri Duman aracılığıyla teşhis edilmiş; saklanmak üzere, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na AEF 30740 koduyla kaydedilmiştir.

Bitkinin toprak üstü kısımları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde uygun şartlarda kurutulduktan sonra öğütülerek distilasyon ve ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 2.1. *Origanum onites* L.



Şekil 2.2. *Origanum onites* L. Herbaryum Örneği

2.2. Fitokimyasal Analizler

O. onites bitkisinin materyal olarak kullanıldığı distilasyon ve ekstraksiyon metotlarının algoritması ile üretim yöntemlerinin kalite üzerinde etkinliği araştırılmıştır. Distilasyon metotu olarak, farklı tip Clevenger aparatları ile ile elde edilen *O. onites* uçucu yağlarının Avrupa Farmakopesi 10.7 'Essential oils' monografına göre test ve analizleri yapılmıştır. Elde edilen uçucu yağların, GC/MS ile yapıları aydınlatılmış ve standartları belirlenmiştir. Uçucu yağlardan elde edilen hidrolatların analizi ise HPLC ile gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon açısından ise, öncelikle literatür taraması yapılarak uygun veriler toplanmış, seçilen ekstraksiyon yöntemi ile uyumlu olarak bitkinin toprak üstü kısımlarının öğütülmüş halinden ekstreler hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerin içeriğinin belirlenmesi ve miktar tayinin yapılması için; HPLC cihazı kullanılmıştır.

2.2.1. Distilasyon Çalışmaları

Bitkisel materyalden su distilasyonu ile uçucu yağ elde etmek ve miktar tayini yapmak için Clevenger tipi aparatlar kullanılmıştır. Öğütülmüş bitkinin 455 gramı uçucu yağ tayin cihazı (UYTC), 387 gramı ise Klasik tip Clevenger (KCC) cihazında kullanılmak üzere ayrılmıştır. UYTC için, 1 litre hacmindeki balonlara 45'er gram bitkisel materyal tartılmış, üzerine 700 mL'er su eklenerek 3 saat süreyle distilasyona devam edilmiştir. KCC için, 2 litre hacmindeki balonlara 90'ar gram toz edilmiş drog tartılmış, üzerlerine 1350'şer mL su eklenerek 3 saat süreyle distilasyon işlemi uygulanmıştır (Sezik ve ark., 2005).

Distilasyon sonucu oluşan uçucu yağların hacmi Clevenger aparatlarından okunarak verim hesabı için kaydedilmiştir. Uçucu yağ tayin cihazında distilasyon sonucunda oluşan hidrolatlar ile Klasik tip Clevenger cihazında distilasyon sonucu oluşan hidrolatlar iki ayrı saklama kabına bölünmüştür ve toplanmıştır. Bu hidrolatlar, -70°C'de analiz edileceği zamana kadar saklanmıştır.

110°C dereceli etüvde 3 saat boyunca porselen kapsül içerisinde susuz sodyum sülfat ısıtılmıştır. Distilasyon işleminden sonra elde edilen uçucu yağlara, olası bir su kalıntısını önlemek amacı ile bir spatül ucu susuz sodyum sülfat ile muame edilmiştir. Cam pastör pipeti ile uçucu yağlar çekilerek, UYTC'den elde edilen uçucu yağlar bir amberli şişeye, KCC'den elde edilen uçucu yağlar başka bir amberli şişeye aktarılmıştır. Şişelerin ağzı parafilm ile sıkıca sarılmış, çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C derecede muhafaza edilmiştir.

2.2.1.1. Gaz Kromatografisi

Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilmiş olan uçucu yağ ve Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilmiş olan uçucu yağ gaz kromatografisine uygulanarak tutunma sürülerine göre ayrılmış ve relatif oranlarına göre değerlendirilmiştir. Uçucu yağların bileşenlerinin bağıl yüzdelerinin belirlenmesi için ise Gaz Kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. İki uçucu yağ için de kullanılan Gaz Kromatografisi koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

Sistem: Agilent 7890B GC System
Kolon: Agilent HP-Innowax (60 m x 0.25 mm iç çap x 0.25 µ film kalınlığı)
Dedektör: Alev İyonlaştırma Dedektörü (FID)
Enjeksiyon sıcaklığı: 250°C
Dedektör sıcaklığı: 250°C
Sıcaklık programı: 60°C (10 dk), 4°C/dk. 220°C (10 dk) 1°C/dk 240°C, 80 dk
Taşıyıcı gaz: Helyum (0.7 mL/dk)

2.2.1.2. Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi

Uçucu yağların bileşenlerinin tanımlanması için Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi yöntemi kullanılmıştır. İki uçucu yağ için de kullanılan Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir:

Sistem: Agilent 7890B GC 5977B Mass Selective Dedector System
Kolon: Agilent HP-Innowax (60 m x 0.25 mm iç çap x 0.25 µ film kalınlığı)
Enjeksiyon sıcaklığı: 250°C
İyon kaynağı sıcaklığı: 230°C
İyonizasyon modu: El
Elektron enerjisi: 70 ev
Kütle aralığı: 35-450 *m/z*
Sıcaklık programı: 60°C (10 dk), 4°C/dk. 220°C (10 dk) 1°C/dk 240°C, 80 dk
Taşıyıcı gaz: Helyum (0.7 mL/dk)
Tanımlamalar: Wiley 9-Nist 11 Mass Spectral Database

2.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Avrupa Farmakopesi 10.0'daki 'Thyme oil, Thymol Type' monografına göre kekik uçucu yağı ibaresi *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L. veya her iki türün karışımının taze çiçekli toprak üstü kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ olarak belirlenmiştir. *O. onites*'den elde edilen uçucu yağlara, monografta referans olarak verilen timol ve karvakrol bileşenleri üzerinden kromatografik analiz gerçekleştirilmesi amaçlanmış ve 'Thyme oil' monografı baz alınarak İnce Tabaka Kromatografisi uygulanmıştır. UYTC ile elde edilen uçucu yağ ve KCC ile elde edilen uçucu yağ, plak üzerine uygulanarak kromatografik analizleri gerçekleştirilmiştir. Uygulama işlemi Silika jel 60 F254 (Merck, 1.05554 20x20) kaplı hazır plaklar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Monografa göre İnce Tabaka Kromatografisinin şartları aşağıda belirtildiği şekildedir.

Test çözeltisi. 0.2 mL incenelecek içerik, *metilen klorür R* içerisinde çözülür ve aynı çözücü ile 10 mL'ye seyreltilir.

Referans çözeltisi. 5 mg *timol R* ve 10 µl *karvakrol*, *metilen klorür R* de deneysel işlemlere başlanmadan hemen önce çözülür ve aynı çözücü ile 10 mL'ye seyreltilir.

Plak. İTK silika jel plak R
Mobil faz: Metilen klorür R
Uygulama: 10 µl bantlar halinde.
Sürüklenme: 12 cm lik bir yol boyunca
Kurutma: Havada.

Tespit (Türevlendirme): 200 mm kare bir plaka için *Anisaldehit R* çözeltisinden 10 mL kullanılarak püskürtün ve 10 dakika boyunca 100-105 °C'de ısıtın.

Sonuçlar: Referans çözelti ve test çözelti ile elde edilen kromatogramlarda bulunan bölgelerin sırasına bakınız. Ayrıca, test çözeltisi ile elde edilen kromatogramın alt üçte birlik kısmında ve üst kısmında başka bölgeler mevcuttur. Timol, plakanın üst taraflarında turuncu-kahverengi bir leke oluştururken, karvakrol daha altta turuncu-gri bir leke oluşturur.

2.2.2. Ekstraksiyon Çalışmaları

2.2.2.1 Ekstraksiyon Yöntemi

O. onites L.'nin uygun şekilde kurutularak toz edilmiş toprak üstü kısımlardan 500,69 gram tartılmıştır. Ekstraksiyon için toplamda üç tane olmak üzere sırasıyla *n*-hekzan, etil asetat ve metanol çözücüleri kullanılmıştır. Drog her bir çözücü ile toplamda 72 saat maserasyona bırakılacak şekilde deneyler planlanmış olup toplam ekstraksiyon süresi 9 gün sürmüştür (Pizzale ve ark., 2002; Tepe ve ark., 2016).

1. gün 500,02 gram tartılan drogun üzerine 2 L *n*-hekzan eklenerek 8 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında, 150 rpm'de ekstre edilmiş daha sonrasında 16 saat boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakılmıştır. Toplam 24 saatlik ekstraksiyon süresinin ardından, pileli süzgeç kağıdından süzülmüştür. Drog üzerinde aynı işlemler 2. ve 3. gün de tekrarlanmıştır. Üç günün sonunda toplamda 6

L *n*- hekzan kullanılmış olup 24 saatte bir çözücüsü değiştirilerek elde edilen tüm *n*-hekzanlı ekstreler aynı şişe içerisinde toplanmıştır.

4. gün drogun üzerine 2 L etil asetat çözücüsü ilave edilerek 8 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında, 150 rpm'de ekstre edilmiş daha sonrasında 16 saat boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakılmıştır. Toplam 24 saatlik ekstraksiyon süresinin ardından, pileli süzgeç kağıdından süzülmüştür. Drog üzerinde aynı işlemler 5. ve 6. gün de tekrarlanmıştır. Üç günün sonunda toplamda 6 L etil asetat kullanılmış olup 24 saatte bir çözücüsü değiştirilerek elde edilen tüm etil asetatlı ekstreler aynı şişe içerisinde toplanmıştır.

7. gün drogun üzerine 2 L metanol çözücüsü ilave edilerek 8 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında, 150 rpm'de ekstre edilmiş daha sonrasında 16 saat boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakılmıştır. Toplam 24 saatlik ekstraksiyon süresinin ardından, pileli süzgeç kağıdından süzülmüştür. Drog üzerinde aynı işlemler 8. ve 9. gün de tekrarlanmıştır. Üç günün sonunda toplamda 6 L metanol kullanılmış olup 24 saatte bir çözücüsü değiştirilerek elde edilen tüm metanollü ekstreler aynı şişe içerisinde toplanmıştır.

Elde edilen *n*-hekzanlı, etil asetatlı ve metanollü ekstreler, 45 ^{0}C'yi geçmeyecek sıcaklıkta, ayrı ayrı olacak şekilde rotavapor yardımıyla çözücüsünden kurtarılmıştır.

Hazırlanan ekstrelerin uygun miktarları, fitokimyasal analizler için HPLC de analiz edilmek üzere 4 ^{0}C'de saklanmıştır.

2.2.2.2. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

HPLC kullanılarak yapılan analizlerde; *O. onites* L.'den hareketle hazırlanan ekstrelerinin analizi gerçekleştirilerek fitokimyasal içeriği incelenmiştir. Bitkisel materyalden hazırlanan numune çözeltileri, standart maddelerden hazırlanan stok

çözeltiler ile karşılaştırılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır (Özkan ve Özcan., 2014; Askun ve ark., 2009).

2.2.2.2.1. Analiz Yöntemi

Deneysel çalışmamızda, *O. onites* L.'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzanlı, etil asetatlı, metanollü ekstrelerinin ve standart maddelerin analizleri HPLC ile yapılmıştır. Ayrım için, Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP) (GL Sciences InterSustain Made in Japan) ters faz dolgu maddeli kolon kullanılmıştır. Literatür taraması yapıldıktan sonra, pik ayrımının en iyi olduğu şekilde yöntemler modifiye edilerek analiz işlemleri yapılmıştır. Analizler, 230 nm ve 330 nm dalga boyları arasında gerçekleştirilmiştir. Çözücü sistemi olarak %0,1 formik asit/deiyonize su (Hareketli faz A) ve asetonitril (Hareketli faz B) kullanılmıştır. Çözücü sistemi ile 19 adet fenolik bileşik taranmıştır. Aynı çözücü sistemi kullanılarak iki farklı metot oluşturulmuştur. Gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, epikateşin, p-kumarik asit, ferulik ait, salisilik asit, sikorik asit, apigenin-7-glukozit, sinamik asit, kersetin ve naringenin için analizlerde kullanılan gradient elüsyon sistemi Çizelge 2.1'de verilmiştir. Timol, karvakrol, arbutin, rutin ve hesperidin ise Çizelge 2.2'da verilen metot ile taranmıştır.

Çizelge 2.1. HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi 1

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (ml/dak)
00,1	95	5	1.0
7	90,5	9,5	1.0
20	83	17	1.0
35	60	40	1.0
40	100	0	1.0
40,01		Stop	1.0

Çizelge 2.2. HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi 2

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (ml/dak)
00,1	90	10	1.0
10	60	40	1.0
20	30	70	1.0
25	100	0	1.0
25,01		Stop	1.0

2.2.2.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

19 adet standart maddenin mg cinsinden uygun tartımları alınmış ve tüm standartların çözelti derişimi 1 mg/mL olacak şekilde çözücü ilavesi yapılmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek çözülmüştür. Çözücü olarak, standartların polaritesine göre en iyi çözünebildiği sistemler literatür verileri doğrultusunda denenerek test edilmiştir. Bu doğrultuda; metanol, asetonitril ya da metanol:asetonitril sistemi çözücü olarak kullanılmıştır.

2.2.2.2.3. HPLC Analiz Şartları

Cihaz : Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus
Kolon : Phenylhexyl 4.6 x 150 mm, 3 µm (UP)
Hareketli Faz A: %0,1 formik asit/deiyonize su
Haraketli Faz B: Asetonitril
Kolon Sıcaklığı : 30 ^{o}C (sıcaklık kontrollü)
Dedektör : DAD
Akış Hızı : 1 ml/dk
Enjeksiyon Miktarı : 10 µl

Analizler için çözücü sistemi hazırlanırken YBSK saflığında asetonitril kullanılmıştır. Çözücüler, 0.45µ filtreden süzülerek sisteme verilmiştir. Kullanılan iki çözücü de sisteme verilmeden önce ultrasonik banyo içerisinde degaze edilmiştir.

2.2.2.2.4. Eksternal Standart Yöntemi ile Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayinleri

Fenolik bileşiklerin analizi için, enjeksiyonlar yapılarak doğru denklemlerinin elde edilebilmesi için uygun dalga boyları ayarlanmıştır. Bitkisel materyalden elde edilmiş ekstreler üç kere sisteme uygulanmış ve verilerin göstergesi doğrultusunda pik alanları uygun konsantrasyon değerleri ile eşleştirilerek miktarlar hesaplanmıştır. Bulunan konsantrasyon değerleri doğrultusunda, *O. onites*'in toprak üstü kısımlarından hareketle hazırlanan ekstrelerde, analizi yapılan bileşiklerin % miktarları hesaplanmıştır (Gökbulut, 2011).

Sikorik Asite Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

1,1 mg sikorik asit hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan sikorik asit miktarı ölçülmüştür. Sikorik asit için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 327 nm olarak tespit edilmiştir.

Sinamik Asite Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

6,1 mg sinamik asit hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden

hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan sinamik asit miktarı ölçülmüştür. Sinamik asit için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 276 nm olarak tespit edilmiştir.

Kersetine Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

3,0 mg kersetin hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan kersetin miktarı ölçülmüştür. Kersetin için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 254 nm olarak tespit edilmiştir.

Naringenine Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

3,7 mg naringenin hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit

edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan naringenin miktarı ölçülmüştür. Naringenin için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 288 nm olarak tespit edilmiştir.

Arbutine Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

2,6 mg arbutin hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan arbutin miktarı ölçülmüştür. Arbutin için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 283 nm olarak tespit edilmiştir.

Rutine Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

4,3 mg rutin hassas hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan rutin miktarı ölçülmüştür. Rutin için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 254 nm olarak tespit edilmiştir.

Hesperidine Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

2,6 mg hesperidin hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan hesperidin miktarı ölçülmüştür. Hesperidin için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 283 nm olarak tespit edilmiştir.

Karvakrole Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

12,1 mg karvakrol hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek, 3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan karvakrol miktarı ölçülmüştür. Karvakrol için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 275 nm olarak tespit edilmiştir.

Timole Ait Doğru Denkleminin Hesabı ve Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

3,2 mg timol hassas ölçüm olacak şekilde tartılmıştır. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti yapılmıştır. Bu stok çözelti 10 µl mikropipet ile çekilerek,

3 kere bu işlem tekrarlanacak şekilde sisteme verilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanıp uygulanmıştır. Enjeksiyon işleminden sonra görüntülenen pik alanlarının ortalaması alınmıştır. Pik alanlarının ortalamasına karşılık gelen konsantrasyon üzerinden eğri çizimi gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi çizilerek, standart maddeye ait r^2 değeri tespit edilmiş ve doğru denklemi oluşturulmuştur. Doğru denklemi üzerinden ekstreler içerisinde yer alan timol miktarı ölçülmüştür. Timol için analiz çalışmalarında kullanılabilecek ideal dalga boyu 275 nm olarak tespit edilmiştir.

2.3. Farmakope Analizleri

Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografında bulunan ek testler, farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen *O. onites* L. uçucu yağları üzerinde uygulanmıştır (European Pharmacopoeia, 2019).

2.3.1. Bağıl Yoğunluk (2.2.5)

Bağıl yoğunluk veya yoğunluk, bileşiğin 20 °C'deki birim hacminin kütlesi olarak tanımlanmıştır. *O. onites* L. uçucu yağlarının bağıl yoğunlukları, monografta belirtilen basamaklara kadar duyarlılıkta, piknometre (katılar veya sıvılar) kullanılarak ölçülmüştür. Uçucu yağların bağıl yoğunlukları hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

W_1= Kuru, temiz, kalibre edilmiş (ağırlık farkı ≤ 0.0005 g) ve boş olan piknometrenin ağırlığı

W_2= 20 °C'deki distile su ile doldurulmuş piknometrenin ağırlığı

W_3= 20 °C'deki uçucu yağ ile doldurulmuş piknometrenin ağırlığı

$$d_{\text{uçucu yağ}} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1}$$

2.3.2. Kırılım İmleci (2.2.6)

Refraktometreler normal olarak sınır açısını ölçer. Bu cihazda temel kısım, incelenecek sıvıyla temasta olan, kırılım imleci bilinen bir prizmadır. Örneklerin kırılım imlecini ölçmek için Carl Zeiss Jena A.U.D/ 0533 marka refraktometre kullanılmıştır. Cihaz, gün ışığına yönlendirilmiş, aynasını sağa sola çevirerek okülerden bakan göze ışığın en fazla gelmesi sağlanmıştır. Prizmalar, %70'lik etanol çözeltisi ile ıslatılmış, yumuşak bir bezle temizlenmiş ve kurulanmıştır. Saf su ile Brix derecesinin "0" ayarı yapılmıştır. Analiz edilecek uçucu yağ cam pastör pipeti ile alınarak birkaç damla refraktometreninin prizma bölgesine damlatılmış ve hemen üstteki prizma yavaşça kapatılmıştır. Okülerden bakılarak netleştirme işlemi yapılmasının ardından refraktometredeki aydınlık ve karanlık bölgeler tam eşitlenerek çizginin sabit kaldığı noktadan kırılma indisi değeri okunmuştur ve kaydedilmiştir. Okuma işlemi bittikten sonra yağlı prizma yüzeyi %70'lik etanol çözeltisi ile temizlenmiştir.



Şekil 2.3. Refraktometre

2.3.3. Optik Çevirme (2.2.7)

Optik çevirme, polarize ışığın polarizasyon düzlemini çeviren kiral bileşiklerin sahip olduğu bir özelliktir. Analizlerde Jinan Hanon Instruments markasının P810

modeli polarimetresi kullanılmıştır. Uçucu yağların optik çevirme değerlerini ölçmek için öncesinde distile su ile polarimetrenin sıfır ayarı yapılmıştır. Uçucu yağın sıcaklığı 20°C olarak ölçüldükten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde polarimetre tüpüne konmuştur.



Şekil 2.4. Polarimetre

2.3.4. Donma Noktası (2.2.18)

Avrupa Farmakopesi 10.7'de belirlenmiş olan standartlara uygun aletler kullanılarak uçucu yağların donma noktaları tespit edilmiştir. Yaklaşık olarak 25 mm çapında ve 150 mm uzunluğunda olan bir tübün yaklaşık 40 mm çapında ve 160 mm uzunluğunda bir başka deney tübünün içine yerleştirilmesiyle oluşan bir düzenek kurulmuştur. İç tüp yaklaşık 175 mm uzunluğunda ve 0.2 °C taksimatlı bir termometre taşıyan bir kapakla kapatılmıştır. Termometrenin haznesi tüpün alt kısmından 15 mm yukarıda olacak şekilde ayarlanmıştır. Kapak kısmında ise, cam materyalden yapılmış bir karıştırıcı çubuğun gövdesinin geçebileceği bir delik bulunmaktadır. İç tüpe incelenecek olan uçucu yağ termometrenin haznesini kaplayacak şekilde konulmuş, hızla soğutularak yaklaşık donma noktası saptanmıştır. Sonrasında, iç tüp, son birkaç kristal dışında maddenin tümü eriyinceye kadar yaklaşık donma noktasının 5 °C üstünde olan bir banyoya konulmuştur. Beher, öngörülen donma noktasında 5 °C düşük sıcaklıkta olan su ile doldurulmuştur. İç tüp dış tübün içine yerleştirilmiş ve

birkaç aşı kristalinin varlığından emin olarak katılaşıncaya kadar iyice karıştırılmıştır. Katılaşma sırasında gözlenen en yüksek sıcaklık kayıt edilmiştir.



Şekil 2.5. Donma Noktası Tayin Aleti

2.3.5. Asit Değeri (2.5.1)

Avrupa Farmakopesi 10.7'ye göre belirlenen parametreler doğrultusunda uçucu yağın asit değeri hesaplanmıştır. Uçucu yağların asit değeri hesaplanırken tayinde şu formül kullanılmıştır.

$$I_A = \frac{5.611 \times n}{m}$$

I_A (Asit değeri): 1 g yağdaki serbest asitleri nötralize etmek için gereken potasyum hidroksit miktarını miligram olarak ifade eden sayı

m: 10.00 g veya önceden tarif edilen miktardaki incelenecek madde (g)

n: Pembe renk en az 15 saniye süreyle kalana kadar, 0.1 M potasyum hidroksit ile yapılan titrasyonda harcanan titrant (mL)

Fenolftalein çözeltisi R1: Etanol (%96) R içerisinde 10 g/L konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır.

Petroleteri R3: Distilasyon sıcaklığı 100-120 °C arasında olan ve maksimum %0,03 oranında su içeren petroleteri deneysel çalışmada kullanılmıştır.

Farmakope'ye göre; 10.00 g miktardaki incelenecek uçucu yağ (*m* g), belirteç olarak 0.5 mL fenolftalein çözeltisi R1 kullanılarak, önceden 0.1 M potasyum hidroksit ile nötralize edilmiş, etanol (%96) R ve petroleteri R3'ün eşit hacimli çözeltisinin 50 mL'sinde çözülmüştür. İncelenecek uçucu yağ çözündüğünde, pembe renk en az 15 saniye süreyle kalana kadar, 0.1 M potasyum hidroksit ile titre edilmiştir (n mL titrant).



Şekil 2.6. Asit değeri hesabı

2.3.6. Peroksit değeri (2.5.5)

Avrupa Farmakope'si 10.7'de bulunan 'Essential oils' monografına göre uçucu yağların peroksit değerleri hesaplanırken monograftaki yöntem A metodu kullanılmıştır. Monografa göre kullanılacak yöntem belirtilmediyse, yöntem A uygulanmalıdır. 5.00 g incelenecek olan uçucu yağ (*m* g) 250 mL şilifli cam kapaklı erlen içerisine konmuştur. 2 hacim kloroform R ve 3 hacim glasiyel asetik asit R karışımından stok çözeltisi hazırlanmış ve deneysel uygulamada bu karışımdan 30 mL ilave edilmiştir. Uçucu yağı çözmek için çalkalama işlemi gerçekleştirilmiş olup ardından 0.5 mL doygun potasyum iyodür çözeltisi R eklenmiştir. Tam 1 dakika süreyle çalkalanmış, sonra 30 mL su R eklenmiştir. Titrasyon için 0.01 M sodyum tiyosülfat çözeltisi hazırlanarak, 50 mL hacimli dereceli bürete doldurulmuştur. Titrantı yavaşça ekleyerek ve sürekli çalkalayarak, sarı renk neredeyse kaybolunca

kadar 0.01 M sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titrasyon yapılmıştır. 5 mL nişasta çözeltisi R eklenmiş ve renk kaybolunca kadar kuvvetli çalkalayarak titrasyona devam edilmiştir (n_1 mL 0.01 M sodyum tiyosülfat). Aynı koşullar altında karşılaştırılmalı bir test yapılması için kör deneyi gerçekleştirilmiştir. Kör deneyinde uçucu yağ olmadan 250 mL şilifli cam kapaklı erlen içerisinde tüm aşamalar baştan sona sırası ile tekrarlanmıştır. Kör deneyinde, aynı koşullar altında titrasyon gerçekleştirilmiştir (n_2 mL 0.01 M sodyum tiyosülfat).

Avrupa Farmakopesi 10.7' ye göre uçucu yağların peroksit değeri aşağıdaki denkleme göre hesaplanır:

$$I_p = \frac{10\,(n_1 - n_2)}{m}$$

I_p = Peroksit değeri

n_1 = Titrasyonda harcanan toplam harcananan 0.01 M sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL cinsinden hacmi

n_2 = Aynı koşullar altında karşılaştırma testinde harcananan 0.01 M sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL cinsinden hacmi

m = İncelenen numunenin gram olarak ağırlığı

İncelenecek maddesi kütlesi gram olarak 5.00-2.00 aralığında bulunuyorsa, hesaplanan peroksit değeri I_p, 0-12 arasında bir değer olmalıdır.

2.3.7. Uçucu Yağlarda Yabancı Ester Aranması (2.8.6)

1 mL uçucu yağ numunesi alınarak taze hazırlanmış olan alkol R içinde 100 g/L potasyum hidroksit R çözeltisinden 3.0 ml ilave edilerek, su banyosunda 2 dakika bekletilmiştir. 30 dakika bekletilmiş ardından soğutulmuş ve kristal yapının meydana gelip gelmediği detaylı olarak incelenmiştir.

2.3.8. Uçucu Yağlarda Uçurma Artığı (2.8.9)

Avrupa Farmakopesi 10.7'de belirtilmiş olan standartlara uygun şekilde bir cihaz ile uçucu yağlarda uçurma artığı miktarları hesaplanmıştır. Buna göre; 70 mm çapında, delikli, kapaklı su banyosu kullanılmıştır. Uçucu yağ içeriği ile etkileşmeyen (inert) ısıya dayanıklı cam buharlaştırma kabı kullanılmıştır. En son aşamada ise metoda göre soğutma ve tartım işlemleri için desikatörden yararlanılmıştır. Buharlaştırma kabı su banyosunda 1 saat ısıtıldıktan ve desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır. Örnek olarak kullanılacak uçucu yağdan 5.00 g kap içerisine tartılmıştır. Yağ, kaynar su banyosu üzerinde ve hava akımı olmayan ortamda belirtilen süre ısıtılmıştır. Ardından desikatörde soğutularak tartılmıştır. Deney sırasında su banyosundaki su seviyesi kapağın 50 mm altında olacak şekilde tutulmuştur.

2.3.9. Uçucu Yağlarda Su Aranması (2.8.5)

Avrupa Farmakope'si 10.7'de belirtilmiş olan standartlara göre, incelenecek olan uçucu yağdan 10 damla bir deney tüpü içerisine alınmıştır. Üzerine 1 mL karbon disülfür R ilave edilerek karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözelti bekletilerek berraklığı test edilmiştir.

2.3.10. Uçucu Yağların Alkoldeki Çözünürlükleri (2.8.10)

Avrupa Farmakope'si 10.7'de belirtilmiş olan standartlara göre, 1.0 mL uçucu yağ 25 mL'lik cam kapaklı bir mezüre konmuştur. Ortam sıcaklığı 20 ± 0.2 °C olacak şekilde ayarlanmış bir etüvün içerisine yerleştirilmiştir. 50 mL kapasitesi olan bir büret yardımıyla monografta derecesi belirtilen alkolden 0.1 mL'lik porsiyonlar halinde çözelti oluşana kadar; daha sonra 0.5 mL'lik porsiyonlar halinde toplam 20 mL'ye kadar alkol ilavesine, sık sık ve kuvvetli biçimde çalkalayarak devam edilmiştir. Berrak bir çözelti elde edildiğinde, ilave edilen alkol miktarı kaydedilmiştir.

2.4. Aktivite Testleri

2.4.1. Antioksidan Aktivite

O. onites bitkisinden hareketle elde edilmiş olan uçucu yağlar, uçucu yağların hidrolatları ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi; DPPH radikal süpürücü aktivite metotu kullanılarak in-vitro ortamda test edilmiştir (İnan, 2021).

2.4.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi

Antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin aktivitesini ölçmek için, kararlı ve sentetik DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntem olarak belirlenmiştir. Koyu mor renkli bir radikal olan olan DPPH bileşiği, bulunduğu ortamda antioksidan varlığında indirgenerek daha açık renkli DPPH indirgenmiş molekülüne dönüşmektedir. İndirgenmemiş koyu mor renkli hali 517 nm'de maksimum absorbans verirken, indirgenmiş molekülünün absorbansı düşmektedir (Bayram ve ark., 2019). Numunelerin DPPH radikal süpürme aktivitesi 96 kuyucuklu mikroplakalar içerisinde belirlenmiştir. İlk başta, metanol içerisinde 150 µM DPPH çözeltisi taze olarak, amberli şişe içerisine hazırlanmıştır. Daha sonrasında 200 µL DPPH solüsyonu 25 µL numune solüsyonu ile birleştirilmiştir. Mikroplakalar içerisindeki karışımlar, karanlık oda sıcaklığında 50 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümü 540 nm'de gerçekleştirilmiştir. Standart olarak BHT (Bütillenmiş Hidroksi Toluen) 31,25, 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında kullanılmıştır. Numune olarak kullanılacak ekstrelerin konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde ayarlanarak sonikatör yardımıyla çözünmeleri sağlanmıştır. Uçucu yağlar ise 0,2 mg/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. Metanol kör olarak mikroplakalar içerisine ilave edilmiştir. Numunelerin aktivitesi, %50 aktivite gösteren konsantrasyona karşılık gelen IC_{50} değerleri olarak sunulmuştur (İnan, 2021). DPPH % İnhibisyon konsantrasyonu değeri şu formül ile hesaplanmıştır:

DPPH % İnhibisyon: [(A0-A1)/A0] x 100

A0: DPPH çözeltisinin reaksiyon öncesi 540 nm'de okunan absorbans değeri
A1: DPPH çözeltisinin reaksiyon sonrası 540 nm'de okunan absorbans değeri

2.4.2. Antibakteriyel Aktivite

Antibakteriyel aktivite testlerinde Gram- negatif test bakterisi olarak *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılırken, Gram-pozitif test bakterisi olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, türleri kullanılmıştır.

O. onites'in topraküstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstreleri, metanol/su (50:50, v/v) içerisinde çözülmüş ve "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından önerilen broth mikrodilüsyon metotu kullanılarak antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir (CLSI, 2009). Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi için Broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Muller Hinton Broth (Difco, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) besiyerinde bakteri suşları üretilmiştir. Bitkinin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin konsantrasyon dereceleri; 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,5625 mg/ml olarak ayarlanmıştır. İnokulumlar, 24 saat boyunca alt kültürlerden hareketle hazırlanmıştır. Mikroplakalar, 18-24 saat boyunca 35 °C'de inkübe edilmiştir. Bakterilerin son konsantrasyonu, $5x10^5$ CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteriler için standart bileşik olarak Ampisilin, Siproflokzasin ve Ofloksasin kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, sadece inoküle edilmiş Broth ve ve metanol/su (50:50, v/v) içeren bir dizi kuyu kullanılmıştır. Bakterilerin üremesini engelleyen en düşük konsantrasyonları minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) olarak tespit edilmiştir.

O. onites'ten elde edilen uçucu yağlar ve hidrolatların da minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin belirlenmesi için, broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Yüzey aktif madde olarak Tween 80 kullanılarak, Muller Hinton Broth (Difco, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) besiyerinde, 1/2 oranında seyreltmeler yapılarak nihai konsantrasyon %0,5 (h/h) olacak şekilde test edilecek uçucu yağlar ve hidrolatlar ayarlanmıştır. İnokulumlar, 24 saat boyunca alt kültürlerden hareketle hazırlanmıştır. Mikroplakalar, 18-24 saat boyunca 35 °C'de inkübe edilmiştir. Bakterilerin son konsantrasyonu, $5x10^5$ CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece Tween 80 ile desteklenmiş inoküle edilmiş Broth içeren bir kuyu seti kullanılmıştır.

2.4.3. Antibiyofilm Aktivite

Biyofilm, bakteri, küf, maya, mavi yeşil algler tarafından üretilerek salgılanan hücre dışı DNA, ekzopolisakkarit, türlü enzimler, proteinler ve mikroorganizmanın kendisini içeren kompleks yapıdaki matriks olarak tanımlanmıştır (Kartal ve ark., 2021). *O. onites* bitkisinden hareketle elde edilmiş olan uçucu yağlar, uçucu yağların hidrolatları ve ekstrelerin antibiyofilm aktivitesi; kristal viyole yöntemi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerinde, *in vitro* mikroplaka bazlı biyofilm modeli ile belirlenmiştir (Eryılmaz ve ark., 2019; Jardak ve ark., 2021; Bali ve ark., 2019). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI) agarında, 37 ºC'de 24 saat inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. Kuluçka süresinden sonra, ~10^6 CFU/ml *Pseudomonas aeruginosa* içeren nihai inokulum süspansiyonları, %2 sakaroz ile zenginleştirilmiş Beyin Kalp İnfüzyonu içinde hazırlanmıştır. Tüm testler için, 96 kuyucuklu mikroplate içerisindeki kuyucuklara 100 µl inokulum süspansiyonları ilave edilmiştir. Mikroplate içerisinde 37°C'de toplam 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sürecinin sonunda kuyucukların içerisindeki sıvı kısım uzaklaştırılarak, kuyucuklar steril fosfat tamponlu salin (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Uçucu yağların 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml, 3.125 mg/ml, 1.5625 mg/ml'lik seri dilüsyonları propilen glikol ile hazırlanmıştır.

Ekstreler, hidrolatlar ve uçucu yağlar (propilen glikol ile seyreltilmiş), olgun *P. aeruginosa* biyofilmlerini içeren kuyucuklara aktarılmıştır. Mikroplate içerisinde 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyon işleminin ardından, kuyucuklar steril fosfat tamponlu salin (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Yıkanan mikroplaklar oda sıcaklığında 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Biyofilm hücrelerinin boyanması için her kuyucuğa 100 µl %0,5 kristal viyole solüsyonu ilave edilmiştir. 30 dakika sonra kuyucuklar üç kez steril fosfat tamponlu salin ile yıkanmıştır. Boyayı biyofilm matrisinde çözmek için, kuyucuklara aseton-alkol (30:70 v/v) solüsyonu eklenmiştir. Negatif kontrol olarak %2 sakaroz ve %10 DMSO ile zenginleştirilmiş Beyin Kalp İnfüzyonu kullanılmıştır. Çözünmüş kristal viyole boyanın absorbansı, Thermo Scientific Multiskan FC, Vantaa, Finlandiya cihazında 620 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Antibiyofilm aktivite hesabı yüzde indirgeme formülasyonu ile yapılmıştır.

% İnhibisyon = (Akontrol – Aörnek /Akontrol) x 100
Akontrol: Kontrol grubunun 620 nm'deki absorbans değeri
Aörnek: Örnek grubunun 620 nm'deki absorbans değer

2.4.4. Anti-quorum Sensing Aktivite

Anti-quorum sensing aktivite çalışmalarında *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 türü bakteri kullanılarak, testler disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Gajdács ve ark., 2020; Batohi ve ark., 2021). Bakteri suşu bir gecede $1.5x10^8$ CFU/mL yoğunluk oluşturacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra bakteri süspansiyonu Luria Bertani Agar (6 mm çap; Bioanalyse®, Ankara, Türkiye) üzerine ekilmiştir ve yirmi mikrolitre ekstre ile emprenye edilmiş steril boş diskler besiyerine yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak Luria Bertani Broth kullanılmıştır. 30 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, plakalar, bir viyolasin pigmentinin inhibisyon bölgesinin mevcudiyet durumu olup olmadığı ile ilgili gözlemlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Origanum onites* Uçucu Yağının Farklı Tip Clevenger Aparatları ile Eldesi

Laboratuvar ölçeğinde farklı iki tip Clevenger aparatı kullanılarak drogtan su distilasyonu ile uçucu yağ elde edilmiştir. UYTC ile elde edilen ve susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarılan uçucu yağ miktarı 6,48 mL olarak ölçülmüştür. KCC ile elde edilen ve susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarılan uçucu yağ miktarı ise 5,8 mL olarak ölçülmüştür. *O. onites* L.'nin topraküstü kısımlarının uçucu yağ tayin cihazı ile distilasyonunda kullanılan bitki materyalinin miktarı, elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *O. onites* L.'nin topraküstü kısımlarından uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri

Kuru Bitki Miktarı (g)	Elde Edilen Uçucu Yağ Miktarı (mL)	Verim (%)
45,02	0,7	1,5548
45,01	0,6	1,3330
45,00	0,680	1,5111
45,00	0,610	1,3555
45,00	0,690	1,5333
45,00	0,7	1,5555
45,00	0,640	1,4222
45,00	0,610	1,3555
45,01	0,620	1,3774
45,02	0,630	1,3993

Klasik tip Clevenger cihazı ile distilasyonunda kullanılan bitki materyalinin miktarı, elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. *O. onites* L.'nin topraküstü kısımlarından Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağ miktarları ve yüzde verimleri

Kuru Bitki Miktarı (g)	Elde Edilen Uçucu Yağ Miktarı (mL)	Verim (%)
90,01	1,3	1,4442
90,02	1,7	1,8884
90,019	1,5	1,6663
89,885	1,3	1,4462

3.2.1. Gaz Kromatografi/ Kütle Spektrofotometrisi

UYTC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının Gaz Kromatografi/ Kütle Spektrofotometrisi analizi sonuçları Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Uçucu yağ tayin cihazı ve Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrofotometrisi analiz sonuçları

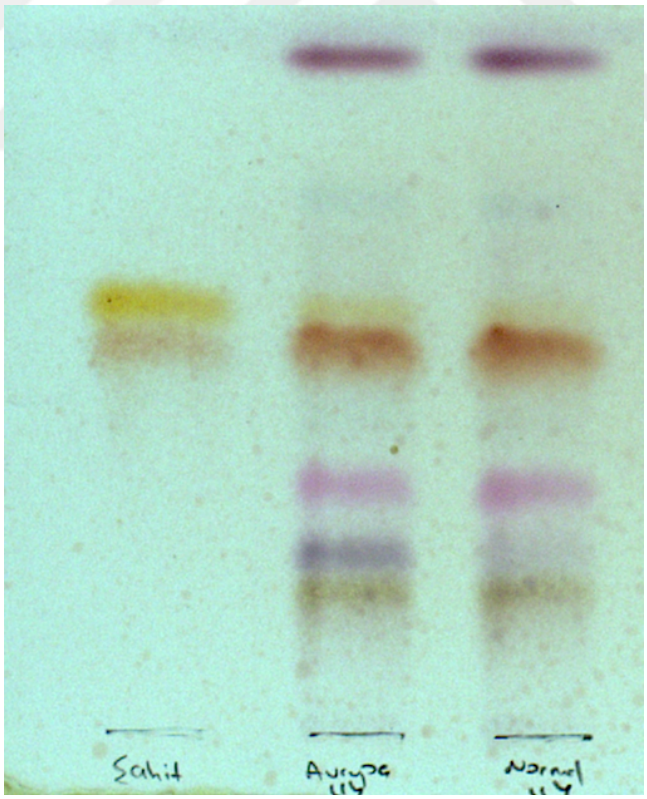
No	Bileşik*	UYTC Bağıl yüzde (%)	KCC Bağıl yüzde (%)
1	*α*-Pinen	0,1	0,1
2	*α*-Tuyen	0,2	0,1
3	Mirsen	0,2	0,2
4	*α*-Terpinen	0,2	0,2
5	γ-Terpinen	0,8	0,8
6	*p*-Simen	0,8	0,8
7	1-Okten-3-ol	0,1	0,1
8	Linalol	0,1	-
9	*cis*-Sabinen hidrat	0,2	0,1
10	Linalil asetat	0,1	-
11	Terpinen-4-ol	0,4	0,4
12	*β*-Karyofillen	0,4	0,4
13	*α*-Terpineol	0,1	0,1
14	Borneol	0,8	0,9
15	*β*-Bisabolen	0,9	0,6
16	Karvon	0,1	0,1
17	Karvakril asetat	0,1	0,1
18	Karyofillen oksit	0,4	0,4
19	Spatulenol	0,3	0,3
20	Timol	1,6	2,9
21	Karvakrol	90,5	79,3
22	*α*-Bisabolol	0,1	-
23	Manoil oksit	0,1	-
24	*cis*-Lanseol	0,1	-
25	(*Z*)-2-Butenal	-	0,1
26	(*E*)-3-Penten-2-on	-	0,1
27	(*E*)-2-Pentenal	-	0,1
28	(*Z*)-3-Hekzenal	-	0,8
29	(*E*)-2-Hekzenal	-	0,6
30	Asetik asit	-	0,2
31	*trans*-Sabinen hidrat	-	0,1
32	Propanoik asit	-	0,1
33	*trans*-*p*-Ment-2-en-1-ol	-	0,1
34	Hekzanoik asit	-	0,3
	Toplam	98,7	90,4

*≥ %0,1

3.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Literatür verilerine göre *O. onites*'in uçucu yağının, fitokimyasal bileşimi genel olarak karvakrol ve timol bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda; tez kapsamında çalışılan *O. onites* bitkisinin uçucu yağlarının ince tabaka kromatografisiyle incelenmesinde, bu bileşiklerin referans olarak kullanıldığı Avrupa Farmakopesi 10.0'daki 'Thyme oil, Thymol Type' monografı baz alınmıştır.

Bitkinin topraküstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların tatbik edildiği plak, metilen klorür çözücü sisteminde sürüklenmiştir; sonuçlar Şekil 3.1'de görülmektedir. Revalatör olarak seçilen monograftaki anisaldehit sülfirik asit çözeltisi ile plak muamele edildiğinde; oluşan ayırımdaki renklerin belirginleşmesi sonucu, uçucu yağların karvakrol ve timol açısından oldukça zengin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Bitkinin uçucu yağlarının, Anisaldehit muamelesi sonucunda görünür alanda TLC kromatogramı

3.4. Ekstraksiyon Çalışmaları

O. onites'in topraküstü kısımlarından ekstraksiyon yöntemine uygun olarak hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstreleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizleri, antioksidan, antibakteriyel, antibiyofilm ve anti-quorum senging aktivitelerin tayininde kullanılmıştır. *O. onites*'in topraküstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, etil asetat ve metanol ekstrelerin yüzde verimleri ve miktarları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. *O. onites*'den elde edilen ekstrelerin verimleri ve miktarları

Ekstre	Kuru Bitki Miktarı (g)	Ekstre Miktarı (g)	Verim (%)
n-Hekzan	500	18,6712	3,7342
Etil asetat	500	15,0222	3,0044
Metanol	500	16,3146	3,2629

3.4.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

3.4.1.1. Standart Bileşiklere Ait Kalibrasyon Eğrileri ve Doğru Denklemleri

Sikorik Asit

Sikorik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.5'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. Sikorik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Sikorik asit	y=7443,82x+72484,6	0,9887105	3,963964	12,01201

Sinamik Asit

Sinamik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.6'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. Sinamik asite ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Sinamik asit	y=75026,0x-11276,0	0,9988811	0,677618	2,053388

Kersetin

Kersetine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. Kersetine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Kersetin	y=26403,4x+1558,71	0,9997869	1,272494	3,856041

Naringenin

Naringenine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.8. Naringenine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Naringenin	y=24207,0x+2212,93	0,9920277	1,314741	3,984064

Arbutin

Arbutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.9. Arbutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Arbutin	y=4410,15x+103229	0,9980308	0,15776	0,478061

Rutin

Rutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.10'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.10. Rutine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Rutin	y=15492,3x+568,094	0,9999745	0,796508	2,413661

Hesperidine Ait Doğru Denklemi

Hesperidine ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.11'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.11. Hesperidine ait R^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Hesperidin	y=13852,6x+692,084	0,9999697	0,578421	1,75279

Karvakrole Ait Doğru Denklemi

Karvakrole ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.12'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.12. Karvakrole ait r^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Karvakrol	y=9273,46x+1363,28	0,9999694	2,68093	8,124031

Timole Ait Doğru Denklemi

Timole ait R^2, doğru denklemi, QOD ve LOD verileri Çizelge 3.13'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.13. Timole ait doğru denklemi, R^2, LOD ve QOD değerleri

Bileşen	Doğru Denklemi	r^2	LOD verisi (mg/ml)	QOD verisi
Timol	y=9586,86x+848,713	0,9999682	2,599474	7,877193

3.4.1.2. Fenolik Madde Miktar Tayini İçin Elde Edilen YBSK Kromatogramları

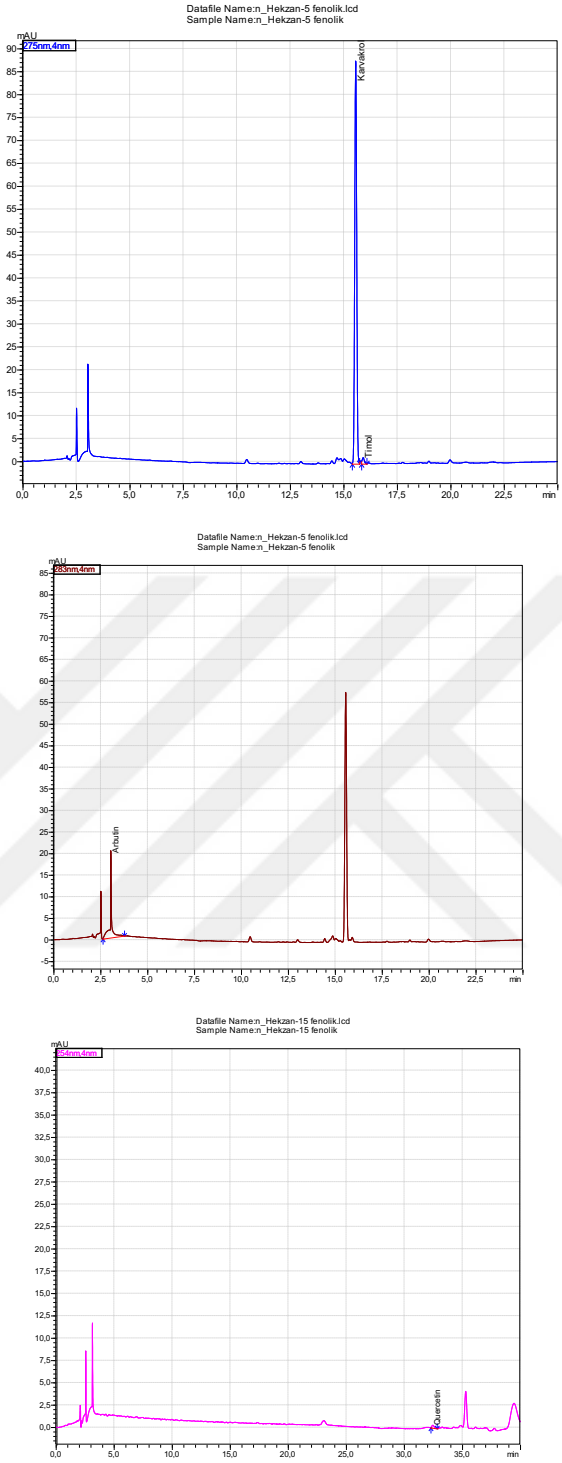
O. onites'in toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerinde, standart maddelerin varlığı, HPLC kromatogramlarındaki piklerin alıkonma zamanları ve UV spektrumları karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

Analizi yapılan standart bileşiklerin retansiyon zamanları da Çizelge 3.14'de verilmektedir.

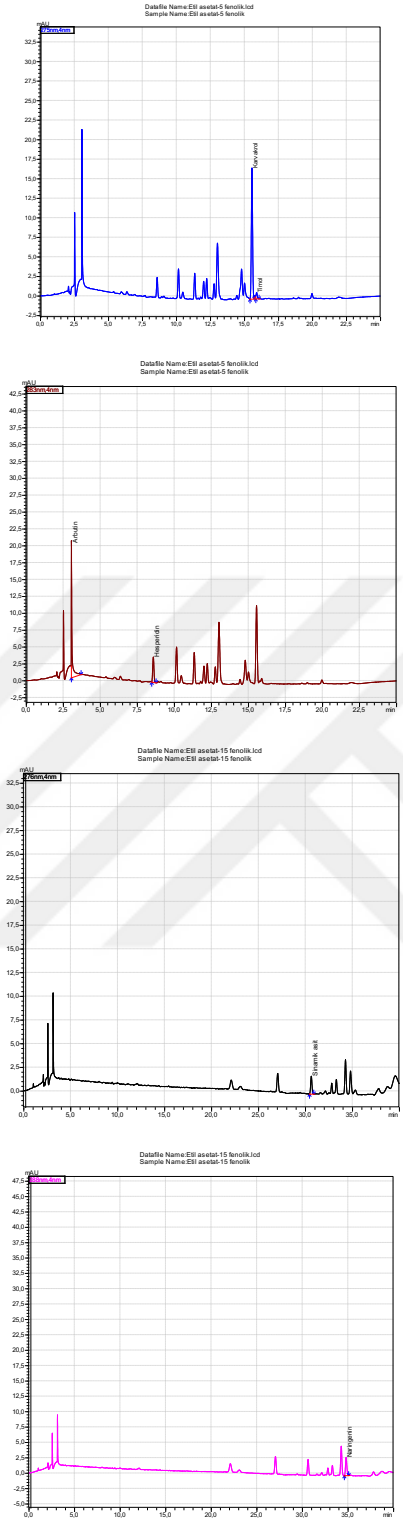
Çizelge 3.14. Standart fenolik bileşiklerin retansiyon zamanları

Standart Bileşik	Retansiyon Zamanı
Gallik asit	4,352
4-hidroksibenzoik asit	10,217
Klorojenik asit	12,073
Vanilik asit	12,437
Kafeik asit	12,850
Epikateşin	14,150
p-kumarik asit	18,486
Ferulik asit	20,971
Salisilik asit	21,929
Sikorik asit	27,011
Apigenin-7-glukozid	27,574
Sinamik asit	30,234
Kersetin	32,008
Naringenin	34,939
Arbutin	3,16
Rutin	7,339
Hesperidin	8,565
Karvakrol	15,52
Timol	15,865

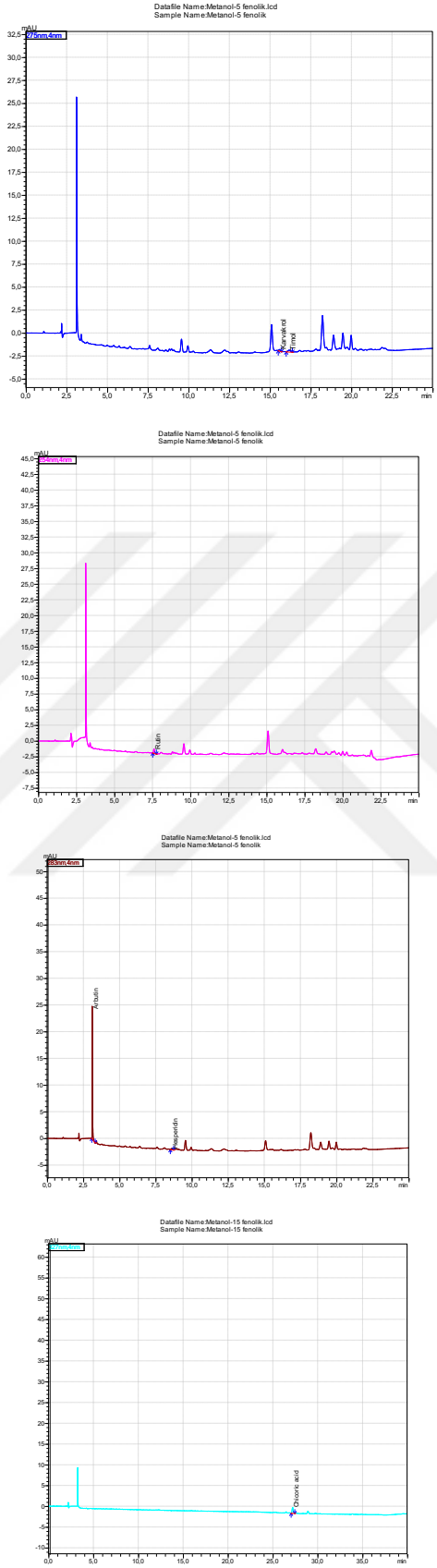
O. onites'ten elde edilen ekstrelerin YBSK kromatogramları Şekil 3.2-3.4'de verilmektedir.



Şekil 3.2. *O. onites* bitkisinin *n*-hekzan ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları



Şekil 3.3. *O. onites* bitkisinin etil asetat ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları



Şekil 3.4. *O. onites* bitkisinin metanol ile hazırlanmış ekstresinin YBSK kromatogramları

O. onites bitkisinin toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstrelerindeki fenolik madde konsantrasyonları Çizelge 3.15'de verilmektedir.

Çizelge 3.15. *O. onites* bitkisinin toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstrelerindeki fenolik madde konsantrasyonları (mg/L)

Konsantrasyon (mg/L)	*n*-hekzan	Etil asetat	Metanol
Gallik asit	-	-	-
4-hidroksibenzoik asit	-	-	-
Klorojenik asit	-	-	-
Vanilik asit	-	-	-
Kafeik asit	-	-	-
Epikateşin	-	-	-
p-kumarik asit	-	-	-
Ferulik asit	-	-	-
Salisilik asit	-	-	
Sikorik asit	-	-	1,129
Apigenin-7-glukozit	-	-	-
Sinamik asit		0,209	-
Kersetin	0,138	-	-
Naringenin	-	0,747	-
Arbutin	20,229	13,411	9,908
Rutin	-	-	0,211
Hesperidin		1,589	0,084
Karvakrol	61,982	11,822	0,100
Timol	0,916	0,543	0,183

3.5. Farmakope Analizleri

Avrupa Farmakopesi 10.7'de yer alan 'Essential oils' monografı esas alınarak *O. onites*'in UYTC ve KCC ile elde edilmiş uçucu yağları farmakope formatında incelenmiştir.

3.5.1. Bağıl Yoğunluk (2.2.5)

Piknometre aracılığı ile yapılan ölçümler sonrasında UYTC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının, 20 °C'de bağıl yoğunluğu 0,9625 olarak hesaplanırken, KCC ile elde edilen uçucu yağın bağıl yoğunluğu 0,9729 olarak olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.16'da verilmiştir.

Çizelge 3.16. *O. onites* uçucu yağlarının bağıl yoğunluk değerleri

Clevenger Aparatının Tipi	Boş Piknometrenin Ağırlığı (g)	Distile su ile doldurulmuş piknometrenin ağırlığı (g)	Uçucu yağ ile doldurulmuş piknometrenin ağırlığı (g)
UYTC	9,9897	15,3408	15,1402
KCC	10,0303	15,5821	15,4321

3.5.2. Kırılım İmleci (2.2.6)

Refraktometri aracılığı ile yapılan ölçümler sonrasında UYTC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının, 20 °C'de kırılım imleci değeri 1,509 olarak ölçülürken, KCC ile elde edilen uçucu yağın kırılım imleci değeri 1,5111 olarak tespit edilmiştir.

3.5.3. Optik Çevirme (2.2.7)

Polarimetre aracılığı ile yapılan ölçümler sonrasında UYTC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının, 20 °C'de optik çevirme değeri -1,141 olarak ölçülürken, KCC ile elde edilen uçucu yağın optik çevirme değeri -1, 242 olarak ölçülmüştür.

3.5.4. Donma Noktası (2.2.18)

Avrupa Farmakopesi 10.7'de verilen 'Essential oils' monografı esas alınarak hazırlanan donma noktası tayin düzeneğinde uçucu yağların donma noktası değerleri tayin edilmiştir. Katılaşma sırasında gözlenen en yüksek sıcaklık uçucu yağın donma noktası olarak nitelendirilmiştir.

Çizelge 3.17. *O. onites* L. Uçucu Yağlarının Donma Noktası Değerleri

Clevenger Aparatının Tipi	Donma Noktası
UYTC	-7,1°C
KCC	-7,3°C

3.5.5. Asit Değeri (2.5.1)

Avrupa Farmakopesi 10.7'de verilen 'Essential oils' monografı esas alınarak yapılan çalışmalarda uçucu yağların asit değerleri hesaplanmıştır. Farmakope'ye göre asit değerinin 1.0'ın altında olması uygun olarak değerlendirilmektedir.

Aşağıda tablo halinde verilen sonuca göre farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen *O. onites* L. uçucu yağlarının asit değerleri Avrupa Farmakopesi 10.7'ye göre uygundur.

Çizelge 3.18. *O. onites* L. Uçucu Yağlarının Asit Değerleri

Clevenger Aparatının Tipi	Tartılan Uçucu Yağ Miktarı (g)	Harcanan 0.1 M KOH miktarı (mL)	Asit Değeri
UYTC	10,00	0,3571	0,2003
KCC	10,00	0,7758	0,4353

3.5.6. Peroksit değeri (2.5.5)

Avrupa Farmakopesi 10.7'de verilen 'Essential oils' monografı esas alınarak yapılan çalışmalarda uçucu yağların peroksit değerleri hesaplanmıştır. Monografa göre; karşılaştırma titrasyonu olarak yapılan kör deneylerinde, büretten harcanan 0.01 M sodyum tiyosülfat hacmi 0.1 mL'yi geçmemelidir. Yapılan karşılaştırma testinde harcanan 0.01 M sodyum tiyosülfat hacmi 0,0826 mL olarak ölçülerek Farmakope'ye uygun bulunmuştur.

Aşağıdaki tabloda farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen *O. onites* uçucu yağlarının peroksit değerleri verilmiştir. İncelenen uçucu yağların peroksit değerleri 0-12 arasında hesaplanan bir değere sahip olarak bulunmuş olup Avrupa Farmakopesi 10.7'ye göre uygundur.

Çizelge 3.19. *O. onites* uçucu yağlarının peroksit değerleri

Clevenger Aparatının Tipi	Tartılan Uçucu Yağ Miktarı (g)	Harcanan 0.01 M $Na_2O_3S_2$ miktarı (mL)	Peroksit Değeri
UYTC	5,0003	2,8112	5,4568
KCC	5,0000	2,3217	4,4782

3.5.7. Uçucu Yağlarda Yabancı Ester Aranması (2.8.6)

Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı uçucu yağlarda yabancı ester aranması deneyinin sonuçları değerlendirmede referans olarak alınmıştır. İncelenecek numune olan *O. onites* L. uçucu yağları, referans olarak alınan 'Essential oils' monografı doğrultusunda belirtilen çözeltilerle muamele edilmiştir. 30 dakika bekleme süresi dolduktan sonra soğutulmuş ve kristal yapı içermedikleri gözlemlenmiştir. Farklı tip Clevenger aparatı ile elde edilmiş olan uçucu yağların ikisi de standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5. Yabancı ester aranmasında çözeltilerle muamele edilmiş uçucu yağ



Şekil 3.6. Çözeltilerle muamele edilmiş uçucu yağın su banyosunda bekleme aşaması



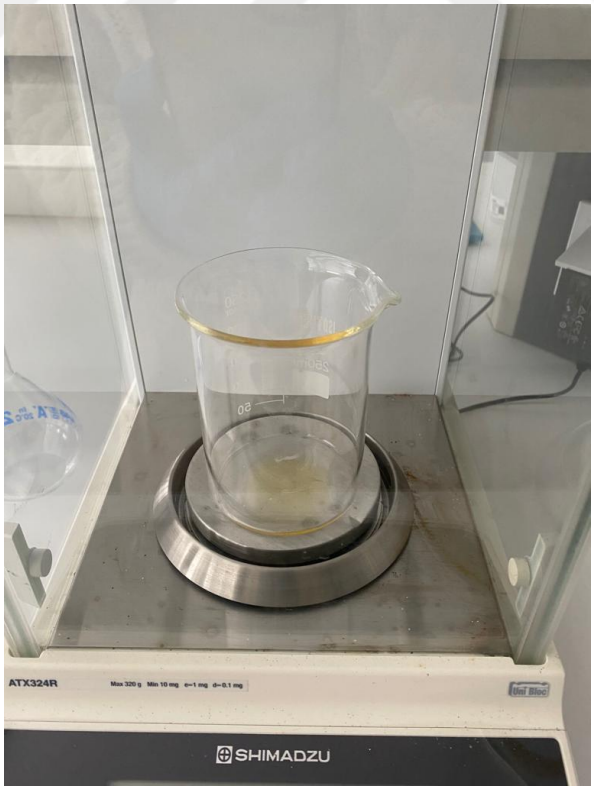
Şekil 3.7. Yabancı ester aranması deney sonucu

3.5.8. Uçucu Yağlarda Uçurma Artığı (2.8.9)

Avrupa Farmakope'si 10.7'de belirlenen kriterlere göre darası alınmış uygun boyutta beherlerin üzerine uçucu yağlar tartılmış ve uygun su banyosu üzerinde uçucu yağlar kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Daha sonrasında beherler tekrar hassas terazide tartılmış, başlangıçta kaydedilen değerler üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağlarda uçurma artığı deneyi için elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 3.20. *O. onites* uçucu yağlarında uçurma artığı değerleri

Clevenger Aparatının Tipi	Tartılan Uçucu Yağ Miktarı (g)	Beherin Darası (g)	Beherin Son Tartımı (g)	Artık (g)	% Artık
UYTC	5,0001	123,3740	123,6034	0,2294	4,5879
KCC	5,0000	119,8462	120,0158	0,1696	3,3920



Şekil 3.8. Uçurma artığı deneyi yapım aşaması



Şekil 3.9. *O. onites* uçucu yağlarının su banyosu üzerinde uçurulması



Şekil 3.10. *O. onites* uçucu yağlarının su banyosu üzerinde uçurulması

3.5.9. Uçucu Yağlarda Su Aranması (2.8.5)

Avrupa Farmakope'si 10.7'de belirtilmiş olan standartlara göre, deney prosedürü gerçekleştirildiğinde, çözeltiler bekletildiğinde berrak kalmıştır. Farklı tip Clevenger aparatı ile elde edilmiş olan uçucu yağların ikisi de standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.



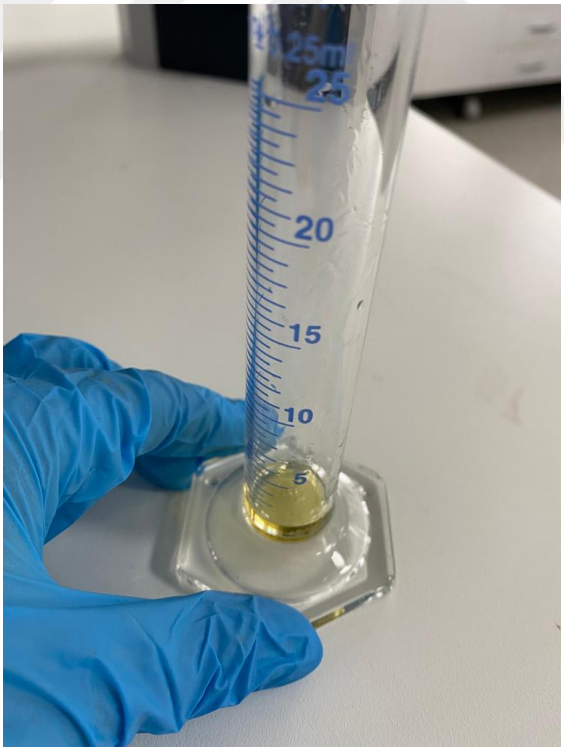
Şekil 3.11. Uçucu yağ numunesinin üzerine karbon disülfür *R* ilave edildiği an



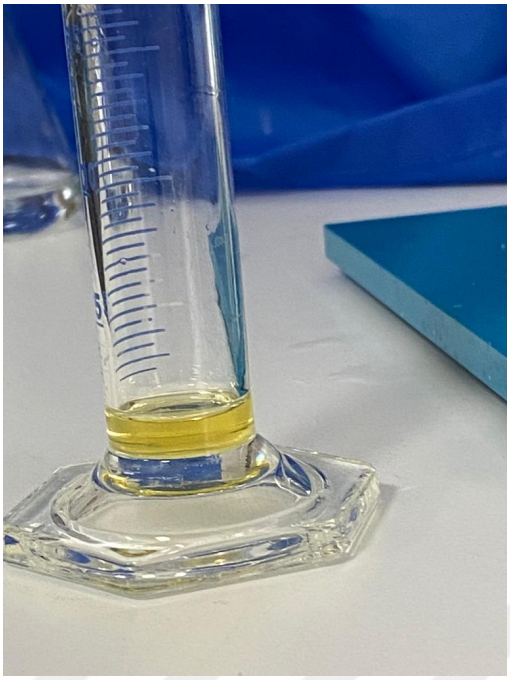
Şekil 3.12. Uçucu yağlarda su aranması deney sonucu

3.5.10. Uçucu Yağların Alkoldeki Çözünürlükleri (2.8.10)

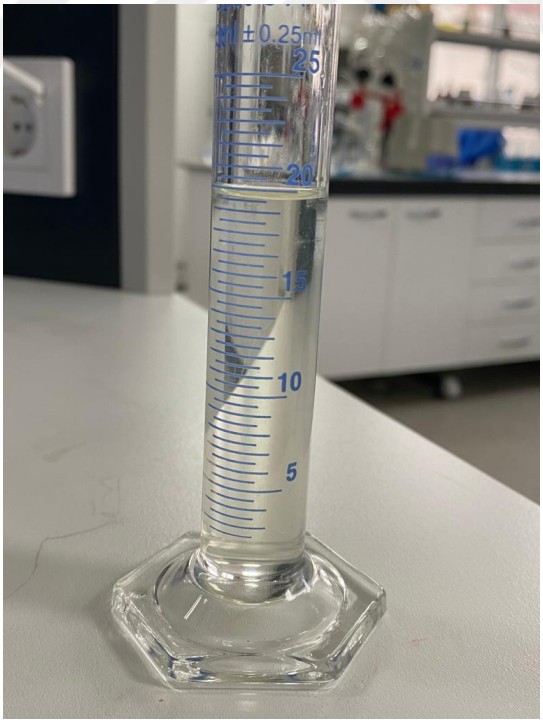
Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı uçucu yağların alkoldeki çözünürlükleri bölümündeki deney aşamaları gerçekleştirilmiştir. Farmakope'ye göre yorum yapılırken; "*t* derecesindeki alkolün *n* hacmi veya daha fazlasında çözünür" ifadesi, bir uçucu yağın, seyreltilmemiş yağ ile karşılaştırıldığında, *t* derecesindeki alkolün *n* hacminde ve aynı derecedeki alkol ile 20 mL'ye tamamlandığında berrak olarak çözündüğünü tanımlar. Bu ibareye göre deney sonucu; UYTC ile elde edilen uçucu yağ, 96 derecesindeki alkolün 0.7 mL hacmi veya daha fazlasında çözünür şeklinde yorumlanmıştır. Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağ, 96 derecesindeki alkolün 0.8 mL hacmi veya daha fazlasında çözünür şeklinde değerlendirilmiştir.



Şekil 3.13. 1.0 mL uçucu yağın mezüre eklenmiş hali



Şekil 3.14. Uçucu yağın alkol ilavesiyle çözünmüş ve berrak hali



Şekil 3.15. Uçucu yağın alkol ilavesiyle 20 mL'ye tamamlanmış hali

3.6. Aktivite Testleri

3.6.1. Antioksidan Aktivite

3.6.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi

O. onites'in topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan etil asetat *n*-hekzan, ve metanol ekstrelerinin, su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağlarının ve hidrolatlarının, antioksidan aktivitelerinin araştırılmasına ait % İnhibisyon değerleri Çizelge 3.21'de açıklanmıştır.

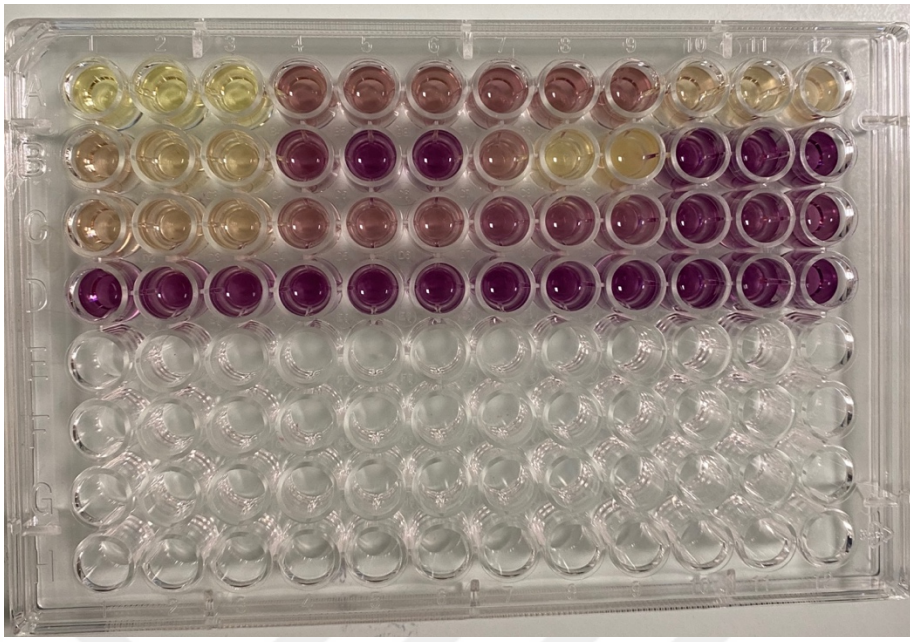
Çizelge 3.21. *O. onites*'in topraküstü kısımlarından hareketle hazırlanan ekstre ve uçucu yağların DPPH yöntemi ile saptanan % inhibisyon değerleri

Materyal	% İnhibisyon
Metanol ekstresi	91,6322 ± 0,4660
Etil asetat ekstresi	52,3862± 0,3722
n-Hekzan ekstresi	37,9899± 4,1527
UYTC ile elde edilmiş uçucu yağ	54,2905± 6,4869
KCC ile elde edilmiş uçucu yağ	84,4926± 0,3257

Referans bileşik olarak seçilen bütillenmiş hidroksi toluene ait bulgular Çizelge 3.22'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. Bütillenmiş hidroksi toluen için konsantrasyon ve % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon
1000	82,9232
500	61,1592
250	40,2269
125	21,4697
62.5	13,1445
31.25	4,9260



Şekil 3.16. Mikroplakalar üzerindeki DPPH deney sonucu

3.6.2. Antibakteriyel Aktivite

O. onites'in topraküstü kısımlarından elde edilen *n*-hekzan, etil asetat ve metanollü ekstrelerinin test edilen Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler üzerinde gösterdikleri antibakteriyel aktivite ve hesaplanan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri Çizelge 3.23'de verilmiştir.

Çizelge 3.23. *O. onites* ekstrelerinin ve standart bileşiklerin MIC değerleri (µg/ml)

Ekstreler	Test Edilen Bakteri					
	Escherichia coli **ATCC 25922**	***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 13883**	***Staphylococcus aureus*** **ATCC 25923**	***Staphylococcus aureus*** **ATCC 43300 (MRSA)**	***Enterococcus faecalis*** **ATCC 29212**	***Pseudomonas aeruginosa*** **ATCC 27853**
Etil asetat ekstresi	6.25	<1.5625	<1.5625	<1.5625	<1.5625	12.5
***n*-Hekzan ekstresi**	<1.5625	3.125	<1.5625	<1.5625	<1.5625	6.25
Metanol ekstresi	25	<1.5625	<1.5625	<1.5625	25	25
Ampisilin			0.0016	0.05		
Siprofloksazin					0.0625	
Ofloksazin	0.001					0.008

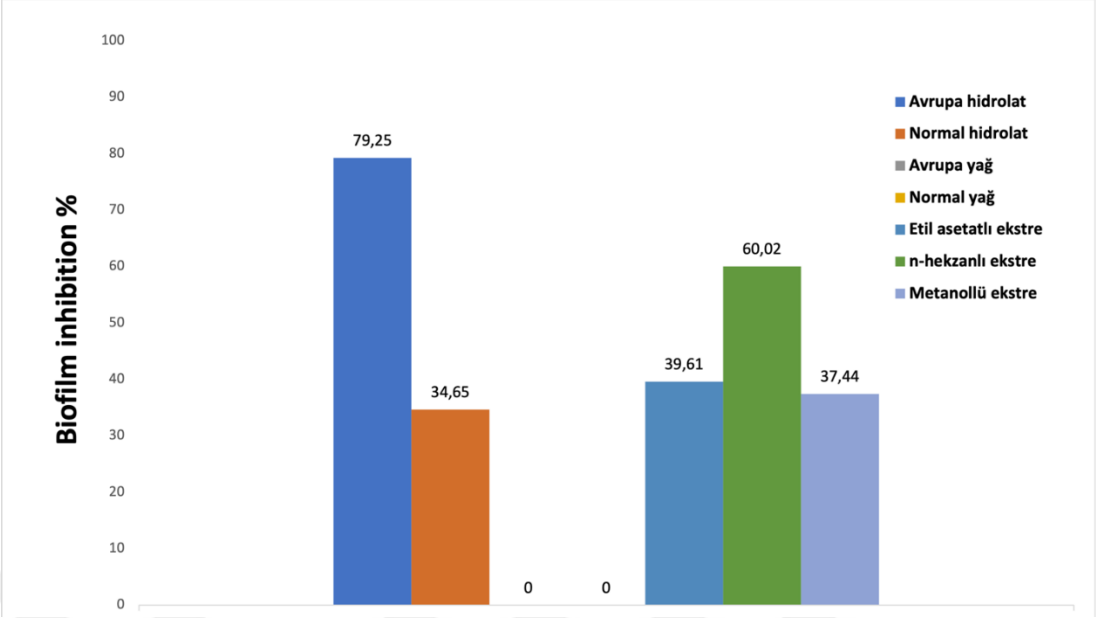
O. onites'in topraküstü kısımlarından hareketle su distilasyonu ile elde edilmiş uçucu yağların ve uçucu yağlara ait hidrolatların test edilen Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde gösterdikleri antibakteriyel aktivite ve hesaplanan minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri Çizelge 3.24'de verilmiştir.

Çizelge 3.24. *O. onites* uçucu yağ, hidrolatları ve standart bileşiklerin MIC değerleri (µg/ml)

Uçucu yağlar/Hidrolatlar	**Test Edilen Bakteri**					
	***Escherichia coli* ATCC 25922**	***Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883**	***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	***Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA)**	***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**
Avrupa hidrolat	100	100	100	100	200	-
Normal hidrolat	100	200	200	200	-	-
Avrupa yağ	<1.5625	<1.5625	<1.5625	<1.5625	<1.5625	100
Normal yağ	<1.5625	<1.5625	<1.5625	<1.5625	<1.5625	50

3.6.3. Antibiyofilm Aktivite

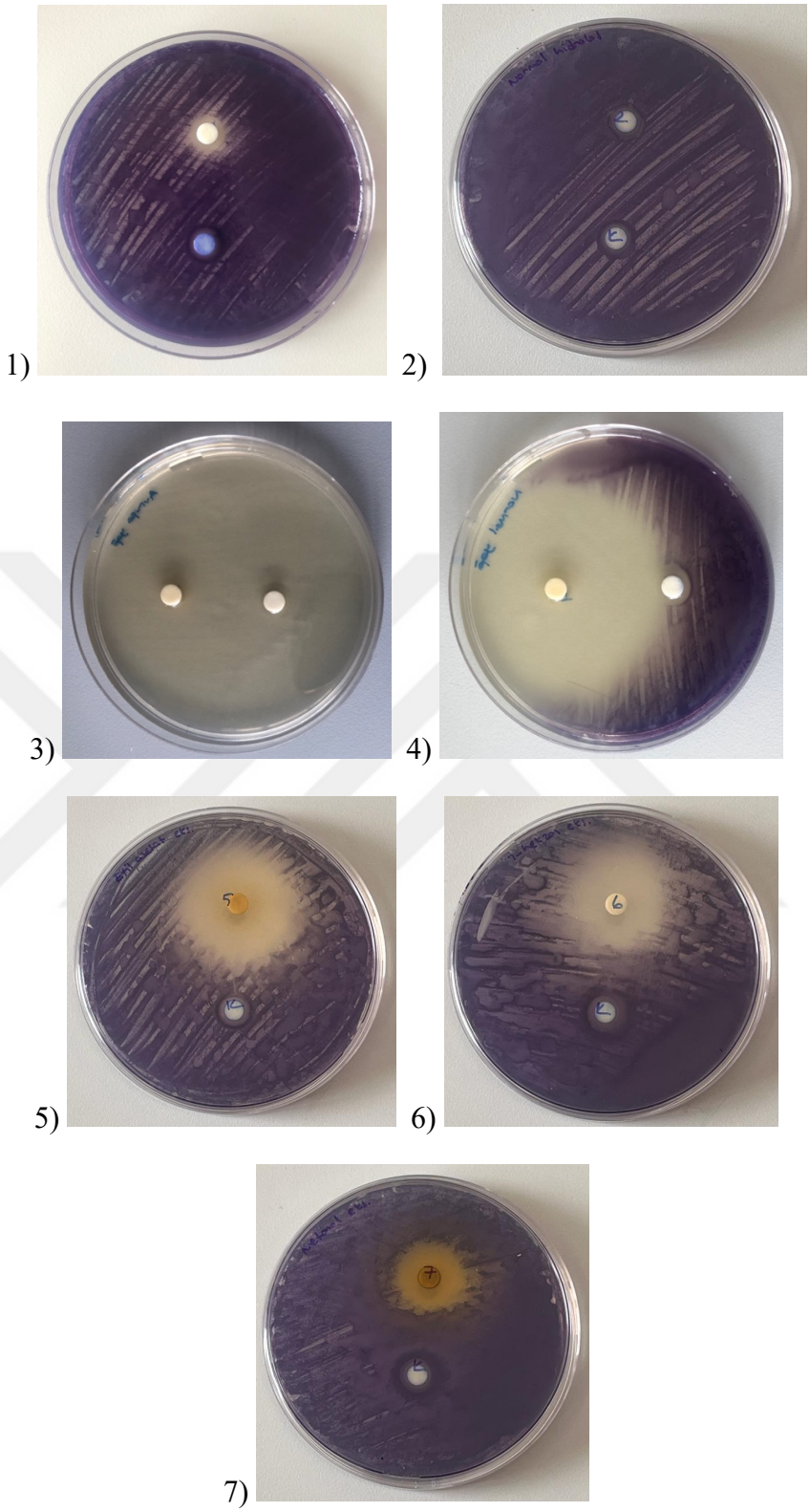
O. onites'in topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstre, uçucu yağ ve hidrolatların antibiyofilm aktivitesinin *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerindeki antibiyofilm aktivitesi Şekil 17'de grafik üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 3.17. *O. onites*'in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerindeki antibiyofilm aktivitesi

3.6.4. Anti-quorum Sensing Aktivite

O. onites'in topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstre, uçucu yağ ve hidrolatların Quorum Sensing sinyallerini bloke etmeleri disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup sonuçlar Şekil 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. *O. onites*'in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 üzerindeki anti-quorum sensing aktivitesi (**1**: Avrupa hidrolat **2**: Normal hidrolat **3**: Avrupa yağ **4**: Normal yağ **5**: Etil asetatlı ekstre **6:** Metanollü ekstre **7:** *n*-Hekzanlı ekstre) **K:** LB Broth

4. TARTIŞMA

Ülkemizde yetişen bitki türlerinin çeşitliliğine göre bir değerlendirme yapıldığında Lamiaceae familyası 3. büyük familya olarak değerlendirilmiştir. Bu familyanın üyesi olan türlerin tıp, eczacılık, parfümeri, kozmetik, gıda gibi çeşitli sektörlerde farklı şekillerde değerlendirilme potansiyellerinin yüksek olması sebebiyle önemli oldukları vurgulanmıştır. Lamiaceae familyasının içerisinde bulunan en önemli bitkilerden birisi olarak kekik bitkisi görülmektedir.

Ülkemizde kekik olarak bilinen beş tane cins bulunduğu kayıtlara geçmiştir. Bu cinsler *Origanum*, *Thymus*, *Tymbra*, *Satureja* ve *Coridothymus* cinsleri olarak bilinmektedir. Türkiye'den ihraç edilen kekikler arasında *O. onites* %80 pazar payı ile ekonomik açıdan en önemli türlerden biri olarak nitelendirilmiştir.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin günden güne Dünya çapında kullanımı yaygınlaşmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin, insan sağlığı açısından daha yararlı ve güvenli hale gelebilmeleri için kalite kriterlerinin belirli sınırlar çerçevesinde olması dolayısıyla standardizasyon sağlanması gerekli görülmektedir. International Trade Center (ITC)'ın 2020 yılı verilerine göre Türkiye'nin uçucu yağlar, kozmetik, kişisel bakım ürünlerinin ithalatı 1,1 milyar dolarken ihracatı 951,4 milyon dolar olarak tespit edilmiştir. Verilere göre; dış ticaret dengesine bakıldığında, ülkemizin 207,6 milyon dolar ile uçucu yağlar, parfüm, kozmetik, diğer kişisel bakım ürünleri grubunda dış ticaret açığı olduğu söylenebilir. Türkiye'nin dış ticaret üzerinde oluşan açığın indirgenmesi için ilk olarak uygulanması gereken, ithal edilen tıbbi ve aromatik bitkilerin temel ürün sınıflarında katma değeri yüksek olan ve dış ticaret açığının artış göstermesine sebep olan ürün gruplarının tespit edilmesi ve tespit edilen bu ürünlere gereken yatırımların yapılmasıdır. Katma değeri yüksek olan ürünlerin geliştirilmesi için tıbbi ve aromatik bitkilerden hareketle bitmiş

ürün elde edilmesi sürecinde, belirli kalite standartları belirlenmeli ve bu standartları sağlayacak uygun teknolojik alt yapı sağlanmalıdır.

Bu çalışmada, *O. onites* bitkisinin kullanım alanları, fitokimyasal içerik, biyolojik aktivite çalışmaları, uçucu yağlar ve hidrolatlar ve distilasyon kavramı hakkında bilgiler literatürden derlenmiştir. *O. onites* bitkisi örnek olarak ele alınıp, bu bitkinin materyal olarak kullanıldığı distilasyon ve ekstraksiyon metotlarının algoritması ile üretim yöntemlerinin kalite üzerinde etkinliği araştırılmıştır.

Distilasyon metotu olarak, tez kapsamında metodolojik olarak; farklı tip Clevenger aparatları ile ile elde edilen *O. onites* uçucu yağlarının Avrupa Farmakopesi 10.7 'Essential oils' monografına göre test ve analizleri yapılmıştır. Yağların, GC/MS ile yapıları aydınlatılmış ve standartları belirlenmiş ve uçucu yağların kaliteleri değerlendirilmiştir.

UYTC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağı incelendiğinde genel olarak temel bileşenler; karvakrol (%90,5), timol (%1,6), *β*-bisabolen (%0,9), borneol (%0,8), *p*-simen (%0,8), *γ*-terpinen (%0,8) olarak gözlemlenmiştir.

KCC ile elde edilen *O. onites* uçucu yağı incelendiğinde genel olarak temel bileşenler ise; karvakrol (%79,3), timol (%2,9), borneol (%0,9), (*Z*)-3-hekzenal (%0,8), *p*-simen (%0,8), *γ*-terpinen (%0,8), *β*-bisabolen (%0,6), (*E*)-2-hekzenal olarak gözlemlenmiştir.

Farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilmiş *O. onites* uçucu yağı bileşenlerinin yapısı aydınlatıldığında; *α*-pinen (%0,1), *α*-tuyen (%0,2), mirsen (%0,2), *α*-terpinen (%0,2), *γ*-terpinen (%0,8), *p*-simen (%0,8), 1-okten-3-ol (%0,1), *cis*-sabinen hidrat (%0,2), terpinen-4-ol (%0,4), *β*-karyofillen (%0,4), *α*-terpineol (%0,1), karvon (%0,1), karvakril asetat (%0,1), spatulenol (%0,3), karyofillen oksit (%0,4) bileşiklerinin her iki aparatla elde edilen uçucu yağda aynı miktarda bulunduğu tespit edilmiştir.

UYTC ve KCC ile elde edilen uçucu yağlarda karvakrol, timol, borneol, *β*-bisabolen bileşenleri ortak olarak bulunmakla birlikte bu bileşenlerin uçucu yağlarda bulunma yüzdeleri farklı olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağda karvakrol (%90,5), timol (%1,6), borneol (%0,8), *β*-bisabolen (%0,9) olarak bulunurken, Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilmiş uçucu yağda karvakrol (%79,3), timol (%2,9), borneol (%0,9), *β*-bisabolen (%0,6) olarak tespit edilmiştir.

UYTC ile elde edilmiş *O. onites* uçucu yağında linalol (%0,1), linalil asetat (%0,1), *α*-bisabolol (%0,1), manoil oksit (%0,1), *cis*-lanseol (%0,1) bileşikleri bulunurken Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilmiş uçucu yağda bu bileşikler bulunamamıştır. Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilmiş uçucu yağda, (*Z*)-2-butenal (%0,1), (*E*)-3-penten-2-on (%0,1), (*E*)-2-pentenal (%0,1), (*Z*)-3-hekzenal (%0,8), (*E*)-2-hekzenal (%0,6), asetik asit (%0,2), *trans*-sabinen hidrat (%0,1), propanoik asit (%0,1), *trans*-*p*-ment-2-en-1-ol (%0,1), hekzanoik asit (%0,3) bileşenleri tespit edilirken UYTC ile elde edilmiş *O. onites* uçucu yağında bu bileşenler tespit edilememiştir.

Çizelge 4.1. *O. onites*'in uçucu yağ ve ekstrelerinin verim, karvakrol ve timol oranlarının literatür verileriyle karşılaştırılması

	UYTC	**KCC**	**Literatür 1**	**Literatür 2**	**Literatür 3**	**Literatür 4 (çiçek)**	**Literatür 4 (yaprak)**	**n-hekzan ekstresi**	**Etil asetat ekstresi**	**Metanol ekstresi**
Verim	1,4397	1,6112	2	2	1,04	4,25	1,75	3,7342	3,0044	3,2629
Karvakrol	90,5	79,3	70,6	64,3	2,56	16	64,5	61,982	11,822	0,100
Timol	1,6	2,9	1,8	1,4	56,5	-	-	0,916	0,543	0,183

UYTC ile elde edilen uçucu yağın verimi (%1,4) olarak hesaplanırken, KCC ile elde edilen uçucu yağın verimi (%1,6) olarak tespit edilmiştir. Verime dair elde edilen bulguların literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Bulduğumuz sonuçları Taşdemir ve arkadaşlarının *O. onites* üzerinde yapmış oldukları çalışmaların GC/MS analizleri ile kıyasladığımızda; bizim kullanmış olduğumuz her iki cihazdan da elde edilen uçucu yağlarda karvakrol miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Carroll ve arkadaşlarının elde ettikleri *O. onites* uçucu yağının analiz sonuçları çalışmamızdaki GC/MS sonuçları ile karşılaştırıldığında; (%64) karvakrol ve (%1,4) timol oranı ile bizim elde ettiğimiz yüzdenin altında değerlere sahip olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen linalol ve *p*-simen bileşikleri ise miktar olarak Carroll ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada tespit edilen miktarların altında kalmıştır.

Özdemir ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise; literatür verilerinden farklı olarak (%56,5) timol, (%2,56) karvakrol oranı ile timol miktarı karvakrol miktarından daha fazla olarak tespit edilmiştir. Bulgular çalışmamız ile kıyaslandığında timol ve karvakrol oranının büyük farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmada bitki Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi içerisinde yetiştirilmiştir. Bu bilgiler ışığında bitkinin yetişme ortamının uçucu yağ bileşenleri üzerinde etkisinin yadsınamayacak ölçüde olduğu sonucuna varılabilir.

Balıkesir'in Edremit İlçesi'nden toplanan bitkiden elde edilen uçucu yağın yaprakları ve çiçeklerinden ayrı ayrı elde edilen uçucu yağların GC/MS ile yapılarının aydınlatıldığı bir çalışmada, çiçek ve yapraktan elde edilen yağların verimi, karvakrol ve timol miktarları arasında farklılıklar olduğu kayıtlara geçmiştir. Çiçekten elde edilen uçucu yağ (%4,5), taze yapraklardan elde edilen uçucu yağ ise (%1,75) olarak hesaplanmıştır. Çiçeklerden elde edilen uçucu yağın verimi çalışmamızda kullanılan farklı iki tip cihaz ile elde edilmiş yağların veriminden yüksek olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte literatür verilerine göre çiçekten elde edilen uçucu yağdaki karvakrol oranı (%16) ile düşük olarak değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada iki uçucu yağda da GC/MS analizinde timol tespit edilmemiştir. Bulgulara göre; bitkinin uçucu yağ eldesinde kullanılan kısmının yağın verimine ve bileşimine etkisi olduğu sonucuna varılabilir.

Uçucu yağlar elde edilirken elde edilme koşullarındaki farklılıklar da uçucu yağ bileşenlerinin miktarını değiştirebilir. Farklı tip Clevenger aparatları ile aynı koşullarda ve aynı drog üzerinden elde edilmiş uçucu yağların bileşiminde farklılıklar olması uçucu yağlar elde edilirken kullanılan yöntemlerin ve ortam koşullarının optimize edilmesi gerektiğinin önemini vurgulamaktadır.

Yapılan çalışmada sonuç olarak; *O. onites* toprak üstü kısımlarından iki farklı tip Clevenger aparatı ile elde edilen uçucu yağların bileşenlerinin çeşidi ve miktarları büyük oranda benzerlik gösterse de, ana bileşen olan karvakrol ve timolün yüzdesel olarak dikkat çekici farklılık göstermesi, uçucu yağlarda üretim yönteminin yağın bileşenleri ve kalitesi üzerinde belirleyici bir parametre olduğunun açıkça göstergesi olduğu ortaya konmuştur.

İnce tabaka kromatografisi, Farmakope içerisinde bulunan bir teşhis yöntemlerinden biridir. İnce tabaka kromatografisi için Avrupa Farmakopesi 10.0'da yer alan 'Thyme Oil' monografındaki yöntem kullanılmakla birlikte, bitkiden hareketle elde edilen uçucu yağların kromatogram analizi gerçekleştirilmiştir. Farmakope'de *O.onites* uçucu yağı için belirlenmiş bir ince tabaka kromatografisi analiz yöntemi bulunmamaktadır. Bitkinin içerdiği karvakrol ve timol bileşenlerinin GC/MS sonuçlarına ve literatür verilerine göre yüksek oranda olması sebebiyle, standart maddeler olarak monografta yer alan karvakrol ve timol kullanıldığı Avrupa Farmakopesi 10.0'da yer alan 'Thyme Oil' monografındaki yöntem ince tabaka kromatografisinde tercih edilmiştir. Deney sonucumuza göre, referans çözeltisinden ve test çözeltisinden elde edilen kromatogramlardaki lekelerin aynı renk ve konumda olması, iki farklı aparatla elde edilen uçucu yağda da gözlenmiştir.

Bitkinin toprak üstü kısımlarının toz haline getirilmesinden sonra uygun literatür verileri toplanarak çeşitli ekstreler hazırlanmış ve ekstrelerin kalitatif ve kantitatif analizleri HPLC cihazı aracılığıyla yapılmıştır. Deneylerimizde total ekstre hazırlamak için farklı polarlıkta olan çözücülerden ekstreler hazırlanmış, deney prosedürüne hareketli maserasyon da eklenmiştir. Total ekstreden hareketle etkili bileşikleri izole etmek için apolar çözücüden polar çözücüye doğru fraksiyonlar

oluşturulmuştur. *n*-hekzan, etil asetat ve metanol çözücülerinden oluşan farklı fraksiyonların profilleri HPLC ile değerlendirilmiştir. *O. onites*'e ait literatür verileri incelenerek, bitkide bulunması muhtemelen olan 19 civarında standart bileşik belirlenmiş; bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreleri geliştirilen yöntemlerle HPLC'de analiz edilmiştir. Standart ve ekstrelerin taze olarak hazırlanan çözeltileri, kalitatif ve kantitatif analizlere tabi tutularak, UV spektrumları ve retansiyon zamanları kıyaslanmış; bitkinin karvakrol, timol, naringenin, hesperidin, rutin, kersetin, gallik asit, kafeik asit, arbutin bileşiklerini taşıdığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm ekstrelerde, karvakrol, timol ve arbutin yer almaktadır. Sikorik asit ve rutine sadece metanollü ekstrelerde; sinamik asit ve naringenine sadece etil asetatlı ekstrelerde, kersetine ise sadece *n*-hekzanlı ekstrede rastlanmıştır. Hesperidin, *n*-hekzanlı ekstrede tespit edilmemiştir. Karvakrol, timol ve arbutin diğer ekstrelere kıyasla en yüksek oranda *n*-hekzanlı ekstre içerisinde bulunmuştur. Kalitatif analiz sonuçları literatür verileriyle uyum göstermektedir (Askun ve ark., 2009; Pizzale ve ark., 2002; Oreopoulou ve ark., 2018; Özkan ve Özcan., 2014).

Bu çalışmada, *O. onites* bitkisinin toprak üstü kısımlarından distilasyon metotuyla ile iki farklı çeşit Clevenger aparatı kullanılarak uçucu yağ ve hidrolat elde edilmiştir. UYTC ile KCC kullanılarak elde edilen uçucu yağların özellikleri Avrupa Farmakopesi 10.7'de yer alan 'Essential oils' monografındaki testler baz alınarak analiz edilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır. 'Essential oils' monografında, asit değeri, peroksit değeri, uçucu yağlarda yabancı ester aranması, uçucu yağlarda su aranması testlerinde belirli referans değerleri veya standartlar belirtilmiştir. Bağıl yoğunluk, kırılım imleci, optik çevirme, donma noktası, uçucu yağlarda uçurma artığı ve uçucu yağların alkoldeki çözünürlükleri testleri için genel monografta belirlenmiş değerler bulunmayıp bu testleri gerçekleştirdikten sonra elde edilen sonuçlar Farmakope'de ilgili uçucu yağa ait monograftaki belirtilen referans değerlerle kıyaslanarak uygun olup olmadığı yorumu yapılır. Farmakope'de bulunan kekik yağı, *Thymus vulgaris* L., *T. Zygis* L. veya her iki türünün karışımının çiçeklenmiş toprak üstü kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağı olarak, timol tipi üzerinden tanımlanmış ve standart değerler buna göre verilmiştir. Çalışmamızda kullanılan, *O. onites*'ten elde edilen uçucu yağa ait Farmakope'de monograf

bulunmadığı için bahsi geçen testlerin sonuçlarında kıyaslama yapılamamış olup, belirlenen değerler ve çalışma sonuçlarımız Türk Farmakope Dergisi'ne sunulacaktır. Ülkemizde yetişen *O.onites*'in toprak üstü kısımlarına ait uçucu yağının analiz sonuçlarının Türk Farmakope Dergisi'ne sunulması orijinallik açısından önem arz etmektedir.

UYTC ile KCC kullanılarak elde edilen uçucu yağların bağıl yoğunlukları sırasıyla, 0,9625 ve 0,9729 olarak ölçülmüştür. Bu değerler Avrupa Farmakopesi'ndeki timol tipi kekik uçucu yağında verilen standartlara göre 0,915-0,935 değerleri arasındadır. Çalışmamızda kullanılan tür uçucu bileşenler bakımından *Tymus* cinslerine göre karvakrol açısından daha zenginken, timol miktarı daha düşüktür. İki cins arasındaki timol ve karvakrol bileşenlerinin yüzdesinin farklı olmasından ötürü yağların bağıl yoğunlukları Farmakope'deki standart timol tipi uçucu yağ değerlerinin dışında kalmıştır olarak yorumlanmıştır. Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre yoğunluk 0,9578-0,9084 arasında bulunmuştur (Avcı, 2006). Başka bir çalışmada ise su distilasyonu ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının yoğunluğu 0,98 olarak tespit edilirken, aynı çalışmada su buharı distilasyonu ile elde edilmiş uçucu yağın yoğunluğu 0,95 olarak tespit edilmiştir (Erdemgil, 1992). Bu bilgiler ışığında, distilasyon yönteminin yağın içerisindeki bileşenlerin miktarını etkilediği ve uçucu yağı oluşturan bileşenlerin oransal olarak farklı olmasının da yağın yoğunluğunu etkilediği yorumu yapılabilir.

Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının, 20 °C'de kırılım imleci değeri 1,509 olarak ölçülürken, Klasik Tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağın kırılım imleci değeri 1,5111 olarak refraktometri aracılığıyla tespit edilmiştir. Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre kırılım imleci değeri ortalama 1.505-1.516 arasında bulunmuştur (Avcı, 2006). Fizikokimyasal özelliklerin değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise bitkinin su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın kırılım imleci 1.5055 olarak tespit edilmiştir (Erdemgil, 1992). Bulgularımızın literatür verilerine uyum sağladığı görülmektedir.

Elde edilen uçucu yağların optik çevirme değerleri polarimetre aracılığı ile ölçülmüştür. Bu değerler; Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen *O. onites* uçucu yağı için 20 °C'de -1,141 olarak, Klasik Tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağ içinse -1,242 olarak tespit edilmiştir.

Uçucu yağların donma noktası Avrupa Farmakopesi'ne göre tarif edilen deney düzeneği hazırlanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yönteme göre, iç tüp dış tübün içine yerleştirilmiş ve birkaç aşı kristalinin varlığından emin olarak katılaşıncaya kadar iyice karıştırılmıştır. Katılaşma sırasında gözlenen en yüksek sıcaklık UYTC ile elde edilen uçucu yağ için -7,1 °C ve KCC ile elde edilen uçucu yağ için -7, 3 °C olarak ölçülmüştür.

Uçucu yağların asit değerleri, Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı esas alınarak hesaplanmıştır. Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağın asit değeri 0,2003 olarak tespit edilirken, KCC ile elde edilen uçucu yağın asit değeri 0,4353 olarak hesaplanmıştır. Monografa göre asit değerinin 1.0'ın altında olması uygun olarak kabul edildiği için her iki yağ da standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.

Uçucu yağların peroksit değerleri, Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı esas alınarak hesaplanmıştır. UYTC ile elde edilen uçucu yağın peroksit değeri 5,4568 olarak tespit edilirken, KCC ile elde edilen uçucu yağın asit değeri 4,4782 olarak hesaplanmıştır. Bulunan değerler 0-12 aralığında olduğu için, uçucu yağların peroksit değerleri monografta belirlenen standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.

Uçucu yağlarda yabancı ester aranması deneyi, Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağlar monografta belirtilen çözeltilerle muamele edildiğinde, 30 dakika bekleme süresinden sonra kristal yapı içermedikleri gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre, farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen uçucu yağların ikisi de standartlara uygun olarak tespit edilmiştir.

Uçucu yağlarda uçurma artığı Avrupa Farmakopesi 10.7'de belirtilen kriterlere göre hesaplanmıştır. Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağ için uçurma artığı %4,5879 olarak bulunurken, KCC ile elde edilen uçucu yağ için bu değer %3,3920 olarak hesaplanmıştır.

Uçucu yağlarda su aranması deneyi, Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Farklı tip Clevenger aparatı ile elde edilmiş olan uçucu yağların ikisi de deney prosedürü gerçekleştirildiğinde berrak kalmış ve standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.

Uçucu yağların alkoldeki çözünürlükleri, Avrupa Farmakopesi 10.7'deki 'Essential oils' monografı uçucu yağların alkoldeki çözünürlükleri bölümündeki deney prosedürü uygulanarak değerlendirilmiştir. Farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen uçucu yağların ikisi de deney sonunda berrak bir çözelti oluşturmuş, sonuç olarak her iki yağ da standartlara uygun olarak değerlendirilmiştir.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan hazırlanan ekstreler ve elde edilen uçucu yağların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için güncel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen DPPH radikal süpürücü aktivite testinden faydalanılmıştır. DPPH radikal süpürücü aktivite metotuyla elde edilen sonuçlara göre; bitkinin metanollü ekstresinin ve Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağın kuvvetli antioksidan aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Etil asetat ekstresi ve uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilmiş uçucu yağın antioksidan aktiviteleri birbirlerine yakın değerler olarak tespit edilmiştir. En düşük antioksidan aktivite ise *n*-hekzanlı ekstrede belirlenmiştir. HPLC ve GC/MS sonuçları değerlendirildiğinde; sikorik asit, rutin ve timolün yüksek oranda antioksidan aktivite gösterme ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan hazırlanan ekstrelerin incelenen Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı sergilediği antibakteriyel aktivite; broth mikrodilüsyon metotu kullanılarak in-vitro ortamda incelenmiştir. Bitkinin *n*-hekzanlı ve etil asetatlı ekstrelerinin Gram-pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir. Metanollü ekstrenin ise test edilen Gram-pozitif bakteriler arasından

Enterococcus faecalis ATCC 29212 üzerinde, diğer ekstrelere kıyasla zayıf bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. HPLC sonuçlarına göre karvakrol, timol ve arbutin bileşiklerinin *n*-hekzanlı ve etil asetatlı ekstrelerde daha yüksek miktarda bulunduğu göz önüne alındığında, Gram-pozitif bakteriler üzerindeki antibakteriyel aktivitenin yüksek olmasının sebebinin bu bileşikler ile antibakteriyel aktivitenin ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan su distilasyonuyla üretilen uçucu yağlar ve üretilmiş uçucu yağların hidrolatlarının Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı sergilediği antibakteriyel aktivite değerlendirildiğinde; Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağ uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağdan ve hidrolatlardan daha güçlü bir aktivite göstermiştir. Genel olarak hidrolatların her ikisi de uçucu yağlara göre daha zayıf etkili olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, hidrolatların hiçbiri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde antibakteriyel aktivite göstermemiştir.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan hazırlanan ekstrelerin, kristal viyole yöntemi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerinde antibiyofilm aktivitesi incelendiğinde; en fazla *n*-hekzanlı ekstrenin aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu da ekstre içerisindeki karvakrol, timol ve arbutin miktarının fazla olması ile ilişkilendirilebilir.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan su distilasyonuyla üretilen uçucu yağlar ve üretilmiş yağların hidrolatlarının kristal viyole yöntemi kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerinde antibiyofilm aktivitesi incelendiğinde; UYTC ile elde edilen hidrolatın biyofilm aktivitesinin KCC ile elde edilen hidrolata göre daha yüksek olduğu ortaya konarken, uçucu yağların antibiyofilm aktivite göstermediği görülmüştür.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan hazırlanan ekstrelerin anti-quorum sensing aktiviteleri *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 türü bakteri kullanılarak incelendiğinde; etil asetatlı ekstrenin diğer iki ekstreden daha güçlü anti-

quorum sensing aktivite gösterdiği söylenebilir. HPLC sonuçlarına göre bu aktivitenin etil asetatlı ekstrede daha yüksek olması, ekstredeki naringenin ve sinamik asit fenolik bileşikleri ile ilişkilendirilebilir.

O. onites'e ait topraküstü kısımlardan su distilasyonuyla elde edilen uçucu yağlar ve bu uçucu yağların hidrolatlarının anti-quorum sensing aktiviteleri *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 türü bakteri kullanılarak incelendiğinde; uçucu yağların hidrolatlara göre oldukça yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen uçucu yağın aktivitesi en yüksek çıkarak, bakterinin ortamda üremesine izin vermediği ortaya konmuştur. Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen uçucu yağın aktivitesi yüksek olarak değerlendirilmiştir. Uçucu yağ tayin cihazı ile elde edilen hidrolatın anti-quorum sensing aktivitesi düşük olarak yorumlanmış olup Klasik tip Clevenger cihazı ile elde edilen hidrolatın aktivitesi yok olarak değerlendirilmiştir. GC/MS sonuçları değerlendirildiğinde; karvakrol ve timol miktarının anti-quorum sensing aktivite üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

O. onites Türkiye'de ticareti yapılan beş tür arasında ihracat oranı en fazla olan tür olarak kayıtlara geçmiştir. Ülkemizde Ege ve Akdeniz Bölgelerinde doğal olarak yetişmekte ve halk arasında "bilyalı kekik, taş kekik, peynir kekiği, İzmir kekiği" gibi yöresel adlarla bilinmektedir. Bitki, doğal floramıza ait bir tür olmakla birlikte ticari olarak kültüre alınmış tek *Origanum* türü olması bakımından önemlidir. Türkiye'den en fazla ihracatı yapılan kekik türü "bilyalı kekik" ismiyle bilinen *O. onites*'in ihracatı değerlendirildiğinde ihracatı gerçekleştirilen kekiklerin %80'nin bu tür olduğu belirtilmiştir (Kutlular, 2007). Ancak önemli biyolojik aktivitelere sahip olan ve ihracat potansiyeli açısından önem taşıyan bu türün daha fazla katma değere sahip olabilmesi için; uçucu yağının standartlarının belirlenmesi, görünüş ve koku özelliklerinin tarif edilmesi, İTK ile tanıma yapılması, bağıl yoğunluk, kırılım imleci, optik çevirme, asitlik değeri gibi testlerin yapılması, kromatografik profilinin incelenmesi, kiral saflığının analizi, yabancı madde testlerinin yapılması ve uçucu yağının tayin edilmesi gibi çeşitli analiz ve testlerin yapılması gerekli olup bu çalışma kapsamında bu değerler aydınlatılmıştır. Çalışmamızda, farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının spesifikasyonları kıyaslamalı olarak değerlendirilmiş olup konu ile ilgili veriler Türk Farmakope Dergisi'ne sunulacaktır. *O. onites* uçucu yağına ait tüm spesifisikasyonların değerlendirildiği detaylı bir çalışma daha önce yapılmaması çalışmamızın önemini ortaya koymaktadır.

Uçucu yağın kalitesi, uçucu yağın ürün olarak yerel veya uluslararası pazarda rekabet edebilmesi için belirleyici bir faktördür. Uçucu yağlar farklı yöntemlerle üretilebilir. Uçucu yağların üretim metodolojilerinin üretilen yağın kalitesi üzerinde belirleyici etkileri vardır (Kebede ve Hayelom., 2008). Çalışmamızda iki farklı tip Clevenger aparatı ile elde edilmiş *O. onites* uçucu yağlarının spesifikasyonları kıyaslandığında belirgin farklılıklar görülmesi, uçucu yağlarda üretim yönteminin yağın kalitesi üzerinde belirleyici bir parametre olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

Farklı distilasyon tekniklerini benimseyerek sardunya bitkisinden üretilen uçucu yağın kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı üretim tekniklerinin farklı sonuçlar verdiğine dair bulgular elde edilmiştir. Clevenger tipi bir aparatta su distilasyonu yöntemiyle üretilen sardunya yağının geraniol (%22,12) ve sitronellil tiglat (%0,84) açısından zengin olduğu bulunmuştur. Pilot ölçekte su distilasyonu yöntemiyle üretilen yağın ise, daha yüksek yüzdelerde cis-3-heksenol (%0,37), nerol (%0,82) içerdiği tespit edilmiştir. Su-buhar distilasyonu yöntemiyle üretilen numunelerin α-pinen (%0,33), sabinen (%0,20), mirsen (%0,22), cis-rose oksit (%0,44) ve geranial (%0,52) açısından zengin olduğu kanısına varılmıştır (Babu ve Kaul, 2005).

Mevcut laboratuvar ölçekli cam Clevenger tipi aparatlar, su ve buhar distilasyonu ve buhar distilasyonu gibi diğer distilasyon yöntemlerinin uygulanmasındaki sınırlamaları ve kaliteli hidrolat üretememe ve ısıtma modunun ayarlanamaması gibi nedenlerle tam olarak simüle edilmiş sonuçlar vermeyebilir. Uçucu yağların farklı sıcaklık ve basınçlarda distilasyona maruz bırakılması böyle bir cam aparatta mümkün değildir. 5, 10 veya 40 kg/parti kapasiteli küçük ölçekli distilasyon üniteleri Dutta ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve rapor edilmiştir. Bu ürünler kompakt olmamakla birlikte, damıtma/imbik, pilot tesis ünitesine benzer kondenser ve ayırıcı gibi parçalara sahiptir. 5, 10 ve 40 kg'lık distilasyon ünitelerinin *Cymbopogon flexuosus* yağ verimi sırasıyla yüzde 0,332, 0,337 ve 0,28 olarak hesaplanmıştır, bu da laboratuvarda Clevenger aparatı kullanılarak elde edilen verim olan yüzde 0,45'ten daha düşük değerler olarak kayıtlara geçmiştir. Bu distilasyon ünitelerinde elde edilen uçucu yağın kalitesi değerlendirildiğinde, bu Clevenger aparatına kıyasla metil öjenol seviyeleri daha düşük olarak tespit edilmiştir (Babu ve ark., 2002).

Bununla birlikte, konu ile ilgili olarak Türkiye'de endüstriyel ölçekte standart olabilecek nitelikte ekstraksiyon ve distilasyon ünitelerinin işleyiş ve kurulumuna kılavuz oluşturabilmek amacıyla oluşturulacak olan Standart Operasyon Prosedürü (SOP)'nün ülkemize ekonomik anlamda faydalı olacağı ve ihracat potansiyelini arttıracağı da düşünülmektedir.

Bir bitkisel ürünün kalitesi, hammaddenin kalitesi garanti edilmeden garanti edilemez. Ayrıca, kaliteli ürünlerin süreç içi kontrol, bitmiş ürünün kalite kontrolü, iyi üretim uygulamaları (GMP) kontrolleri ve proses validasyonlarının sağlanmış olması gerekmektedir. Bu bağlamda, bitmiş ürünlerin kalitesindeki farklılıkları en aza indirgemek ve tutarlılığı sağlamak için hammadde spesifikasyonlarının tanımlanması zorunludur. Bitki materyallerinin spesifikasyonları, makroskobik ve mikroskobik tanımlamaları, kimlik testlerini ve analitik ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmelerini içerir. Bu testlerin ve ölçümlerin beklenen sonuçları, sayısal sınırlar veya bir aralık veya ayrık olarak gözlemlenebilir sonuç olarak sunulur (United Nations Industrial Development Organization, 2008).

Bitkisel hammaddelerin içeriği ve bileşimindeki farklılıklara çeşitli faktörler katkıda bulunur. Bu faktörler genel olarak iklim, beslenme, toplama ve hasat sonrası faktörler olmak üzere dört kategoride gruplandırılabilir. İklim faktörleri, ortamındaki sıcaklık, yağış, nem, gün ışığı ve yetiştirilen bölgenin rakımını içermektedir. Beslenmeden kaynaklı faktörler, büyüyen bir bitkinin sağlığını etkileyen ve biyokütle üretimine ve bileşimine yansıyan faktörlerdir; mikro ve makro besinlerin mevcudiyeti, pH ve katyon değişim kapasitesi gibi çeşitli toprak faktörleri bitkilerin optimal büyümesi için önemlidir. Toplama koşulları, yaş, mevsim, toplama zamanı ve toplanan bitkinin parçasına gereken önemi vererek aktif bileşenlerin içeriğini kontrol eder. Toplanan materyal hala canlı olduğu ve metabolik süreçleri yürüttüğü ve solunum yaptığı için hasat sonrası faktörler önemlidir. Enzimatik işlemler, toplamadan sonra kurutma veya diğer uygun muamele ile devre dışı bırakılıncaya kadar devam eder. Materyalin ezilmesi ve kesilmesi, doğal olarak bozulmamış hücrelerde bulunan bitkilerin aktif kimyasal bileşenlerinin bölümlerinin bozulmasına yol açar ve toplanan malzeme, bazı bileşenlerin fiziksel kaybının yanı sıra hava ve ışık ile oksidasyonun doğrudan etkisi ile karşı karşıya kalabilir (Baser ve Buchbauer, 2009).

Üretilen yağ, uluslararası koku, kimyasal bileşim ve genel kalite standartlarını karşılamalıdır. Üretilen yağın farklı partileri arasındaki koku veya lezzetin tekdüzeliği, alınan her taze varil ile formül değiştirilemediğinden alıcı için de önemlidir. Bununla birlikte, otsu kaynağın klonal kontrolünün uygulandığı yerlerde bu en aza indirilebilse

de, üretilen yağlarda her zaman bir miktar değişiklik olacaktır. Ayrıca yağın saflığına da dikkat edilmelidir ve bu nedenle kirlilikler mümkün olduğunca en aza indirmeye çalışılmalıdır. Ticari uçucu yağların bir dizi standartlarla uyumlu olması gerekmektedir (ör. Uluslararası Standartlar Organizasyonu). Standartlar, kırılma indisi, optik rotasyonlar, ester değerleri, donma noktaları, asit değerleri, karbonil değerleri, fenol içerikleri ve alt ve/veya üst limitli kimyasal bileşimlerin sayısal değerleridir. Sayısal değerleri kabul edilen aralıkta olan yağlar pazara girebilir ve ihtiyaç duyulan her sektörde kullanılabilir (Baser ve Buchbauer, 2009).

Dünya Sağlık Örgütü, tıbbi bitki materyalleri için kalite kontrol yöntemleri kitabında, bitkisel ilaçların kalitesinin sağlanmasında değerli olan birkaç parametreyi listelemiştir. Bunlar tanımlama, organoleptik kontrol, makroskobik ve mikroskobik analizler, nem içeriği, yabancı madde miktar tayini, ince tabaka kromatografisi (TLC), kül değerleri, ekstre edilebilir madde tayini, uçucu yağ miktar tayini, su miktar tayini testlerinden oluşmaktadır. Kirlilik tayinleri; pestisit kalıntıları tayini, ağır metal analizleri, radyoaktif kirlilikler ve mikroorganizma kirliliklerini belirleyen testlerden oluşmaktadır. Bazı bitkisel materyallerde özel olarak, acılık derecesi tayini, hemolitik aktivite tayini, şişme indisi, köpürme indisi testlerinin yapılması gerektiği belirtilmiştir. Avrupa İlaç Ajansı'nın "Bitkisel tıbbi ürünlerin kalitesine ilişkin Kılavuz" ve "Spesifikasyonlara ilişkin Kılavuz", tıbbi bitkilerin kalite ile ilgili konularını daha net bir şekilde tanımladığı belirtilmiştir.

Bitkisel ilaçlarda veya besin takviyesinde kullanılacak bitki türevli ham ekstrelerin ekstraksiyonu için herhangi bir standart protokolün geliştirilmesinin önemli bir parçası, örnekten bir numune alınması yoluyla ekstrenin orijinal botanik kaynağının uygun şekilde belgelenmesi olarak değerlendirilmiştir. Bitkinin toplandığı bölgenin ülke, eyalet veya il, ilçe veya belediye dahil olmak üzere konumu mümkün olduğunca kesin olarak kaydedilmeli ve yollar, kavşaklar ve şehirlerden/kasabalardan uzaklık işaretleri gibi kolayca bulunabilen özelliklere yakınlık tanımı yapılmalıdır (Hildret ve ark., 2007).

Bir ekstresinin kalitesini etkileyen temel parametreler; başlangıç materyali olarak kullanılan bitkisel materyal, ekstraksiyon için kullanılan çözücü, kullanılan ekipman tipi ile kullanılan üretim süreci (ekstraksiyon teknolojisi) ve ham madde: çözücü oranı olarak değerlendirilmiştir. Uygun ekstraksiyon teknolojisinin, bitki materyalinin, üretim ekipmanının, ekstraksiyon yönteminin ve çözücünün kullanılmasının ve iyi üretim uygulamalarına bağlılığın, kesinlikle iyi kalitede bir ekstrenin üretilmesine yardımcı olduğu ortaya konmuştur. Başarılı endüstriyel ölçekte üretim için laboratuvar ölçeğinden pilot ölçeğe kadar tüm koşullar ve parametreler süreç simülasyonu kullanılarak modellenebilir.

Bitkisel materyalden tıbbi ürün elde etmek için; öğütme, ekstraksiyon, filtrasyon, konsantre hale getirme ve kurutma gibi sıralı adımlar uygulanması gereken temel işlemler olarak belirtilmiştir.

Genellikle öğütme aşamasında, bitki materyali 30 ila 40 mesh arasında bir boyuta küçültülür, ancak ihtiyaç duyulursa bu değiştirilebilir. Bitki materyalini toz haline getirmenin amacı, organ, doku ve hücre yapılarını parçalayarak tıbbi bileşenlerinin ekstraksiyon çözücüsüne geçmesini sağlamak olarak belirtilmiştir. 30-40 mesh boyutunun en uygun boyut olarak değerlendirilmesinin bir sebebi olarak, daha küçük partiküllerin ekstraksiyon sırasında yapışkan hale gelebileceği ve filtrasyon sırasında zorluk yaratabileceği ihtimalleri öne sürülmüştür.

Bitki materyalinin ekstraksiyonu, soğuk sulu perkolasyon, dekoksiyon, soğuk ya da sıcak çözücü ile ekstraksiyonu şeklinde yöntemlerle sağlanabilir. Soğuk sulu perkolasyonda, toz halindeki bitkisel materyal tamamen ıslanana ve üzeri su ile kaplanana kadar soğuk su ilave edilmelidir. Suda çözünen bileşenlerin suda dengeye ulaşması için 24 saat bekletilmelidir. Dekoksiyonda, ekstraktörün 316 tipi paslanmaz çelikten yapılmış silindirik bir kap içermesi ve yükseklikten daha büyük bir çapa sahip olması önemli olarak belirtilmekle birlikte yükseklik/çap oranının yaklaşık 0,5 olması ideal olarak belirlenmiştir. Bir kısım toz bitki materyalinin üzerine ve on altı kısım demineralize su ilave edilmesi uygun olarak nitelendirilmekle birlikte, malzemenin, su hacminin orijinal hacminin dörtte birine düşene kadar kaynamaya bırakılmasının

önemi vurgulanmıştır. Dekoksiyondan sonra filtrasyon işleminde, ekstrakste edilmiş bitki materyalinin ve esktrenin ayrımı sağlanmaktadır. Ekstreden ince veya koloidal partikülleri çıkarmak için ekstrenin bir maytap filtresi içerisinden pompalanarak geçmesi uygun olarak değerlendirilmektedir. Süzülen ekstre, kuru toz elde etmek için kontrollü bir besleme hızı ve sıcaklıkta yüksek basınçlı bir pompa ile püskürtmeli kurutmaya tabi tutulmalıdır. Üründe istenilen partikül boyutu, haznenin iç sıcaklığı kontrol edilerek ve pompa basıncı değiştirilerek elde edilebilmektedir. Kuru toz haline gelen ekstre, uygun seyrelticiler veya eksipiyanlar ile karıştırılabilir. Çözücü ekstraksiyonunda; katı-sıvı ekstraksiyonunun prensibi, katı bir materyal bir çözücü ile temas ettiğinde, katı materyaldeki çözünür bileşenlerin çözücüye hareket etmesidir. Bu nedenle, bitki materyalinin çözücü ekstraksiyonu, çözünür aktif maddenin (tıbbi bileşen) çözücüye kütle transferiyle sonuçlanır ve bu, bir konsantrasyon gradyanında gerçekleşir. Çözücü içindeki aktif madde konsantrasyonu arttıkça, dengeye ulaşılana kadar kütle transfer hızı azalır, yani katı madde ve çözücüdeki aktif madde konsantrasyonları aynıdır. Bundan sonra, bitki materyalinden çözücüye aktif maddenin kütle transferi artık olmayacaktır. Bu aşamada oluşabilecek problemleri gidermek için soğuk perkolasyon, sıcak perkolasyon, yoğunlaştırma gibi farklı yöntemler uygulanabilmektedir.

Bitkisel materyalin ekstraksiyonu için kullanılacak prosesin seçimi bir dizi faktöre bağlı olarak belirlenmiştir. Bitkisel materyalin kendine has özellikleri, organ ve dokularının türü hakkında bilgi, ekstraksiyonda en iyi sonucu elde etmek için esas olarak belirlenen koşullardan birisi olarak değerlendirilmiştir. Sıcaklık, bitkisel materyalin maliyeti, çözücü, bitmiş üründe istenen konsantrasyon derecesi, kullanılan çözücünün geri kazanılabilir olması gibi faktörler ekstraksiyon yönteminin seçilmesinde değerlendirilen diğer kriterler olarak belirlenmiştir.

Ekstraksiyon prosedürünün türü, ekstrenin kalitatif ve kantitatif bileşiminin belirlenmesinde de belirleyici bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Ekstrelerin kalitesiyle ilgili bazı önemli noktaların dikkate alınması gerekir. Ekstraksiyon ne kadar kapsamlı olursa, bitkisel materyalden elde edilen bileşenlerin veriminin o kadar iyi olacağı belirtilmiştir. Ekstrelerin kalitesini belirleyen diğer faktörler ekstraksiyon süresi,

sıcaklık ve çözücü hacmi olarak değerlendirilmiştir. Bir bitki ekstresinin bileşimi, çözücünün tipine, konsantrasyonuna ve elüsyon gücüne bağlı olarak belirtilmiştir. Bileşenlerin spektrumu, çözücünün hidrofilik veya lipofilik doğasına bağlı olarak önemli ölçüde değişebileceği bildirilmiştir.

Endüstriyel ölçekli ekstraksiyon için belirli modifikasyonların yapılmasının gerekliliği vurgulanmıştır. Maserasyon için, ekstraksiyon kabı az miktarda çözücü (500-1000 mL) içerdiğinde, ara sıra çalkalamanın sorun oluşturmayacağı tespit edilmiştir. Ancak, büyük miktarda çözücü içeren ve büyük kapların dahil olduğu endüstriyel işler için kapları çalkalamak küçük ölçekli ekstraksiyona göre daha zor olarak değerlendirilmektedir. Endüstriyel ölçekli üretimde perkolasyon için, bitkisel materyal, bir çuval veya saman tabakasıyla kaplanmış delikli bir metal plaka üzerinde desteklenir. Endüstriyel ölçekli perkolatör, çözücüyü akıtmak ve çözücünün akışını gözlemlemek için delikler içeren çıkarılabilir bir kapağa sahip olmalı şeklinde önerilmektedir. Perkolatörden çıkış, bir musluk ve boru hattı ile sağlanmalıdır. Küçük ölçekli ekstraksiyon yapılan perkolatörler, bakırdan yapıldığında kabul görseler de, büyük ölçekli ekstraksiyonda cam veya paslanmaz çelikten yapılmış perkolatörler kabul edilmektedir. Hafif konik şekildeki perkolatör, silindirik şekillilere göre daha iyi olarak nitelendirilmiştir. Bunun sebebi, eğimli kenarların yatağın nihai genişlemesine izin vermesi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca konik şekildeki perkolatörlerde, çözücünün alt kısımlarda bulunan bitkisel materyale daha fazla nüfuz edebildiği ortaya konmuştur.

Katı-sıvı ekstraksiyonu, tıbbi ve aromatik bitki endüstrisinde en yaygın kullanılan birim operasyonlardan biridir. Katı-sıvı ekstraksiyonu oranını etkileyen parametreler; hasat sonrası işleme, bitkisel materyalin özellikleri, çözücü seçimi, bitkisel materyal ile çözücüyü temas ettirme yöntemi, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyonda değiştirilen çözücü sayısı ve ekstraksiyon koşulu olarak sınıflandırılmıştır. Hasattan sonra çoğu bitkinin nem içeriği %60-80 arasındadır ve kurutulmadan saklanmamalıdırlar. Bitkilerin gölgede ince bir tabaka halinde kurutulması genellikle tercih edilmektedir. Büyük miktarlarda bitki materyalini kurutmak için, malzemenin birbiri üzerine istiflenmiş çok sayıda tepsi üzerine

yerleştirilebildiği bir sıcak hava kurutma fırını kullanılır. Tıbbi bitkinin aktif bileşenlerine zarar vermemek için fırın sıcaklığı güvenli bir seviyede tutulmalıdır. Tıbbi bitki endüstrisinde, öğütmek için genellikle bilyalı değirmenler ve sıvı değirmenler kullanılır ve büyük ölçekli ekstraksiyondan önce optimum parçacık boyutu belirlenerek bu boyuta göre öğütme işlemi gerçekleştirilmelidir. Solventin seçiminde, bitki materyalinden sadece aktif, istenen bileşenler ekstrakte edilmelidir, bu da yüksek bir seçiciliğin gerekli olduğu anlamına gelir. Çözücünün üründen uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak için çözücünün kaynama noktası mümkün olduğunca düşük seçilmelidir. Çözücü, ekstre ile kimyasal olarak reaksiyona girmemeli ve kolayca bozunmamalıdır. Çözücü yanıcı ve aşındırıcı olmamalı ve toksik bir tehlike arz etmemelidir; bertarafı çevreyi tehlikeye atmamalıdır. Çözücü, düşük maliyetle kolayca temin edilebilir olmalıdır. Buharlaşma yoluyla çözücü kaybını önlemek için çalışma sıcaklığında düşük bir buhar basıncı gereklidir. Çözücü içermeyen bir ekstre üretmek için çözücü ekstreden kolayca ayrılabilecek nitelikte olmalıdır.

Tıbbi ve aromatik bitkiler için çözücü ekstraksiyonu yöntemine uygun tesisi tasarlamak için önemli faktörler; yüksek ekstraksiyon verimliliği, minimum çözücü kaybı, soğuk ve sıcak ekstraksiyon üniteleri, çalkalama ile ekstraksiyon, çoklu solvent ekstraksiyon sistemleri, çoklu fraksiyon toplama sistemleri, filtreleme ünitesi, çözücü geri dönüşüm ve yoğunlaştırma ünitesi, çözücü kaybını en aza indirmek ve güvenliği en üst düzeye çıkarmak için havalandırmalı havalandırma hatları, tuzlu su sirkülasyon ünitesi, çözücü karışımlarının ayrılması için fraksiyonlama kolonu, buharlaştırma sistemleri veya düşük basınçlar altında çalışmak için döner buharlaştırıcılar, soğuk tutuculu vakum manifoldu sistemi, GMP uyumlu olması ve otomasyon sağlanması olarak belirlenmiştir.

ÖZET

***Origanum onites* L. Üzerinde Uçucu Yağı ve Ekstresinin Elde Edilmesinde Kullanılan Farklı Distilasyon ve Ekstraksiyon Tekniklerinin Ürün Kalitesine Etkinliklerinin Değerlendirilmesi**

Kekik bitkisi Lamiaceae familyasının içerisinde bulunan en önemli bitkilerden birisi olarak değerlendirilmektedir. Ülkemizde kekik bitkisine ait beş cins bulunduğu kayıtlara geçmiştir. Bu cinsler *Origanum*, *Thymus*, *Tymbra*, *Satureja* ve *Coridothymus* cinsleri olarak bilinmektedir. Türkiye, kekik türlerinin önemli bir ihracatçısı haline gelmiştir. İhraç edilen kekikler arasında *O. onites* %80 pazar payı ile ekonomik açıdan en önemli türlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda *Origanum onites*'in toprak üstü kısımlarından farklı iki Clevenger aparatı ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri GC/MS ile tespit edilmiştir. Deneysel çalışmamızda, *O. onites* L.'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzanlı, etil asetatlı, metanollü ekstrelerinin ve standart maddelerin analizleri HPLC ile yapılmıştır. Uçucu yağların, ekstrelerin ve hidrolatların antibakteriyel, antibiyofilm, anti-quorum sensing ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmamızda, farklı tip Clevenger aparatları ile elde edilen *O. onites* uçucu yağının spesifikasyonları kıyaslamalı olarak değerlendirilmiş olup konu ile ilgili veriler Türk Farmakope Dergisi'ne sunulacaktır. *O. onites* uçucu yağına ait tüm spesifisikasyonların değerlendirildiği detaylı bir çalışma daha önce yapılmaması çalışmamızın önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Antibiyofilm, Antioksidan, Anti-quorum sensing, Farmakope, *Origanum onites*

SUMMARY

Evaluation of the Efficiency of Different Distillation and Extraction Techniques Used in Obtaining Essential Oil and Extract on Origanum onites L. on Product Quality

Thyme is considered to be one of the most important plants in the Lamiaceae family. It has been recorded that there are five genera belonging to the thyme plant in our country. These genera are known as *Origanum*, *Thymus*, *Tymbra*, *Satureja* and *Coridothymus* genera. Turkey has become an important exporter of thyme species. Among the exported thyme, *O. onites* was evaluated as one of the most economically important species with a market share of 80%. In our study, the components of essential oils obtained by two different Clevenger apparatus from the aerial parts of *Origanum onites* were determined by GC/MS. In our experimental study, the analyzes of n-hexane, ethyl acetate, methanolic extracts and standard substances prepared from the aerial parts of *O. onites* L. were made by HPLC. The antibacterial, antibiofilm, anti-quorum sensing and antioxidant activities of essential oils, extracts and hydrolates were investigated. In our study, the specifications of *O. onites* essential oil obtained with different types of Clevenger apparatus were evaluated comparatively and the relevant data will be presented to the Turkish Journal of Pharmacopoeia. The fact that a detailed study evaluating all the specifications of *O. onites* essential oil has not been done before reveals the importance of our study.

Keywords: Antibiofilm, Antioxidant, Anti-quorum sensing, *Origanum onites*, Pharmacopoeia

KAYNAKLAR

ABDUL-MAJEED BA, HASSAN, AA, & KURJI BM (2013). Extraction of oil from Eucalyptus camadulensis using water distillation method. *Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering*, **14**(2), 7-12.

ACIBUCA V, BUDAK BD (2018). Place and importance of medicinal and aromatic plants in the world and Turkey. *Çukurova Journal of Agricultural Food Science*, **33**(1), 37-44.

AĆIMOVIĆ MG, TEŠEVIĆ VV, SMILJANIĆ KT, CVETKOVIĆ MT, STANKOVIĆ JM, KIPROVSKI BM, SIKORA VS (2020). Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced technologies*, **9**(2), 54-70.

ALKAN M (2020). Chemical composition and insecticidal potential of different Origanum spp.(Lamiaceae) essential oils against four stored product pests. *Turkish Journal of Entomology*, **44**(2), 149-163.

ARSLAN M (2011). *Üzüm çekirdeklerinden enzim destekli sulu ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

AYANOGÇ LU F, ERGÜL A, ARSLAN M (2006). Assessment of genetic diversity in Turkish oregano (Origanum onites L.) germplasm by AFLP analysis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **81**(1), 45-50.

AYDIN S, ÖZTÜRK Y, BEIS R, HÜSNÜ CAN BAŞER K (1996). Investigation of Origanum onites, Sideritis congesta and Satureja cuneifolia essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Research*, **10**(4), 342-344.

AVCI AB (2006). *Geliştirilmiş izmir kekiği (Origanum onites L.) klonlarının farklı ekolojik koşullarda bazı agronomik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Ege University (Turkey)).

AZIZ ZA, AHMAD A, SETAPAR SHM, KARAKUCUK A, AZIM MM, LOKHAT D, ASHRAF GM (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, **19**(13), 1100-1110.

BABU KG, KAUL VK, AHUJA PS (2002). Portable mini essential oil distillation apparatus.

BABU KG, KAUL VK (2005). Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and fragrance journal*, **20**(2), 222-231.

BAĞDAT RB (2006). Tibbi ve aromatik bitkilerin kullanim alanlari, tibbi adaçayi (Salvia officinalis L.) ve ülkemizde kekik adiyla bilinen türlerin yetiştirme teknikleri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **15**(1-2), 19-28.

BALI EB, TÜRKMEN KE, ERDÖNMEZ D, SAĞLAM N (2019). Comparative Study of Inhibitory Potential of Dietary Phytochemicals Against Quorum Sensing Activity of and Biofilm Formation by Chromobacterium violaceum 12472, and Swimming and Swarming Behaviour of Pseudomonas aeruginosa PAO1. Food Technol Biotechnol. 2019 Jun;**57**(2):212-221.

BAYRAKTAR ÖV, ÖZTÜRK G, ARSLAN D (2017). Türkiye'de bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin üretimi ve pazarlamasındaki gelişmelerin değerlendirilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 62-75. doi:10.21566/tarbitderg.369928

BAYRAM Y, TORLAK Y, AĞDIÇ O (2019). Üvez meyvesinin antioksidan aktivitesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **(16)**, 933-939.

BASER KHC, BUCHBAUER G (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.

BAŞER KHC, DEMIRCI F (2007). Chemistry of essential oils. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, edited by Berger RG. New York: Springer*, 43-86.

BATOHI N, LONE SA, MARIMANI M, WANI MY, AL-BOGAMI AS, AHMAD A. Citral, and its derivatives inhibit quorum sensing and biofilm formation in Chromobacterium violaceum. Arch Microbiol. 2021 May;**203**(4):1451-1459.

BENZIE IF, WACHTEL-GALOR S (2010). Vegetarian diets and public health: biomarker and redox connections. *Antioxidants & redox signaling*, **13**(10), 1575-1591.

BHADRA P, PARIDA S. And Its Benefits.

BOSTANCIOĞLU RB, KÜRKÇÜOĞLU M, BAŞER KHC, KOPARAL AT (2012). Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of Origanum onites L. essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, **50**(6), 2002-2008.

BOUAYED J, BOHN T (2012). Dietary derived antioxidants: implications on health. *Nutrition, Well-Being and Health. Croatia: InTech*, 1-22.

BOYDAĞ İ (2014). *Origanum onites I.(kekik) yağ altı suyunun uçucu bileşikleri* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

BOZDEMİR Ç (2019). Türkiye'de yetişen kekik türleri, ekonomik önemi ve kullanım alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, **29(3)**, 583-594.

BÜYÜKTUNCEL E (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **(2)**, 209-242.

CARROLL JF, DEMIRCI B, KRAMER M, BERNIER UR, AGRAMONTE NM, BASER KHC, TABANCA N (2017). Repellency of the Origanum onites L. essential oil and constituents to the lone star tick and yellow fever mosquito. *Natural product research*, **31**(18), 2192-2197.

CELLAT, K. (2011). *Bazı endemik bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılmas* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

CERPA MG, MATO RB, OSÉ COCERO M (2008). Modeling steam distillation of essential oils: application to lavandin super oil. *AIChE Journal*, **54**(4), 909-917.

ÇELİK AD, Aykut GÜL (2016). Tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliği ve dış ticareti: Hatay ili örneği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **21**(2).

ÇELIK E, ÇELIK GY (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **5**(2), 1-6.

CETIN H, ERLER F, YANIKOGLU A (2007). A comparative evaluation of Origanum onites essential oil and its four major components as larvicides against the pine processionary moth, Thaumetopoea wilkinsoni Tams. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, **63**(8), 830-833.

CHEMAT F, CRAVOTTO G (Eds.). (2012). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice* (Vol. 4). Springer Science & Business Media.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. In: CLSI Publication M07-A8, 8th ed. Wayne, PA, USA.

COCK IE. (2011). Medicinal and aromatic plants–Australia. Ethnopharmacology, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).

Çutuk İE. *Uçucu yağ karışımlarının farklı solventlerle ayrılmasının incelenmesi* (Master's thesis, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).

DAVIS PH (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3.*

DE LA TORRE TORRES JE, Gassara F, Kouassi AP, Brar SK, Belkacemi K. (2017). Spice use in food: properties and benefits. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(6), 1078-1088.

DIŞLI M, YEŞILADA E (2019). Türkiye 'de Bitkisel Tıbbi Ürünler (Türkiye'de Bitkisel Ürünlerin Standardizasyonu, Üretimi Ve Tağşiş). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, **3**, 13-21.

DI VITO M, SMOLKA A, PROTO MR, BARBANTI L, GELMINI F, NAPOLI E, BUGLI F (2021). Is the antimicrobial activity of hydrolates lower than that of essential oils?. *Antibiotics*, **10**(1), 88.

DJILANI A, DICKO A (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, **7**, 155-179.

DÜLGER GÇ, GEÇGEL Ü, CULPAN E, Mikrodalga Ekstraksiyon Yöntemiyle Uçucu Yağ Eldesi.

EL ASBAHANI A, MILADI K, BADRI W, SALA M, ADDI EA, CASABIANCA H, ELAISSARI A (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, **483**(1-2), 220-243.

ERDEMGIL FZ (2015). *Origanum onites L. Uçucu yağının bileşimi* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

ERENLER R, DEMIRTAS I, KARAN T, GUL F, KAYIR O, KARAKOC OC (2018). Chemical constituents, quantitative analysis and insecticidal activities of plant extract and essential oil from Origanum onites L. *Trends in Phytochemical Research*, **2**(2), 91-96.

ERSOZ T (2012). Bitkisel İlaç ve Gıda Takviyeleri ile İlgili Genel Yaklaşım ve Sorunlar. Türk Eczacıları Birliği Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, **27**, 9-20.

ERYILMAZ, M., KART, D., & GÜRPINAR, S. S. (2019). Vajinal Floradan İzole Edilen *Lactobacillus* sp. Metabolitlerinin Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, **49**(3), 169-174.

ESCLAPEZ, M. D., GARCÍA-PÉREZ, J. V., MULET, A., & CÁRCEL, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, *3*(2), 108-120.

European Pharmacopoeia. Essential Oils. European Directitorate for the Quality of Medicines. 10th edition. Strasbourg: 2019.

FAYDAOĞLU E, SÜRÜCÜOĞLU MS (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, **11**(1), 52-67.

FOLASHADE O, OMOREGIE H, OCHOGU P (2012). Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, **4**(3), 101-112.

GAJDÁCS M, SPENGLER G, Standard Operating Procedure (Sop) For Disk Diffusion-Based Quorum Sensing Inhibition Assays. Acta Pharm Hung 2020, **89**, 117-125.

GHORBANPOUR M, HADIAN J, NIKABADI S, VARMA A (2017). Importance of medicinal and aromatic plants in human life. In *Medicinal Plants and Environmental Challenges* (pp. 1-23). Springer, Cham.

GÖKBULUT A (2011). *Türkiye'de Yetişen Bazı Inula L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar* (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

GÖKTAŞ Ö, GIDIK B (2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **2**(1), 145-151.

GUENTHER E, ALTHAUSEN D (1948). *The essential oils* (Vol. 1, p. 774). New York: Van Nostrand.

GÜMRÜK G.T.İ.P. BÖLÜM BAŞIKLARI Erişim: [https://www.gumruk.com.tr/gtip/] Erişim tarihi: 05/04/2022

GÜVEN N (2019). *Eskişehir'De Yetiştirilmiş Origanum Vulgare Subsp. Hirtum Uçucu Yağ Değerlendirmesi* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).

HILDRETH J, HRABETA-ROBINSON E, APPLEQUIST W, BETZ J, MILLER J (2007). Standard operating procedure for the collection and preparation of voucher plant specimens for use in the nutraceutical industry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389**(1), 13-17.

JARED SD. Cytotoxic Effect Of Origanum Onites Essential Oil On Hepatocellular Carcinoma (Hepg2) Cells.

JARDAK M, MNIF S, AYED RB, REZGUI F, AIFA S (2021). Chemical composition, antibiofilm activities of Tunisian spices essential oils, and combinatorial effect against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. LWT, 140, 110691.

INAN MY (2021). Influence of in vitro human digestion simulation on the chemical compositions and biological activities of cistus species growing in Turkey (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

IRSHAD M, SUBHANI MA, ALI S, HUSSAIN A (2020). Biological importance of essential oils. *Essential Oils-Oils of Nature*, 1.

KASKATEPE B, YILDIZ SS, KIYMACI ME, YAZGAN AN, CESUR S, ERDEM SA (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of the commercial Origanum onites L. oil against nosocomial carbapenem resistant extended spectrum beta lactamase producer Escherichia coli isolates. *Acta Biologica Hungarica*, **68**(4), 466-476.

KARADAYI M, YILDIRIM V, GÜLLÜCE M. Antimicrobial Activity and Other Biological Properties of Oregano Essential Oil and Carvacrol. *Anatolian Journal of Biology*, **1**(2), 52-68.

KARTAL MO, EKINCI MB, POYRAZ B (2021). Biyofilm Yapısı ve Önlenmesi. *Akademik Gıda*, **19**(3), 353-363.

KAYA D, ERGÖNÜL PG (2015). UÇUCU YAĞLARI ELDE ETME YÖNTEMLERİ. *GIDA/The Journal of FOOD*, **40**(5).

KEBEDE A, HAYELOM M (2008). The Design and Manufacturing of Essential oil Distillation Plant for rural poverty Alleviation in Ethiopia. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*, **1**(1), 81-91.

KETBOĞA M (2019). Türkiye'de dış ticaret açığı sorunun nedenleri ve katma değeri düşük ürün ihracatının dış ticaret açığı içindeki yeri ve çözüm önerileri.

KILIÇ A (2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, **10**(13), 37-45.

KOCKMANN N (2014). History of distillation. In *Distillation* (pp. 1-43). Academic Press.

KURT R, İMREN E (2018). Türkiye'deki önemli tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstri içi ticaret göstergeleri ile statik ve dinamik analizi. *Journal of Bartin Faculty of Forestry*, **20**(3), 548-557.

MAHOMOODALLY MF, ZENGIN G, ALADAG MO, OZPARLAK H, DIUZHEVA A, JEKŐ J, AUMEERUDDY MZ (2019). HPLC-MS/MS chemical characterization and biological properties of Origanum onites extracts: a recent insight. *International journal of environmental health research*, **29**(6), 607-621.

MASANGO P (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, **13**(8), 833-839.

METIN İ, GÜNGÖR H, ÇOLAK ÖF (2012). Bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin ihracatı ve ithalatı. *Tıbbı ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*, 13-15.

MORTIMER L (2004). Personal communication. Southern African Stainless Steel Development Association, Johannesburg, South Africa, 5 May 2004.

ÖZDEMIR N, ÖZGEN Y, KIRALAN M, BAYRAK A, ARSLAN N, RAMADAN MF (2018). Effect of different drying methods on the essential oil yield, composition and antioxidant activity of Origanum vulgare L. and Origanum onites L. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **12**(2), 820-825.

ÖZER Z (2020). Chemical composition and antioxidant activities of leaf and flower essential oils of origanum onites l.(lamiaceae) growing in mount ida-Turkey.

ÖZKAN G, BAYDAR H, ERBAS S (2010). The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (Origanum onites L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**(2), 205-209.

ÖZKAN A, ERDOĞAN A (2011). A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from Origanum onites (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, **35**(6), 735-742.

PIZZALE L, BORTOLOMEAZZI R, VICHI S, ÜBEREGGER E, CONTE LS (2002). Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S fruticosa) and oregano (Origanum onites and O indercedens) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**(14), 1645-1651.

POLAT DÇ. Fındık yağının kozmetik ürünlerde kullanımı. *Akademik Ziraat Dergisi*, **8**(Özel Sayı), 175-178.

RESMI GAZETE, Erişim: [https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/10/20141027-3.htm] Erişim tarihi: 08/02/2022

REYES-JURADO F, FRANCO-VEGA A, RAMÍREZ-CORONA N, PALOU E, LÓPEZ-MALO A (2015). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, **7**(3), 275-297.

REVERCHON E (1997). Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, **10**(1), 1-37.

ROOHINEJAD S, KOUBAA M, BARBA FJ, LEONG SY, KHELFA A, GREINER R, CHEMAT F (2017). Extraction methods of essential oils from herbs and spices. *Essential Oils in Food Processing [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd*, 21-55.

SALTAN G, ERDEM ME (2019). Klinik Fitoterapi-1: Etkinliği Kanıtlanmış Tıbbi Bitkiler

SARAC N, UGUR A (2008). Antimicrobial activities of the essential oils of Origanum onites L., Origanum vulgare L. subspecies hirtum (Link) Ietswaart, Satureja thymbra L., and Thymus cilicicus Boiss. & Bal. growing wild in Turkey. *Journal of medicinal food*, **11**(3), 568-573.

SEZIK E, KOCAKULAK E, BASER KHC, OZEK T (2005). Composition of the essential oils of Juniperus oxycedrus subsp. macrocarpa from Turkey. *Chemistry of natural compounds*, **41**(3), 352-354.

SHIVANAND P, NILAM M, VIRAL D (2010). Herbs play an important role in the field of cosmetics. *International Journal of PharmTech Research*, **2**(1), 632-639

SHREEN MUSA, ÇELIK İ (2020). Determination of hepatoprotective and antioxidant role of thyme (origanum onites L.) infusion against ethyl alcohol induced oxidative stress in rats. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, **10**(2), 54-61.

SIMPSON MG (2019). *Plant systematics*. Academic press.

SPYRIDOPOULOU K, FITSIOU E, BOULOUKOSTA E, TIPTIRI-KOURPETI A, VAMVAKIAS M, OREOPOULOU A, CHLICHLIA K (2019). Extraction, chemical composition, and anticancer potential of Origanum onites L. essential oil. *Molecules*, **24**(14), 2612.

STICHLMAIR JG, KLEIN H, REHFELDT S (2021). *Distillation: principles and practice*. John Wiley & Sons.

STRATAKOS AC, KOIDIS A (2016). Methods for extracting essential oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 31-38). Academic Press.

ŞAHIN S (2017). Geleneksel, tamamlayıcı, alternatif tıp uygulamalarına genel bir bakış. *Turkish Journal of Family Practice/Türkiye Aile Hekimligi Dergisi*, *21*(4).

ŞARIŞEN Ö, ÇALIŞKAN D (2005). Fitoterapi: bitkilerle tedaviye dikkat (!). *Sted*, **14**(8), 182-187.

TALANDA CE (2005). *The design, construction and testing of a mobile essential oil distillation unit* (Doctoral dissertation).

TASDEMIR D, KAISER M, DEMIRCI B, DEMIRCI F, BASER KHC (2019). Antiprotozoal activity of Turkish Origanum onites essential oil and its components. *Molecules*, **24**(23), 4421.

TEMEL M, TİNMAZ AB, ÖZTÜRK M, GÜNDÜZ O (2018). Dünyada ve Türkiye'de tıbbi-aromatik bitkilerin üretimi ve ticareti. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, **21**, 198-214.

TEMEL M, TOKUR S (2013). Origanum onites ve O. majorana Lamiaceae türleri üzerinde anatomik, morfolojik ve ekolojik çalışmalar. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, **6**(2), 123-133.

TEPE B, CAKIR A, SIHOGLU TEPE A (2016). Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology of Origanum onites (L.): A Review. *Chemistry & Biodiversity*, **13**(5), 504-520.

TONGNUANCHAN P, BENJAKUL S (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, **79**(7), R1231-R1249.

TUBIVES, TÜRKİYE BİTKİLERİ VERİ SERVİSİ Erişim: [http://www.tubives.com/] Erişim tarihi: 16/11/2021

ULCAY S, ŞENEL G (2018). Lamiaceae Familyasına Ait Lycopus europaeus Türü Üzerinde Anatomik Bir Araştırma. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **3**(1), 45-52.

UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION, HANDA SS, KHANUJA SPS, LONGO G, RAKESH DD (2008). *Extraction technologies for*

medicinal and aromatic plants. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.

VALERIO F, MEZZAPESA GN, GHANNOUCHI A, MONDELLI D, LOGRIECO AF, PERRINO EV (2021). Characterization and antimicrobial properties of essential oils from four wild taxa of Lamiaceae family growing in Apulia. *Agronomy*, **11**(7), 1431.

VARLI M, HANCI H, KALAFAT G (2020). Tıbbi ve aromatik bitkilerin üretim potansiyeli ve biyoyararlılığı. *Research Journal of Biomedical and Biotechnology*, **1**(1), 24-32.

YAMAN T, KULEAŞAN Ş (2016). Uçucu yağ elde etmede gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **7**(Özel (Special) 1), 78-83.

YAPAR EA (2018). *Fitokozmetikler. Türk Farmakope Dergisi*, **3**(1), 110-116.

YOUSEFI M, RAHIMI-NASRABADI M, POURMORTAZAVI SM, WYSOKOWSKI M, JESIONOWSKI T, EHRLICH H, MIRSADEGHI S (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **118**, 182-193.