

ÇÖREK OTU BITKİSİ (*Nigella sativa* L.) ÖZÜTÜ KULLANILARAK TiO₂NP'lerin SENTEZİ
VE ANTIMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
SYNTHESIS AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF TiO₂NPs USING
NIGELLA SATIVA L. EXTRACT

Mehmet Fırat BARAN¹, Hilal ACAY², Cumali KESKİN^{2*}, Hüsamettin AYGÜN³, Ayfer
YILDIRIM⁴

^{1,4}Mardin Artuklu Üniversitesi, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu

²Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü,

³Dicle Üniversitesi Biyoloji Bölümü Diyarbakır.

*Sorumlu yazar: ckeskinoo@gmail.com

ÖZET

Nanopartiküllerin biyolojik yeşil yolla sentezi, kimyasal ve fiziksel yöntemlere alternatif olarak kullanılan bir yöntemdir. Nanopartiküller sahip oldukları eşsiz özellikler ve geniş yüzey alanlarına bağlı olarak antimikrobiyal etki göstermektedirler. Bu çalışmada atık durumdaki biyolojik materyalden (çörek otu yaprak özütünden) yararlanarak titanyum dioksit nanopartikülleri (TiO₂NPs) etkili bir şekilde sentezlenmiştir. Bu amaçla sentezlenen titanyum dioksit nanopartikülleri gram pozitif, gram negatif ve mantar mikroorganizmaları üzerinde minimum inhibisyon yöntemi (MİC) ile antimikrobiyal etkileri araştırıldı. Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu Fourier-transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopu (SEM), enerji dağılımlı X-ışını (EDX), ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektrofotometresi (UV-Vis), termogravimetrik ve differensiyel termal analiz (TGA-DTA) ve X-ışını kırınımı (XRD) cihazları kullanılarak yapıldı. Sonuç olarak biyolojik kaynakla sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan TiO₂NP'lerin güçlü antimikrobiyal etkiye sahip oldukları ve alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirlikleri tespit edildi.

Anahtar kelimeler: TiO₂, yeşil sentez, *Nigella sativa*, XRD ve TGA-DTA, FTIR, SEM.

ABSTRACT

The green-way synthesis of nanoparticles is an alternative to chemical and physical methods. Nanoparticles have an antimicrobial effect due to their unique properties and large surface areas. In this study, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) were efficiently synthesized by utilizing waste biological material (*Nigella sativa* L. leaf extract). Antimicrobial effects of synthesized titanium dioxide nanoparticles on gram-positive, gram-negative and fungal microorganisms were investigated with the minimum inhibition method (MIC). Characterization of the obtained nanoparticles was determined by using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray (EDX), ultraviolet and visible light absorption spectrophotometry (UV-Vis), thermogravimetric and differential thermal analysis (TGA-DTA) and X-ray diffraction (XRD) devices. As a result, it was determined that TiO₂NPs synthesized and characterized by biological sources have a strong antimicrobial effect and can be used as an alternative antimicrobial agent.

Keywords: TiO₂; green synthesis; *Nigella sativa*; XRD; TGA-DTA, FTIR, SEM

1.Giriş

Nanoteknoloji, nano düzeyde yeni malzemeler üretmek amacıyla bilim ve teknolojiye uygulanan hızla büyüyen bir alandır (Santhoshkumar vd. 2014). Nano yapı metal oksitler geniş kullanım alanlarından dolayı bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Özellikle yeşil yolla sentezlenmiş metal-metal oksit nanoparçacıkları, gümüş, altın, ve titanyum dioksit (TiO₂) gibi materyaller, gıda ürünlerinin korunmasında, ilaç üretiminde ve biyoremediasyon da kullanılmaktadırlar (Ansari ve Kurian 2017). TiO₂NP'leri tıp alanındaki yeni tekniklerin geliştirilmesinde, termodinamik kararlılıklarına bağlı olarak malzeme bilimlerinde, foto katalitik aktiviteleri ve organik kirleticilerin su ve sulu atıklarda giderimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Nasrollahzadeh ve Sajadi 2015). Ayrıca

TiO₂, kristalimsi formda bulunan ucuz maliyetli ve toksik olmayan bir nano malzemedir (Mulmi vd. 2018). Kristalimsi yapıya sahip olan nanopartiküllerin antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinmektedir (Acay ve ark. 2019; Baran 2019). Bu çalışmada Çörek otu (*Nigella sativa* L.) yeşil yaprakları kullanılarak TiO₂ nanopartikülleri sentezlendi ve karakterize edildi (Şekil 1). Sentezlenen nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi minimum inhibisyon yöntemi ile belirlendi.



Şekil 1. Çörek otu bitkisi.

2. Materyal ve Metot

2.1. Çörek otu (*Nigella sativa* L.) bitki özütü ve titanyum(III) klorid (TiCl₃) çözeltisinin hazırlanması

Çörek otu bitkisi Mardin Kızıltepe yolu 5. Km'de çiçeklenme döneminde (Temmuz-Ağustos 2019) toplandı. Atık durumdaki yeşil yapraklar musluk suyu ile yıkanarak topraktan arındırıldı, yıkama işlemi saf su ile tekrarlanarak çeşme suyundaki olası metal kontaminasyonu giderildi. Yıkanan çörek otu bitki yaprakları oda koşullarına kurumaya bırakıldı. Kurutulan bitki yaprakları öğütülerek toz haline getirildi ve deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere nemsiz bir ortamda muhafaza edildi. 5 gr bitki örneği 100 ml saf su ile birlikte bir beherin içerisine konulduktan sonra kaynamaya bırakıldı. Kaynayan özüt oda koşullarında soğutuldu. Elde edilen özüt süzme işlemine tabi tutuldu. Elde edilen süzüntü deneylerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi. Ticari olarak temin edilen (Sigma-Aldrich marka) % 12.0 saflıkta titanyum(III) klorid (TiCl₃)'ten 1 mM sulu çözelti hazırlandı.

2.2. Nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu

100 ml çörek otu bitki özütü ile titanyum(III) klorid çözeltisi (pH:6.0) bir behere konuldu. Isıtıcı manyetik karıştırıcı yardımıyla 45°C'de bitki özütü ve metal çözeltisi reaksiyon ortamına bırakıldı. 4 saat sonra renk değişimi gözlemlendi. Agilent Cary 60 UV-Visible spektroskopi cihazı ile 30 dakika aralıklarla alınan örneklerden TiO₂NP'lerin oluşumu ve varlığı gözlemlendi. Agilent Cary 630 FT-IR cihazı ile çörek otu bitki özütünde varolan fonksiyonel gruplar ve reaksiyon sonunda indirgemeden sorumlu olan fonksiyonel gruplardaki değişim tespit edildi. Oluşan renkli çözelti 6000 rpm de 10 dakika santrifüj (OHAUS FC 5706) edildi. Her defasında süpernatant ayrılarak çöken kısımlar toplandı. Bu işlem sonucunda elde edilen çökelti saf su ile birkaç defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Toplanan çökelti 80 °C'de 24 saat kurutulmaya bırakıldı. Elde edilen nanopartikül materyallerin X-ışını difraktometresi (RadB-DMAX II bilgisayar kontrollü) ve taramalı elektron mikroskobu (EVO 40 LEQ) kullanılarak görünüşleri (kristal yapı, boyut) ve element kompozisyonları belirlendi. TGA-50 (Shimadzu) cihazı kullanılarak TiO₂NP'lerin farklı sıcaklıklardaki termogravimetrik ve difarensiyel termal (TGA-DTA) bozunumları incelendi.

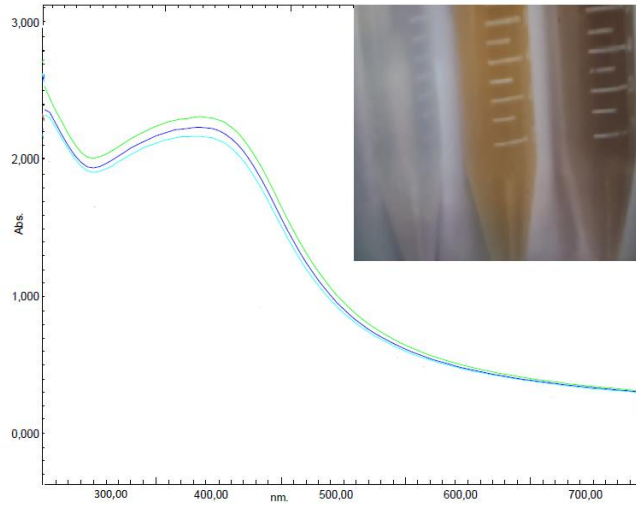
2.3. TiO₂NP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Sentezlenen TiO₂NP'lerin bazı mikroorganizmaların üremesi üzerindeki inhibisyon etkileri gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922), gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) bakteriler ve *Candida albicans* mayası kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) mikrodilüsyon metoduyla belirlendi. Mikroplaka kuyucuklarına Muller Hinton besiyeri, farklı konsantrasyonlarda TiO₂NP çözeltisi ve Mc Farland standardı 0.5'e (bulanıklık) göre hazırlanan mikroorganizma

karışımından konuldu. 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TiO₂NP'lerin antimikrobiyal etkilerininin karşılaştırması için ticari olarak temin edilen *S.aureus* bakterisi için vankomisin, *E.coli* bakterisi için colistin ve *C. albicans* mayası için flukanazol standart antibiyotikleri kullanıldı. Böylece 1 mM TiO₂NP sulu çözeltisinin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerine araştırıldı.

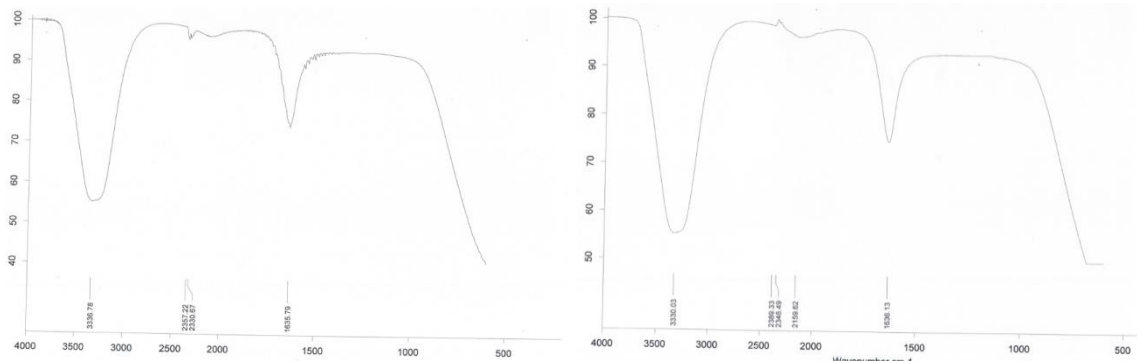
3.Bulgular ve tartışma

Atık durumdaki çörek otu yeşil yapraklarından elde edilen 100 mL özüt ile 1 mM 250 mL TiCl₃ çözeltisi bir behere konularak 45°C'de dört saat boyunca karıştırıldı ve reaksiyon sonunda renk değişimi meydana geldi (Şekil 2). Meydana gelen bu renk değişimi plazma yüzeyindeki titreşimlerle TiO₂NP'lerin varlığını ifade eder. Maksimum absorbans olan 390 nm'de tespit edilen pikler TiO₂NP'lerin oluştuğunu göstermektedir (Şekil 2). Nasrollahzadeh ve Sajadi (2015), yapmış oldukları bir çalışmada TiO₂NP'lerin yakın dalga boylarında benzer pikler verdiğini bildirmiştir.



Şekil 2. Titanyum dioksit (TiO₂NP) nanopartiküllerin farklı zamanlarda alınan örneklerin UV-vis verileri.

İnfrared spektroskopi (FTIR) analizinde TiO₂NP'lerin yeşil sentezinde indirgemenen sorumlu fonksiyonel gruplar incelendi. Çörek otu bitkisinde var olan belli gruplardaki (3330, 2330 ve 1636 cm⁻¹) kaymalar, reaksiyonun bu fonksiyonel gruplar üzerinde gerçekleştiğini düşündürmektedir (Şekil 3). Benzer bir çalışmada titanyum dioksit nanopartikül sentezinde etkin grupların 3300 cm⁻¹ deki fonksiyonel grubun reaksiyonda rol aldığını ifade etmişlerdir (Mulmi vd. 2018),(Acay, Baran, ve Eren 2019)(Li vd 2019).



Şekil 3. FT-IR Analiz Sonucu ; A. Çörek otu Bitki Özütünün FT-IR görünümü, B. Reaksiyon sonrası fonksiyonel grupların değerlendirilmesi.

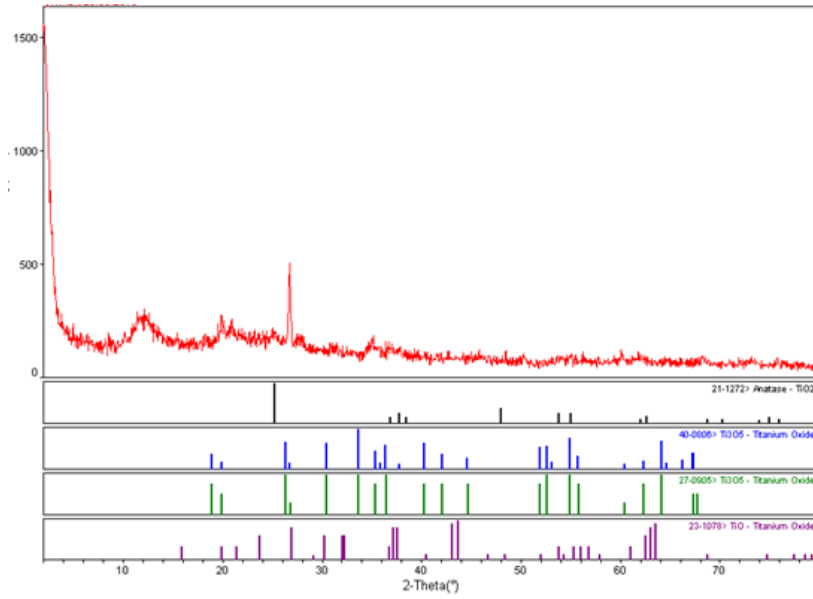
Çörek otu bitkisinin yeşil yaprakları ile sentezlenen TiO₂NP'lerin X-ışınımı kırınımı (XRD) değerlendirildi (Şekil 4). XRD sonuçlarında (1 0 1), (1 0 3), (0 0 4), (1 1 2), (2 0 0), (1 0 5), (2 1 1), (2 0 4), (1 1 6), (2 2 0) ve (2 1 5) de ki piklerin titanyum dioksitin karakteristik kristal yapısına ait olduğu

ve bu piklerin 2θ da değerleri sırası ile 24.08, 26.76, 35.17, 39.70, 41.66, 43.89, 53.72, 55.51, 68.19 ve 76.34 olduğu görülmektedir. Diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğu tespit edildi (Santhoshkumar vd. 2014)(Nasrollahzadeh ve Sajadi 2015)(Srinivasan vd. 2019). Yapılan bu çalışmada titanyum dioksit nanopartiküllerin boyutunu xrd deseninden en yüksek pikin 2θ 'daki değerinden hesaplandı.

XRD analizi sonucunda TiO_2NP 'lerin kristal tanecik boyutunun 30.61 olduğu Debye-Scherrer eşitsizliği kullanılarak hesaplandı.

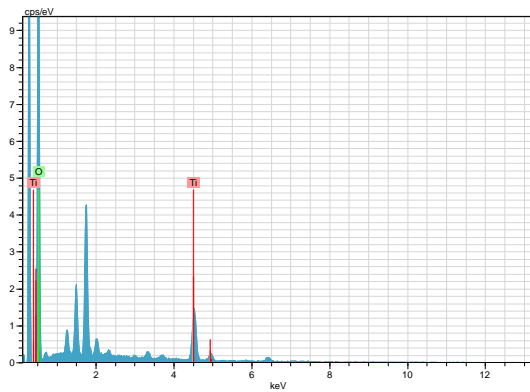
$$D = K\lambda / (\beta \cos\theta)$$

Eşitsizlikte D = Parçacığın boyutu (nm), K = Sabit (0.90), λ = Dalgaboyu X-ray (1.5406 oA), β = En yüksek pikin değerinin yarısı radyan cinsinden (FWHM), θ = Kırılma açısı olarak belirtilmiştir (Baran ve acay 2019; Eren ve Baran 2019).



Şekil 4. TiO_2NP 'lerin XRD analiziyle kristal yapısı ve titanyumdioksit fazlarının incelenmesi.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi verileri incelendiğinde titanyum dioksit nanopartiküllerinin küresel yapıda olduğu tespit edilmiştir. EDX analizi sonuçları ise titanyum dioksit nanopartiküllerinin oksitli yapıda olduğunu göstermektedir (Şekil 5). Diğer bitkisel kaynaklı nanopartikül sentez çalışmaları da bu yapıların genellikle küresel formda olduğunu göstermektedir (Santhoshkumar ve ark. 2014; Goutam ve ark. 2018; Zhang ve ark. 2018).

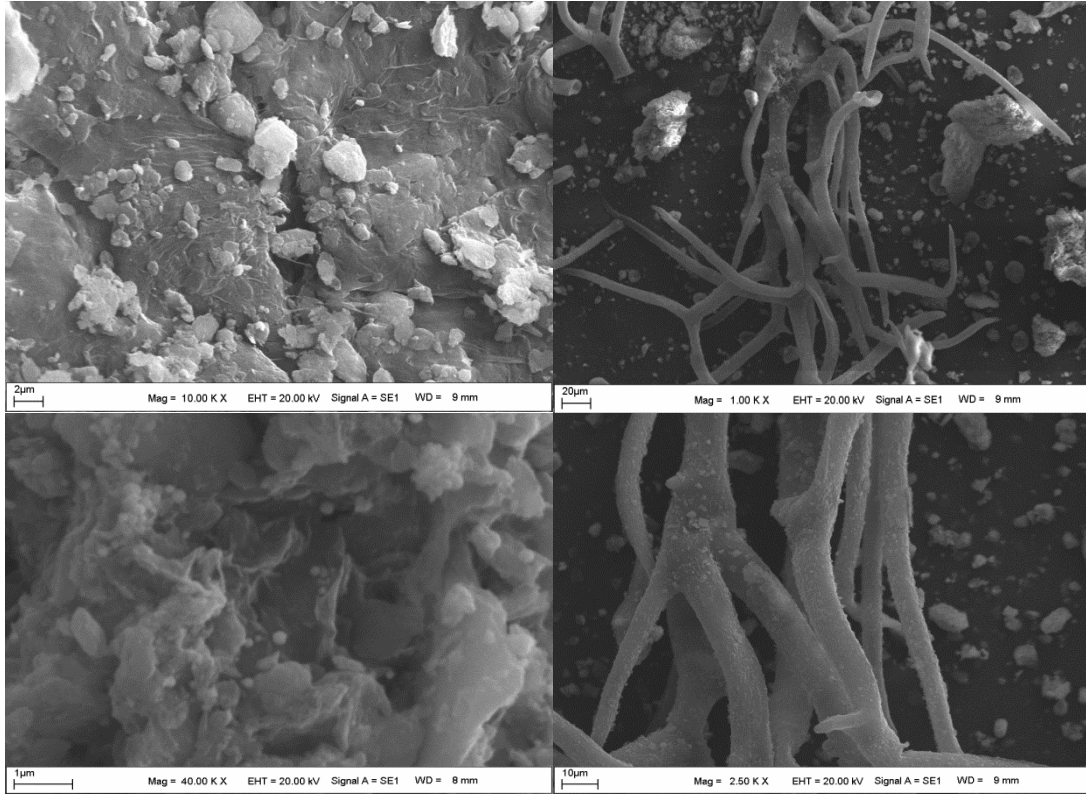


Spectrum: Objects

El AN Series	unn. C norm.	C Atom.	C Error
	[wt.-%]	[wt.-%]	[at.-%]

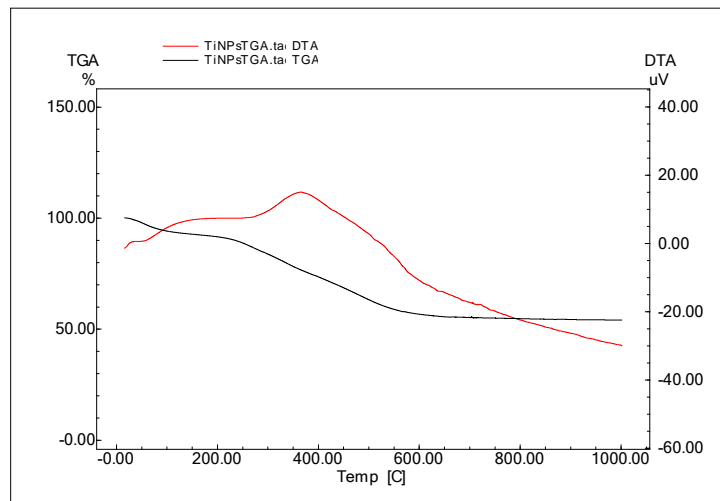
Ti 22 K-series	7.50	7.50	2.64	0.3
O 8 K-series	92.50	92.50	97.36	65.0

Total:	100.00	100.00	100.00	
--------	--------	--------	--------	--



Şekil 5. Bitkisel kaynaklı sentezlenen TiO_2NP 'lerin SEM/EDX görünümü ve element kompozisyonları.

Termalgravimetrik ve differensiyel termal analiz sonucu (TGA-DTA) verileri incelendiğinde titanyum dioksit nanopartiküllerin 25-230°C de kütle kaybının nemden kaynaklı olduğu 230-790°C'de meydana gelen kütle kaybına ise çörek otu bitkisi özütünden gelen fitokimyasalların sebep olduğu söylenebilir. Yapılan bir çalışmada PbO nanoparçacıklarının bozunma sıcaklıkları 50-800°C olduğu TGA verileri rapor edilmiştir (Yousefi ve ark. 2014; Baran ve ark. 2018; Baran ve Düz 201). Sonuç olarak çalışmada kullanılan çörek otu bitki özütü ile sentezlenen titanyum dioksit nanopartiküllerin 800 °C'ye kadar dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. TiO_2NP 'lerin TGA-DTA analiz sonucu.

Son yıllarda mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı bu organizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur. Bu durum ticari olarak kullanılan ilaçların etkisinin çok zayıf kalmasına sebep olmaktadır. Bu problemin giderilmesinde

alternatif antimikrobiyal ajanların aranması noktasında çevre dostu bir sentez ile elde edilen titanyum, gümüş, altın ve çinko nanopartikülleri anahtar rol oynayabilir. Bitki özütlerinden elde edilen nanopartiküllerin etkili antimikrobiyal özelliklerinin olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur (Acay ve ark. 2019; Baran ve ark. 2019; Eren, ve Baran 2019). Çalışmada bu bilgiler doğrultusunda biyolojik atık materyalle sentezlenen TiO₂NP'lerin alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak kullanımı değerlendirildi. (Tablo 1.) Elde edilen sonuçlar TiO₂NP'lerin standart olarak kullanılan antibiyotiklerden daha etkili olduğunu göstermiştir.

Tablo 1. Sentezlenmiş titanyum oksit nanopartiküllerin (TiO₂NP'ler) (mg mL⁻¹), titanyum klorid çözeltisi ve vankomisin, flukonazol, colistin antibiyotiklerinin *S.aures*, *S. Albicans* ve *E. coli* mikroorganizmaları üzerindeki MİK değerlerinin karşılaştırılması.

Organizma	TiO ₂ NP's (mg mL ⁻¹)	Titanyum (III) klorid (mg mL ⁻¹)	Antibiyotik (mg mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.34	0.5	1
<i>C. albicans</i>	0.17	1.0	2
<i>E. coli</i> ATCC25922	0.68	1.0	2

5. SONUÇ

Çalışmada biyolojik materyal olarak çörek otu bitkisinin atıl durumdaki yeşil yaprakları kullanılarak sentezlenen titanyum dioksit nanopartikülleri kullanıldı. Bu çalışmanın diğer yöntemlerden üstünlüğü atık durumdaki bitki materyalinin TiO₂ nanopartiküllerinin büyük ölçekli sentezi için çevre dostu, ucuz ve herhangi bir toksik madde içermemesidir. Ek olarak yeşil yolla sentezlenen TiO₂NP'leri hem kararlı hem de dayanıklı olması yöntemin önemli bir diğer avantajıdır. Bu özellikleri sebebiyle çörek otu yaprakları özütleri ile elde edilen titanyum nanopartiküllerinin ilaç sanayisi ve diğer pek çok endüstriyel alanlarda alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilceğini düşünüyoruz.

6.KAYNAKÇA

- Acay, A., M.F. Baran, ve A., Eren. 2019. "Investigating Antimicrobial Activity Of Silver Nanoparticles Produced Through Green Synthesis Using Leaf Extract Of Common Grape (*Vitis Vinifera*), Applied Ecology And Environmental Research , 17(2): 4539–46.
- Ansari, Mahalakshmi, ve Gino A. Kurian. 2017. "Differential effect of aqueous *Desmodium gangeticum* root extract mediated TiO₂nanoparticles on isolated mitochondria, cells and Wistar rats". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(11): 1031–35. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.020>.
- Baran, M.F., Koç, A., ve Uzan, S. "Kenger (*Gundelia Tournefortii*) Yaprığı İle Gümüş Nanopartikül(Agnp) Sentezi, Karakterizasyonu Ve Antimikrobiyal Uygulamaları". *EJONS International Journal on Mathematic, Engineering and Natural Sciences*. 2(2018).
- Baran., M.F. 2019. "Alıç Bitkisinin Yaprak Özütü Kullanılarak AgNP'erin Yeşil Sentezi ve Anti-Mikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi" *Fen Bilimleri Ve Matematik Alanında Araştırma Ve Değerlendirmeler,Gece akademi gece kitap evi*. (mart 2019): 110–120.
- Baran., M.F. 2019. Synthesis, Characterization And Investigation Of Antimicrobial Activity Of Silver Nanoparticles From *Cydonia Oblonga* Leaf, *Applied Ecology And Environmental Research* 17(2):2583-2592.
- Baran, Mehmet Fırat. 2019. "Prunus avium kiraz yaprağı özütü ile gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesi". *Dicle üniversitesi mühendislik dergisi*, mart 2019, 1: 221–27.
- Baran M.F. ve Acay H."kiraz yaprak özütü kullanılarak altın nanopartikül sentezi. *EJONS International Journal on Mathematic, Engineering and Natural Sciences*. (2019).
- Baran, M. F., Duz, M. Z., Uzan, S., Dolak, İ., Celik, K. S., Kilinc, E. (2018): Removal of Hg(II) from aqueous solution by *bacillus subtilis* ATCO (B1). – *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 8(4): 1–7.

- Baran, M. F., Duz., (2019) Removal of cadmium (II) in the aqueous solutions by biosorption of *Bacillus licheniformis* isolated from soil in the area of Tigris River, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, DOI:10.1080/03067319.2019.1669583.
- Doğaroğlu, Zeynep Görkem., Abdullah Eren, ve Mehmet Fırat Baran. 2019. “Effects of ZnO Nanoparticles and Ethylenediamine- N , N ' - Disuccinic Acid on Seed Germination of Four Different Plants”. Global Challenges. 3(9):1800111: 1–5.
- Eren., A, Baran M. F. 'Fıstık (*Pistacia vera* L.) Yaprağından Gümüş Nanopartikül (AgNP)'lerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi' Siirt üni. Türkiye tarımsal araştırmalar dergisi. Turk J Agric Res 2019, 6(2): 165-173.
- Eren., A, Baran M. F. 'Green Synthesis, Characterization And Antimicrobial Activity Of Silver Nanoparticles (AgNps) From Maize (*Zea Mays* L.)', Applied Ecology And Environmental Research , 17(2):4097-4105.
- Goutam, Surya Pratap, Saxena, Gaurav Singh, Varunika Yadav, Anil Kumar Bharagava, Ram Naresh Thapa, Khem B. Green synthesis of TiO₂nanoparticles using leaf extract of *Jatropha curcas* L. for photocatalytic degradation of tannery wastewater. Chemical Engineering Journal.
- Li, Songtao., Li, Gen., Chen, Qiang., Wang, Feng.' Facile green synthesis of Degraded-PVA coated TiO₂ nanoparticles with enhanced photocatalytic activity under visible light. Journal of Physics and Chemistry of Solids. volume 129. 92-98(2019).
- Mulmi, Deependra Das vd. 2018. “Optical and photocatalytic properties of lysozyme mediated titanium dioxide nanoparticles”. *Optik* 154: 769–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.10.120>.
- Nasrollahzadeh, Mahmoud, ve S. Mohammad Sajadi. 2015. “Synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia heteradena* Jaub root extract and evaluation of their stability”. *Ceramics International* 41(10): 14435–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.07.079>.
- Rolim, Wallace R. vd. 2019. “Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity”. *Applied Surface Science* 463(August 2018): 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>.
- Santhoshkumar, Thirunavukkarasu vd. 2014. “Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties”. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(12): 968–76. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60171-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60171-1).
- Srinivasan, Malar vd. 2019. “Green synthesis and characterization of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) using *Sesbania grandiflora* and evaluation of toxicity in zebrafish embryos”. *Process Biochemistry* (February): 2–7.
- Zhang, Yushu vd. 2018. “Biologically synthesized titanium oxide nanostructures combined with morphogenetic protein as wound healing agent in the femoral fracture after surgery”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 182(27): 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.005>.