

Araştırma Makalesi / Research Article

Kekik (*Thymus Vulgaris L.*) Özütü Kullanarak Biyosentezlenmiş Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Etkisinin AraştırılmasıCansu GÜNEŞ^{1*}, Ahmet AVCI²¹İzmir Meslek Yüksekokulu, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye²Mekatronik Mühendisliği, KTO Karatay Üniversitesi, Konya, TürkiyeSorumlu yazar ¹e-posta: cansu.gunes@deu.edu.trORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8870-0962>²e-posta: ahmet.avci@karatay.edu.trORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1946-6260>

Geliş Tarihi: 29 Nisan 2023 ; Kabul Tarihi: 13 Kasım 2023

Öz

Nano boyutlu metaller, bakterilere karşı direnç oluşturma noktasında etkili birer antibakteriyel ajan olarak bilinir. Bu ajanlar özellikle insanlık için ciddi bir tehdit oluşturan ilaca dirençli bakterilerle mücadele etmek için doğal kökenli alternatifler oluşturmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) iyi derecede antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. AgNP'lerin biyosentezi diğer nanopartikül üretim yöntemlerine kıyasla daha güvenli, düşük maliyetli ve çevre dostu bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, biyosentez yöntemi kullanılarak *Thymus Vulgaris L.* sulu özütüyle enkapsüle olmuş gümüş nanopartikül (eAgNP) üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. AgNP'lere kekik bitkisinin antiseptik, antimikrobiyal ve antioksidatif özelliklerinin kazandırılması amaçlanmıştır. eAgNP üretimini sağlayacak optimum bitki özütü ve AgNO₃ konsantrasyonu UV-vis spektrofotometre analizi ile belirlenerek bulunan oranlar doğrultusunda yeşil sentez gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen eAgNP'ler UV-Vis spektral analizi, FT-IR, XRD analizi ve TEM görüntü analizi ile karakterize edilmiştir. eAgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesi *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri kullanılarak disk difüzyon metodu ile araştırılmıştır. TEM analizi ile biyosentezlenmiş eAgNP'lerin bitki özütü ile enkapsülasyonunun gerçekleştiği ve 6-70 nm boyut aralığında küresel bir şekle sahip olduğu bulunmuştur. eAgNP'leri çevreleyen bitki kaynaklı fitokimyasalların varlığı FT-IR ile, AgNP oluşumu ise XRD analizi ile kanıtlanmıştır. 5 mg/mL'lik bir konsantrasyonda disklere emdirilen eAgNP'ler, *E. coli* ve *S.aureus* bakterilerine karşı sırasıyla 20.5 mm ve 23.2 mm ortalama inhibisyon çapları ile antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sonuçlar, oldukça güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip, çevre dostu eAgNP'lerin *Thymus Vulgaris L.* özütü kullanılarak hazırlanabileceğini ve biyomalzeme alanında önemli bir potansiyel oluşturabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler

Antibakteriyel aktivite;
Biyosentez;
Enkapsülasyon; Gümüş nanopartikül; *Thymus vulgaris l.*

Investigation of Antibacterial Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Thyme (*Thymus Vulgaris L.*) Extract**Abstract**

Nano-sized metals are known as effective antibacterial agents at the point of creating resistance against bacteria. These agents are alternatives of natural origin to struggle drug-resistant bacteria, which pose a serious threat to humanity. Silver nanoparticles (AgNPs) have been proven to have good antimicrobial activity. Biosynthesis of AgNPs is accepted as a safer, lower cost, and more environmentally friendly method compared to other nanoparticle production methods. In this study, silver nanoparticles (eAgNPs) encapsulated with *Thymus Vulgaris L.* aqueous extract were successfully produced using the biosynthesis method. It is aimed to bring in the antiseptic, antimicrobial, and antioxidative properties of the thyme plant to AgNPs. The optimum plant extract and AgNO₃ concentration that is required for eAgNP production were determined by UV-vis spectrophotometer analysis and green synthesis was carried out in line with the ratios found. The synthesized eAgNPs were characterized by UV-Vis spectral analysis, FT-IR, XRD analysis, and TEM analysis. The antimicrobial activity of eAgNPs was investigated using a disc diffusion method against *E. coli* and *S. aureus*. It has been confirmed that the encapsulation of biosynthesized eAgNPs with the plant extract was successfully carried out by TEM analysis and spherical-shaped biosynthesized nanoparticles had a size range of 6-70 nm. The presence of plant-

Keywords

Antibacterial activity;
Biosynthesis;
Encapsulation; Silver nanoparticles; *Thymus vulgaris l.*

derived phytochemicals surrounding eAgNPs was confirmed by FT-IR and the formation of AgNP was analyzed by XRD spectrum. Biosynthesized eAgNPs adsorbed into discs at a concentration of 5 mg/mL showed antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* with mean inhibition diameters of 20.5 mm and 23.2 mm, respectively. The results introduced that eco-friendly eAgNPs with strong antimicrobial activity can be prepared using *Thymus Vulgaris L.* plant extract and may create a significant potential in the field of biomaterials.

1. Giriş

Nano boyutlardaki (1-1000 nm) malzemelerin, onlara aynı dökme malzemelerden farklı alışılmışın dışında özellikler kazandıran yüzey/hacim oranlarının yüksek olması nedeniyle tıbbi, farmasötik, imalat ve malzeme, çevre, elektronik, gibi çeşitli uygulamalarda kullanımı oldukça yaygındır (Castillo-Henríquez vd. 2020).

Nanopartiküller ise 1–100 nm veya daha küçük boyutta çap uzunluğuna sahip nanomalzemelerdir. Gümüş nanopartiküller, antioksidan, antibakteriyel, antikanser, antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antifungal gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle metalik nanopartiküller arasında daha fazla araştırılmıştır. Çeşitli soy metaller arasında gümüş diğer metallerle kıyaslandığında, antibakteriyel katalitik özellikleri ve insan vücuduna toksik olmaması sebepleriyle nanopartikül olarak tıp alanında sıklıkla tercih edilmektedir (Roy vd. 2017). AgNP'lerin hazırlanması için fiziksel, kimyasal veya biyolojik olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. AgNP'lerin biyolojik yöntemlerle sentezlenmesi, işlem kolaylığı, toksik kimyasal kullanımı gerektirmemesi, daha az enerji gereksinimi duyulması, çevre dostu ve düşük maliyetli olması sebepleriyle fiziksel ve kimyasal yöntemlere üstünlük sağlar (Zhang vd. 2020). Bu biyolojik yöntem, bakteri, mantar, alg ve bitki özleri gibi canlı bir sistemin nanopartikül sentezi için metallerin indirgenmesinden sorumlu olduğu 'yeşil sentez' olarak bilinir (Patel vd. 2023).

Bu çalışma Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Thymus Vulgaris L.* (yaygın olarak kekik olarak bilinir) ekstraktını kullanarak enkapsüle olmuş gümüş nanopartikül üretimini amaçlamaktadır. Aromatik bir bitki olan *Thymus vulgaris L.*, Antiseptik, karminatif, antimikrobiyal ve antioksidatif özellikleri ile bilinir. Kekik bitkisi özellikle etkin antibakteriyel ve antioksidan

özelliklerinden dolayı yara iyileşme potansiyelini artırması nedeniyle (Pandiyan vd. 2022) bu çalışmada eAgNP sentezlenmesi için seçilmiştir. Kekik özütünde bulunan flavenoidler ve terpenoidler gibi kimyasallar gümüş tuzlarını gümüş nanopartiküllere indirgemekten sorumlu olan doğal indirgeyici ajan gibi davranır (De Melo vd. 2020). Kekik ekstraktının bir bileşeni olan timol, terpenoid grubuna ait bir fitokimyasaldır ve Ag⁰ indirgenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, eAgNP üretimini sağlayacak optimum bitki özütü, gümüş nitrat konsantrasyon değerleri bulunarak biyosentez ile enkapsüle olmuş gümüş nanopartikül üretimi amaçlanmıştır. Üretimi tamamlanan eAgNP'lerin karakterizasyonu için UV-Vis spektrofotometre analizi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi, X Işını Kırınımı (XRD) analizi ve Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile morfolojik ve boyut analiz gerçekleştirilmiştir. eAgNP'lerin antibakteriyel etkisi disk difüzyon metodu kullanılarak gram pozitif ve gram negatif bakterilerine karşı analiz edilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyal

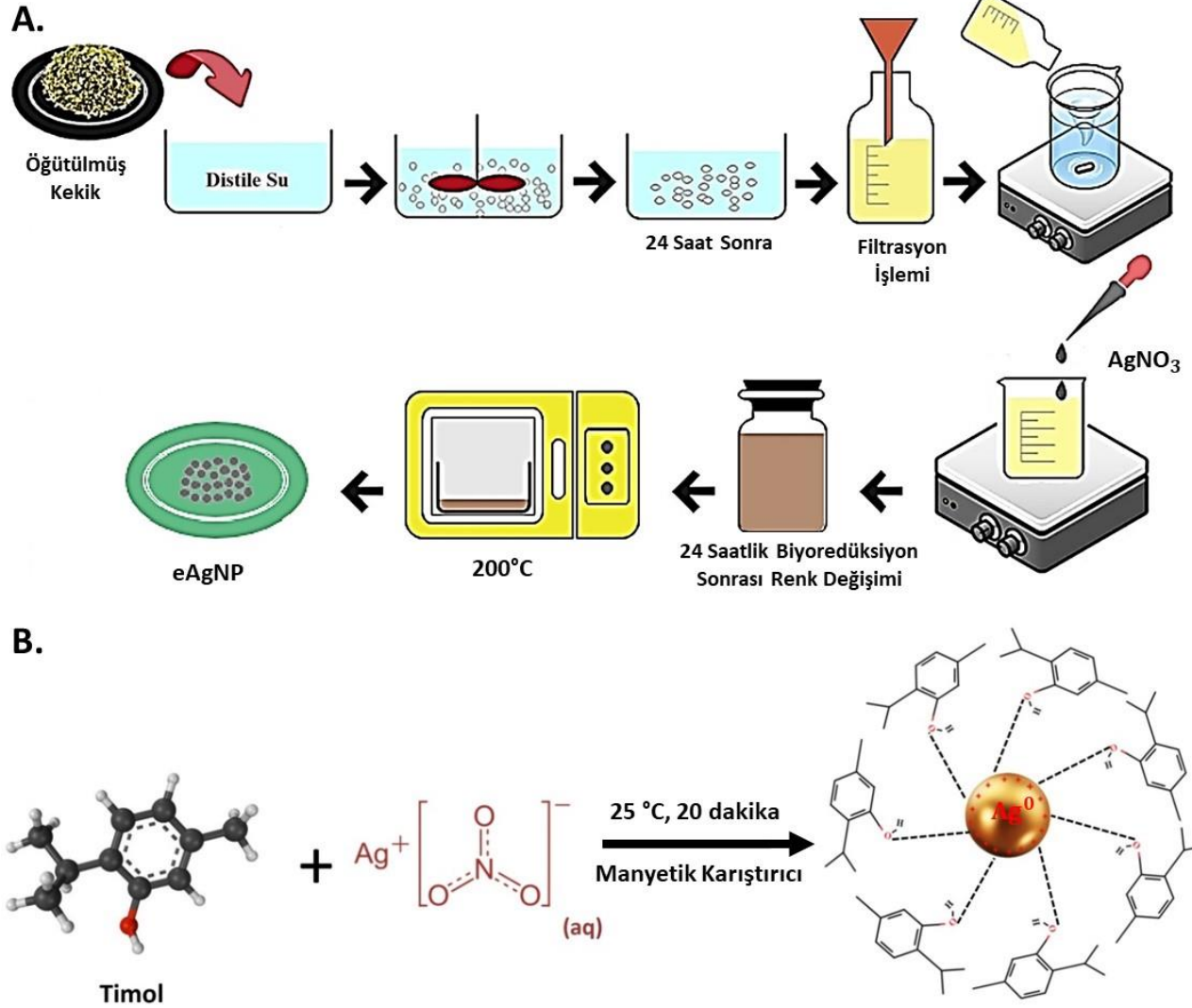
eAgNP sentezi için kullanılan AgNO₃ (169.87 g mol⁻¹) Nanokar Nanotechnology firmasından, 150 gram kurutulmuş kekik ise Dağcıoğlu Specierly firmasından satın alınmıştır. Çalışma kapsamında etüv (Binder, VD 23) ve UV-vis spektrofotometre (HITACHI, U-3900) kullanılmıştır. Antibakteriyel test için *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC 25922, Gram negatif), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 29213, Gram pozitif) bakterileri Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden temin edilmiştir.

2.2 Yöntem

Kekik özütü hazırlamak için 20 g bitki dal ve yapraklarından oluşan kuru kekik distile su ile

yıkılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Büyük parçalar halindeki kekik, küçük parçalara ayrılmak üzere öğütülerek toz haline getirildi. Bu toz haline getirilmiş kekik, 1000 ml distile suya eklenerek bitkideki fitokimyasalları aktive etmek için 24 saat bekletildi. Bu süre sonunda filtre kâğıdı yardımıyla süzülerek kekik ekstraktı elde edildi. Ortaya çıkan

süzüntü, biyosentez için kullanılmak üzere düşük sıcaklıkta saklandı. Diğer bir yandan, 0.01 M AgNO_3 solüsyonu elde etmek için 250 ml deiyonize suya 0.422 g AgNO_3 ilave edilerek homojen bir kıvama gelene kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı.



Bu çalışmada yeşil sentez için nanopartikül oluşumunu sağlayacak gerekli oranın bulunması amacıyla AgNO_3 konsantrasyonu ve bitki özütü konsantrasyonu parametreleri oda koşulları altında optimize edilmiştir. Kekik ile enkapsüle olmuş AgNP sentezi için en uygun bitki özütü ve AgNO_3 oranını bulmak amacıyla Tablo 1'de verilen farklı konsantrasyonlarda bitki özütü ve AgNO_3 solüsyonları hazırlandı. UV-Vis spektrofotometre

kullanılarak her bir solüsyonun dalga boyu-absorbans değerleri 300-800 nm aralığında ölçüldü. Her bir çözelti için elde edilen absorbans-dalga boyu eğrilerinde gümüşün açığa çıktığı dalga boyu üzerindeki absorbans değerleri kıyaslanarak nanopartikül üretimini sağlayacak optimum bitki özütü ve AgNO_3 oranı belirlendi.

Çizelge 1. Konsantrasyon optimizasyonu için hazırlanan çözelti oranları

No.	Çözelti oranları
S1	5 ml özüt/1 ml AgNO ₃ /4 ml saf su
S2	5 ml özüt/2 ml AgNO ₃ /3 ml saf su
S3	5 ml özüt/3 ml AgNO ₃ / 2 ml saf su
S4	5 ml özüt /4 ml AgNO ₃ /1 ml saf su
S5	5 ml özüt/5 ml AgNO ₃
S6	1 ml özüt/5 ml AgNO ₃ /4 ml saf su
S7	2 ml özüt/5 ml AgNO ₃ /3 ml saf su
S8	3 ml özüt /5 ml AgNO ₃ /2 ml saf su
S9	4 ml özüt /5 ml AgNO ₃ /1 ml saf su

UV-vis spektrofotometre analizi ile bulunan oranlar doğrultusunda Şekil 1.A'da verilen süreçler takip edilerek eAgNP sentezi gerçekleştirildi. İlk olarak, 4 ml distile su ve 1 ml kekik özütünden oluşan karışım manyetik karıştırıcıda karıştırılırken 5 ml AgNO₃ çözeltisi pastör pipet yardımı ile damlacıklar halinde eklendi. Karışım çözeltisi, 10 dk. boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra gümüş nitratin fotoaktivasyonunu önlemek için alüminyum folyo ile sarılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve reaksiyon sonunda çözelti renginin sarımsı renkten kırmızımsı kahverengi rengine dönüştüğü gözlemlendi. Bu karışım çözeltisi cam petri kaplarına dökülerek 200 °C etüvde su buharlaştırıldı. Petri kabının yüzeyinde biriken çözeltiden kalan katılar bir cam lamel kullanılarak kazındı. Buharlaştırma prosedürünün sonunda kekik özütü ile enkapsüle olmuş gümüş nanopartiküller elde edildi. Bu deneysel süreç sonunda sentezlenen eAgNP'lerin Şekil 1.B'deki konfigürasyonda gösterildiği gibi kekik bitkiinde indirgeyici ve stabilize edici rol oynayan timol bileşeninin gümüş molekülünün etrafını çevreleyerek gümüşün etrafında enkapsülasyonu gerçekleştirdiği varsayılmaktadır (Güneş Çimen vd. 2022).

Nanopartiküllerin boyut ve şeklini belirlemek için TEM (JEOL 2100) analizi 70 kV voltaj altında uygulandı. Sentezlenen eAgNP'lerin kristalografik yapısı, 45 kV gerilimde ve 40 mA akımda Cu-K_α ışını ile yapılan XRD (PANalytical EMPYREAN) analizi kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçüm esnasında tarama hızı 1° dakika⁻¹, tarama aralığı 5°-80° ve adım boyutu 0.05° olarak ayarlandı. XRD

modelindeki enstrümantal katkıları ortadan kaldırmak için standart bir Lab6 örneği kullanıldı. eAgNP'lerin fonksiyonel gruplarının tespiti için 600–4000 cm⁻¹ aralığında FT-IR (Thermo Scientific–Nicolet iS20) analizi yapıldı.

Sentezlenen eAgNP'lerin antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon yöntemi ile *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı test edildi. Test numunesi olarak, ultrasonik karıştırıcı yardımıyla homojenize edilen 5 mg mL⁻¹ eAgNP/distile su karışımınının 12 mm çapında kesilmiş filtre kâğıtlarına emdirilmesiyle elde edilen diskler kullanıldı.

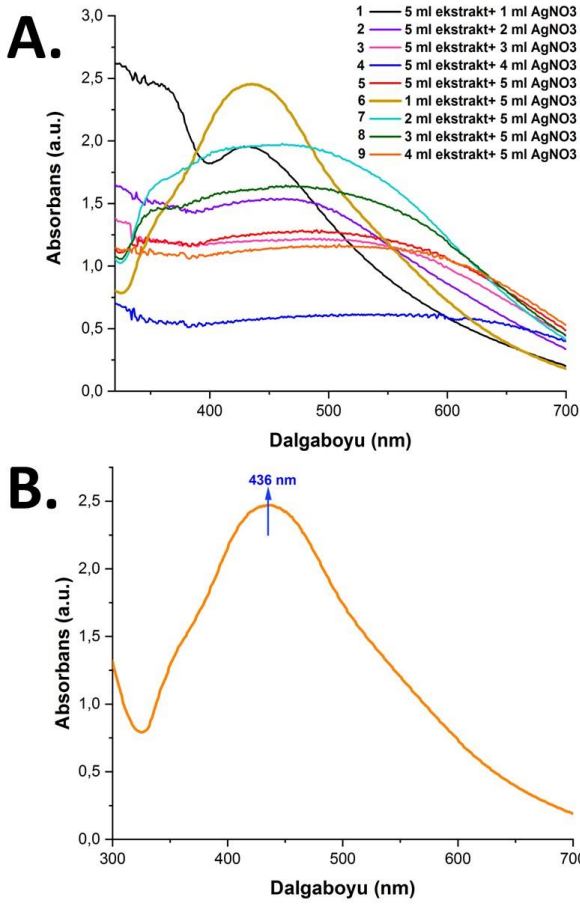
Bakteriler petri kaplarına ekilmeden önce Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerleri hazır hale getirilerek bakteri kültür ortamı tamamlandı. Bakteri koloni konsantrasyonu, ekilecek bakteri yoğunluğunun hücre dansitometresi ile ölçülmesiyle 0.5 McFarland standartlarına uygun seviyeye getirildi. Standarda uygun ayarlanan bakteri süspansiyonları, bir drigalski spatula yardımı ile Muller Hinton agar plakalarına yayıldı. Bakteri ekiminin yapıldığı bu petri kapların yüzeylerine 12 mm çapındaki eAgNP diskleri her iki bakteri türü için de yerleştirildi. Daha sonra bakteri kültürleri 37°C'de 48 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonucunda disk çevresinde meydana gelen inhibisyon halkası çapları Image J arayüzü vasıtası ile belirlendi.

3. Bulgular

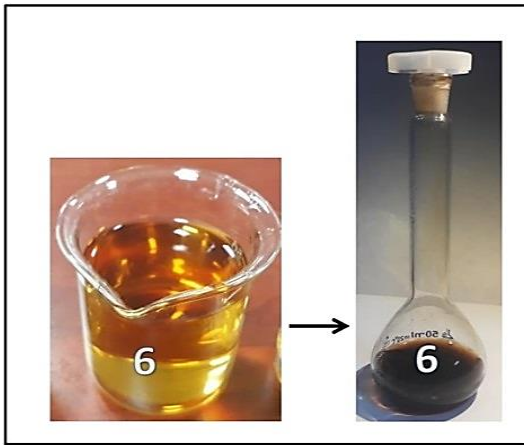
3.1 UV-vis Spektroskopi ile Bitki Özütü ve AgNO₃ Çözelti Konsantrasyonu Optimizasyonu

UV-vis spektroskopi ile dalgaboyu-absorbans ölçümü yapılmak için hazırlanan 9 farklı solüsyon içerisinde 24 saatlik reaksiyon sonrası renk değişimi açık sarı renginden kırmızımsı kahverengiye en belirgin şekilde 6. çözeltide gözlemlendi (Şekil 3).

UV-vis spektrofotometrede 300-700 nm dalga boyu aralığında taranan her bir solüsyona ait absorbans değerleri Şekil 2.A'da verilmiştir. Her bir solüsyona ait spektrum eğrileri karşılaştırıldığında 2.47 absorbans değeri ile gümüş nanopartiküllerin varlığına atfedilen 440-450 nm aralığında 436 nm'de (Şekil 2.B) güçlü ve tek bir tepe noktası oluşumunun '5 ml AgNO₃/1 ml kekik ekstraktı/4 ml distile su' çözeltisinde ortaya çıktığı görülmüştür.



Şekil 2. A. Kekik özütü/ AgNO₃ oranına bağlı Dalga boyu-Absorbans spektrumları B. AgNP oluşumu gösteren çözeltinin Dalga boyu- Absorbans spektrumu

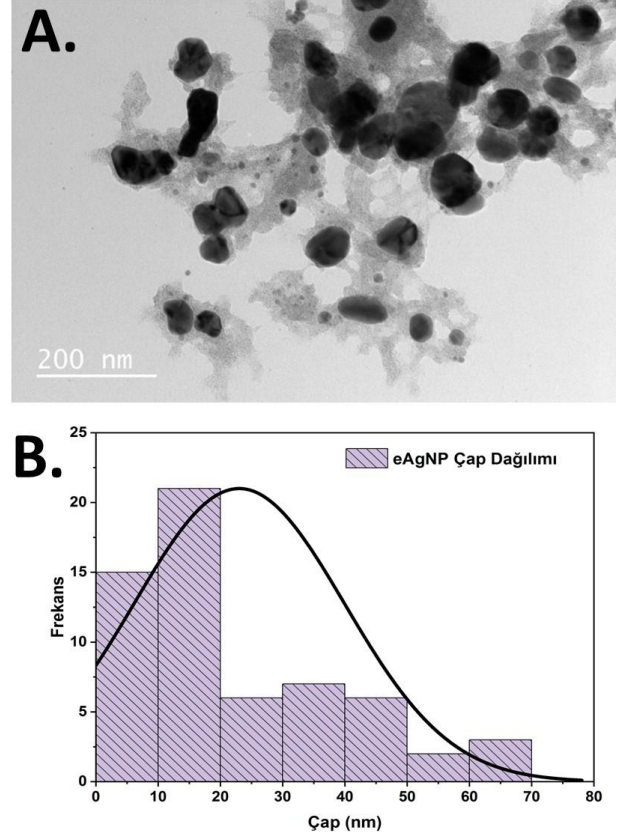


Şekil 3. 24 saat reaksiyon sonrası kekik ekstraktı/AgNO₃ çözeltisinde gözlenen renk değişimi

3.2 TEM Görüntü Analizi

TEM görüntü analizi sonucu elde edilen bulgulara göre eAgNP'lerin morfolojisinin aglomereye uğramış yapılar ihmal edildiğinde çoğunlukla küresel olduğu görülmektedir (Şekil 4.A). TEM

görüntüleri üzerinden seçilen 65 adet nanopartikül değerlendirilerek Image J yazılımı ile hesaplanan çap ölçümü sonuçlarına göre nanopartikül çaplarının yaklaşık 6-70 nm aralığında değişim gösterdiği ve ortalama çaplarının 23 nm olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.B).



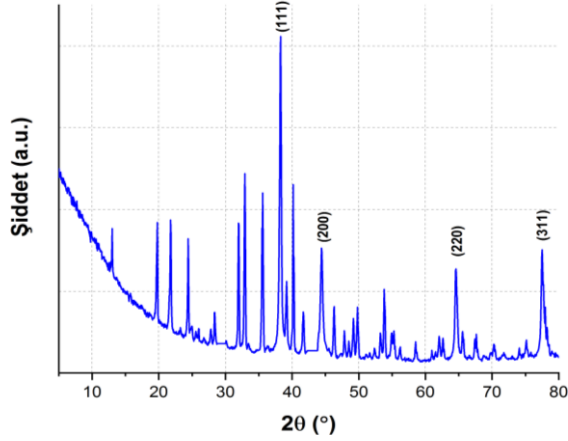
Şekil 4. eAgNP'lerin A. TEM görüntüsü B. boyut dağılım histogram grafiği

3.3 XRD Analizi

Şekil 4, sentezlenmiş eAgNP'lerin XRD desenini göstermektedir. $2\theta=5-80^\circ$ aralığında 38.27° , 44.4° , 64.53° ve 77.45° lerinde tepe noktaları oluşumu gözlemlendi, bu da metalik AgNP'lerin yüzey merkezli kübik (ymk) yapısından kaynaklanan (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerine denk gelmekte olup eAgNP'lerin bu kristal yapıya sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gauss fonksiyonu kullanılarak XRD deseni fit edilmiş ve böylece tepe noktalarının pozisyonu ve maksimum yarı tam genişlik (MYTG) değerleri elde edilmiştir (Polat vd. 2020). XRD spektrumunda eAgNP'lerin kristal boyutu aşağıda verilen Debye-Scherrer denkleminde göre ortalama 27.4 nm olarak hesaplanmıştır (Thakur vd. 2019):

$$B = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

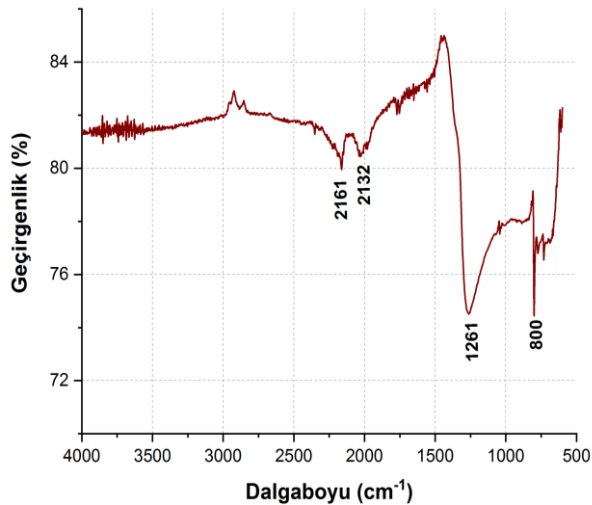
Burada, B ortalama kristal boyutunu, λ X-ışını dalga boyunu, β MYTG değerini ve θ tepe noktasının XRD kırınım açısını ifade etmektedir.



Şekil 5. eAgNP'lerin XRD grafiği

3.4 FT-IR Analizi

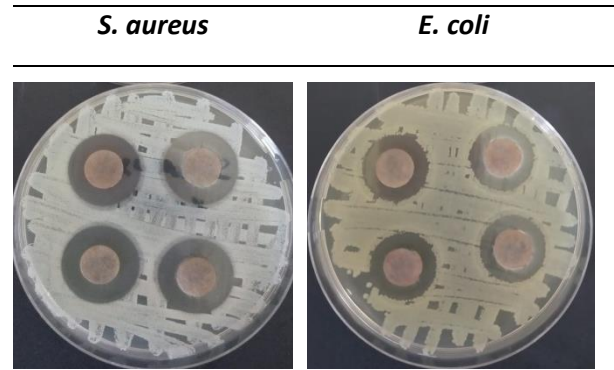
eAgNP'lerin FT-IR spektrumları Şekil 6'da verildiği gibi 600-4000 cm^{-1} aralığında elde edilmiştir. eAgNP'lerin FTIR spektrumu, 1261 cm^{-1} tepe noktasında O-H deformasyonunu ve C-O gerilme titreşimini (Agnieszka Nowak vd. 2013), 2132 cm^{-1} tepe noktasında CH alkin gruplarının gerilme titreşimini, 2161 cm^{-1} tepe noktasında alifatik grupların NEC gerilme titreşimini, 800 cm^{-1} tepe noktasında ise viniliden gruplarının CH_2 düzlem dışı deformasyon titreşimini tanımlamaktadır (Gholami vd. 2018; Manukumar vd. 2020).



Şekil 6. eAgNP'lerin FT-IR spektrumu

3.5 Antibakteriyel Aktivite Testi

E. coli ve *S. Aureus* bakteri suşlarına karşı 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası antibakteriyel etkinliği test edilen eAgNP emdirilmiş disklerin oluşturduğu inhibisyon halkası çapları Şekil 7'deki gibi oluşum göstermiştir. Ortalama inhibisyon halkası çapının Image J yazılımı kullanılarak hesaplanması sonucunda, eAgNP'nin *S. aureus* bakterisine karşı ortalama inhibisyon halkası çapı 23.2 mm olmuştur. *E. coli* bakterisine karşı ortalama 20.5 mm çapında bir inhibisyon halkası oluşturmuştur. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon halkaları çapları dikkate alındığında *S. aureus* bakterisinde inhibisyon halkasının çapı 22.2 ile 24.5 mm arasında değişirken, *E. coli*'ye karşı meydana gelen inhibisyon halkasının çapı ise 19.2 ile 21.6 mm arasında değişmektedir.



Şekil 7. *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı eAgNP emdirilmiş disklerin gösterdiği antibakteriyel aktivite (Güneş Çimen vd. 2022)

4. Tartışma ve Sonuç

Gümüş iyonlarının eAgNP'ye biyosentez yolu ile indirgenmesi, kekik özütünün AgNO_3 sulu çözeltisine eklenmesinden sonra oluşan renk değişikliği ile doğrulanmıştır. Başlangıçta açık sarı olan çözelti rengi 24 saatlik inkübasyondan sonra açık sarıdan kırmızımsı kahverengiye dönüşmüştür. Bitkisel meyve ekstraktı kullanarak AgNP sentezlenen farklı bir çalışmada da bitki ekstraktı eklendiğinde renksiz gümüş nitrat çözeltisinin renginin koyu kahverengiye dönüşmesi ile fiziksel değişim gözlenmiştir (Chakravarty vd. 2022). Dönüşen kahverengi rengi AgNP'lerin karakteristik bir özelliği olan yüzey plazmon

rezonansının (SPR) uyarılması ile açıklanmaktadır (Banerjee vd. 2014). Bunun sebebi bitki hücrelerinde bulunan ve metal iyonlarını azaltan ikincil metabolitlerin varlığıyla açıklanabilir (Manivasagan vd. 2013).

AgNP'lerin Ag⁰ nanopartiküllerine indirgenliğini tespit etmek için UV-vis spektrofotometrede her bir AgNO₃/*Thymus Vulgaris L.* sulu çözeltisi/saf su konsantrasyonuna karşılık gelen çözeltilerin absorpsiyon spektrumu kaydedilmiştir. Elde edilen absorpsiyon dalga boyu spektrumunda gümüş oluşumunu gösteren SPR tepe noktası değerinin 436 nm'de konumlandığı gözlemlenmiştir. SPR tepe noktası değerinin yaklaşık 420-450 nm olduğu biyosentez yöntemi ile AgNP sentezini konu alan birçok farklı çalışmada da ortaya koyulmuştur (Khalil vd. 2022; Manivasagan vd. 2013; Singh vd. 2018; Usmani vd. 2019).

TEM analizi sonucu elde edilen eAgNP görüntüleri incelenerek nanopartiküllerin morfolojik olarak küresel bir şekle sahip olduğu ve ortalama nanopartikül çapının 23 nm ile AgNP oluşumunu doğruladığı görülmüştür. TEM görüntülerinde gözlenen farklı şekil yapıları, eAgNP'lerin indirgenme reaksiyonu boyunca çökmesi sonucu aglomere olmasıyla açıklanabilir. Kekik özütünün eAgNP sentezi için kullanıldığı farklı bir çalışma da elde edilen nanopartikül çaplarının ortalama 24-56 nm arasında değiştiğini bildirmektedir (Rakaa vd. 2020). Benzer bir şekilde, *Vitis vinifera* ekstraktı kullanarak AgNP sentezlenen farklı bir çalışmada elde edilen TEM görüntüleriyle nanopartikül boyutlarının 30-65 nm arasında değiştiği bulunmuştur (Hashim vd. 2020). Bu çalışma, diğer çalışmalardan elde edilen bulgulara kıyasla nanopartikül boyutlarının 6-70 nm arası bir aralıkta olmak üzere gümüşün enkapsülasyonunu sağlayan yeşil sentez metodu ile oldukça küçük çaplarda eAgNP sentezlenebildiğini ortaya koymaktadır. Nanopartikül boyutlarında meydana gelen bu azalma bakteri ile etkileşimin artmasına sebep olarak enfeksiyon ihtimalini düşürmektedir (Khurana vd. 2014). Sentezlenen eAgNP'lerin iyi derecede antibakteriyel etki göstermesi gümüş ve kekik bitki ekstraktının antimikrobiyal özelliklerinin

yanı sıra, üretilen bu eAgNP çaplarının oldukça küçük boyutlarda olmasından kaynaklı olabilir.

XRD sonuçları, karakteristik gümüş tepe noktalarının $2\theta=38.27^\circ$, 44.4° , 64.53° ve 77.45° pozisyonlarında konumlanması ile AgNP oluşumunun sağlandığını ve sentezlenen eAgNP'lerin kristal yapıya sahip olduğunu açıkça göstermektedir. Yeşil sentez ile AgNP sentezlenen farklı çalışmalarda da XRD spektrumunda aynı kırınım düzlemi oluşumlarına rastlanmıştır (Asif vd. 2022; Yılmaz Öztürk vd. 2020). XRD spektrumunda dağılmış diğer tepe noktaları, eAgNP'lerin dışında meydana gelen biyolojik oluşumların varlığından kaynaklanabilir. Ayrıca, elde edilen kırınım tepelerinin bant genişliğinin fazla olması, küçük kristal boyutlarından kaynaklanabilir (Asif vd. 2022). Buna ek olarak, $2\theta=13^\circ$ ve $2\theta=19.7^\circ$ 'de oluşan majör tepe noktaları timol bileşeni ve AgNP arasındaki kompleks oluşumundan kaynaklanan tetragonal kristal yapıya atfedilmektedir (Aytac vd. 2017). Gümüş karakteristik tepe noktaları üzerinden Debye-Scherrer denkleminde göre eAgNP'lerin ortalama kristal boyutları 27.4 nm olarak hesaplanmıştır. FT-IR sonuçları 1261 cm^{-1} tepe noktasında fenol grubunda bulunan benzen halkasının, 2132 cm^{-1} tepe noktasında alkin gruplarının, 2161 cm^{-1} tepe noktasında alifatik grupların, 800 cm^{-1} tepe noktasında vinilidenlerin, 731 cm^{-1} tepe noktasında birincil aminlerin varlığını göstererek timol bileşeninin içerisindeki moleküllerin varlığını ortaya koymuştur (A. Nowak vd. 2012). *Desmodium gangeticum* ekstraktı kullanarak AgNP sentezlenen farklı bir çalışmada da bulunan tepe noktaları bitki moleküllerinden kaynaklı aromatik ve fenol gruplarının varlığına atfedilip, tüm fonksiyonel gruplar, gümüş nanopartiküllerini kaplayan bitkisel fonksiyonel protein grupları ve metabolitlerin oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Manikkannan vd. 2013).

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon halkası çapı, *Thymus Vulgaris L.* tarafından sentezlenen eAgNP'lerin agar plakaları üzerinde uygun laboratuvar koşullarında antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal mekanizması, AgNP'lerin bakteriler ile hücre duvarı arasına

bağlanması sonucu hücre zarı geçirgenliğini etkileyerek bakteri içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması, protein denatürasyonu, bakteri hücrelerinden metabolitlerin ve protonların sızması ve DNA replikasyonunun engellenmesiyle açıklanmaktadır (Alsammarraie vd. 2018; Wasilewska vd. 2023). Tüm bu etkileşimler bakteri hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. AgNP'ler ise nano boyutlarından dolayı bakteri hücreleriyle etkileşim için daha geniş bir yüzey alanına sahiptir. Sentezlenen eAgNP'lerin TEM görüntü analizinde ortalama 23 nm çapa sahip olması ve patojenlere karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite göstermesi boyutları özellikle 50 nm'den küçük olan nanopartiküllerin hücre duvarına tutunmasının ve hücre duvarını parçalamasının daha kolay olmasıyla ilişkilendirilebilir (Balciunaitiene vd. 2021). Ayrıca, eAgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin gram pozitif bakterisi *S. aureus* ile karşılaştırıldığında gram negatif bakterisi *E. coli*'ye göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bu durum kekik moleküllerinin *S. aureus*'un zarında fosfat iyonlarının sızmasına neden olması ile açıklanabilir (Boskovic vd. 2015). Elde edilen bulgular, daha önce farklı bitki özleri tarafından sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal özelliklerini konu alan diğer benzer çalışmalarla uyumludur. *Thymus kotschyanus* ekstraktı ile indirgenen AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, *S. aureus* bakterisi için 10.3 mm inhibisyon halkası çapı gözlenirken, *E. coli* bakterisi için 7.3 mm inhibisyon halkası çapı gözlenmiştir (Gholami vd. 2018). AgNP'lerin kekik ekstraktı ile sentezlendiği başka bir çalışmada, *S. aureus* bakterisinin *E. coli*'ye kıyasla daha fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (RakaaObaid 2020). Bu çalışmada sentezlenen ortalama 23 nm çaplarında eAgNP'lerin de *S.aureus* ve *E.coli* bakterilerine karşı önemli ölçüde gösterdiği antibakteriyel etki, sentezlenen eAgNP'lerin antibakteriyel ajan olarak biyomedikal uygulamalarda kullanımının önünü açma potansiyeline sahiptir.

Özetle, ortalama 23 nm çapa sahip olduğu görülen eAgNP'ler, *Thymus Vulgaris L.* sulu özütü kullanılarak biyoredüksiyon yöntemi ile UV-vis spektrofotometrede yapılan optimizasyon ölçümleri neticesinde gözlemlenen renk değişimine

bağlı optimum konsantrasyon oranları kullanılarak üretilmiştir. Gümüş nitratin eAgNP'ye indirgenmesi UV-vis spektrofotometrede 436 nm dalga boyunda gözlemlenen tepe noktası ile, FTIR analizinde timol bileşenine ait fenol ve alifatik grupların ve benzen halkasının varlığı ile, XRD tekniğinde gözlemlenen gümüş 111, 200, 220, 311 kırınım düzlemlerinin varlığı ile doğrulanmıştır. Sentezlenen eAgNP'lerin önemli insan patojenlerine (*E. coli*, *S. aureus*) karşı sırasıyla gösterdiği 20.5 nm, 23.2 nm inhibisyon çapı ile oldukça güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Nanoteknolojik araştırmaların artması ile sentezlenen eAgNP'ler fonksiyonel biyomedikal ve endüstriyel ürünlerin geliştirilmesinde kullanım potansiyeline sahiptir. Gelecek çalışmalarda atık suların dezenfekte edilmesi, zararlı atık boyaların absorpsiyonu, filtrasyonu için membran uygulamalarında kullanılması gibi ekolojik çalışmaların yanı sıra, biyomedikal alanda diyabetik yaralarda iyileşmeyi hızlandıracak yara örtülerinde antibakteriyel ajan olarak, ilaç salım sistemlerinde nano boyutlarından dolayı hedeflenebilirliği artırarak taşıyıcı matris olarak, anti-kanser ajan olarak, biyolojik implantlarda antibakteriyel kaplama malzemesi olarak ve gümüşün antifungal özelliğinden dolayı mantar önleyici ilaç fabrikasyonunda kullanım potansiyeli araştırılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından Yüksek Lisans Tez Projesi olarak desteklenen projenin bulgularının bir kısmını içermektedir (Proje No: 211319018).

5. Kaynaklar

- Al-Radadi, N. S. (2022). Laboratory scale medicinal plants mediated green synthesis of biocompatible nanomaterials and their versatile biomedical applications. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **29(5)**, 3848-3870
- Alao, I. I., Oyekunle, I. P., Iwuozor, K. O., & Emenike, E. C. (2022). Green synthesis of copper nanoparticles and investigation of its anti-microbial properties. *Advanced Journal of Chemistry-Section B*, **4(1)**, 39-52.
- Alsammarraie, F. K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A. ve Lin, M. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and

- investigation of their antibacterial activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **171**, 398-405.
- Asif, M., Yasmin, R., Asif, R., Ambreen, A., Mustafa, M. ve Umbreen, S. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial Potential. *Dose Response*, **20(2)**, 15593258221088709.
- Aytac, Z., Ipek, S., Durgun, E., Tekinay, T. ve Uyar, T. J. F. c. (2017). Antibacterial electrospun zein nanofibrous web encapsulating thymol/cyclodextrin-inclusion complex for food packaging. *Food chemistry*, **233**, 117-124.
- Balciunaitiene, A., Viskelis, P., Viskelis, J., Streimikyte, P., Liaudanskas, M., Bartkiene, E., . . . Lele, V. (2021). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of *Artemisia absinthium L.*, *Humulus lupulus L.* and *Thymus vulgaris L.*, Physico-Chemical Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Activity. *Processes*, **9(8)**, 1304.
- Banerjee, P., Satapathy, M., Mukhopahayay, A., Das, P. J. B. ve Bioprocessing. (2014). Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, **1**, 1-10.
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M. ve Baltic, M. Z. J. P. F. S. (2015). Antimicrobial activity of thyme (*Tymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*, **5**, 18-21.
- Castillo-Henríquez, L., Alfaro-Aguilar, K., Ugalde-Álvarez, J., Vega-Fernández, L., Montes de Oca-Vásquez, G. ve Vega-Baudrit, J. R. J. N. (2020). Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. *Nanomaterials*, **10(9)**, 1763.
- Chakravarty, A., Ahmad, I., Singh, P., Ud Din Sheikh, M., Aalam, G., Sagadevan, S. ve Ikram, S. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using fruits extracts of *Syzygium cumini* and their bioactivity. *Chemical Physics Letters*, **795**, 139493.
- De Melo, A. P. Z., Maciel, M. V. d. O. B., Sganzerla, W. G., da Rosa Almeida, A., de Armas, R. D., Machado, M. H., . . . Barreto, P. L. M. (2020). Antibacterial activity, morphology, and physicochemical stability of biosynthesized silver nanoparticles using thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil. *Materials Research Express*, **7(1)**, 015087.
- Gholami, M., Shahzamani, K., Marzban, A. ve Lashgarian, H. E. J. I. n. (2018). Evaluation of antimicrobial activity of synthesised silver nanoparticles using *Thymus kotschyanus* aqueous extract. *IET nanobiotechnology*, **12(8)**, 1114-1117.
- Güneş Çimen, C., DüNDAR, M. A., Demirel Kars, M. ve Avci, A. (2022). Enhancement of PCL/PLA Electrospun Nanocomposite Fibers Comprising Silver Nanoparticles Encapsulated with *Thymus Vulgaris L.* Molecules for Antibacterial and Anticancer Activities. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **9**, 3717-3732.
- Hashim, N., Paramasivam, M., Tan, J. S., Kernain, D., Hussin, M. H., Brosse, N., . . . Raja, P. B. (2020). Green mode synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera's* tannin and screening its antimicrobial activity / apoptotic potential versus cancer cells. *Materials Today Communications*, **25**, 101511.
- Khalil, M. A., El-Shanshoury, A. E.-R. R., Alghamdi, M. A., Alsalmi, F. A., Mohamed, S. F., Sun, J. ve Ali, S. S. (2022). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Marine Actinobacterium *Nocardioopsis dassonvillei* and Exploring Their Therapeutic Potentials. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 705673.
- Khurana, C., Vala, A. K., Andhariya, N., Pandey, O. ve Chudasama, B. J. J. o. B. M. R. P. A. (2014). Antibacterial activity of silver: the role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **102(10)**, 3361-3368.
- Manikkannan, T., Umapathi, B., Behera, S., Panda, P. ve Mishra, B. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticle from leaf extract of *Desmodium gangeticum (L.) DC.* and its biomedical potential. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, **116**, 424-427.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K. ve Kim, S.-K. (2013). Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver

- nanoparticles using a novel *Nocardiopsis* sp. MBRC-1. *BioMed research international*, 2013.
- Manukumar, H., Yashwanth, B., Umesha, S. ve Rao, J. V. J. A. J. o. C. (2020). Biocidal mechanism of green synthesized thyme loaded silver nanoparticles (GTAgnPs) against immune evading tricky methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 090 (MRSA090) at a homeostatic environment. *Arabian Journal of Chemistry*, **13(1)**, 1179-1197.
- Nowak, A., Kalemba, D., Krala, L., Piotrowska, M. ve Czyzowska, A. (2012). The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiol*, **32(1)**, 212-216.
- Nowak, A., Kalemba, D., Piotrowska, M. ve Czyzowska, A. J. A. J. o. M. R. (2013). Effects of thyme (*Thymus vulgaris L.*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) essential oils on growth of *Brochothrix thermosphacta*. *Afr. J. Microbiol. Res*, **7**, 3396-3404.
- Pandiyan, I., Sri, S. D., Indiran, M. A., Rathinavelu, P. K., Prabakar, J. ve Rajeshkumar, S. (2022). Antioxidant, anti-inflammatory activity of *Thymus vulgaris*-mediated selenium nanoparticles: An in vitro study. *J Conserv Dent*, **25(3)**, 241-245.
- Patel, R. R., Singh, S. K. ve Singh, M. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles: methods, biological applications, delivery and toxicity. *Materials Advances*, **4(8)**, 1831-1849.
- Polat, G., Erdal, Z. A. ve Kalay, Y. E. (2020). Design of novel non-equiatomic Cu-Ni-Al-Ti composite medium-entropy alloys. *Journal of Materials Engineering and Performance*, **29**, 2898-2908.
- Rakaa, J. M. ve Obaid, A. S. J. I. J. o. P. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Thyme vulgaris* leaves extract and its antibacterial activity. *Iraqi Journal of Physics*, **18(46)**, 1-12.
- Roy, P., Das, B., Mohanty, A. ve Mohapatra, S. J. A. N. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and its antimicrobial study. *Applied Nanoscience*, **7(8)**, 843-850.
- Singh, H., Du, J., Singh, P. ve Yi, T. H. (2018). Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **46(6)**, 1163-1170.
- Thakur, B. K., Kumar, A. ve Kumar, D. (2019). Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and evaluation of their antibacterial activity. *South African Journal of Botany*, **124**, 223-227.
- Usmani, A., Mishra, A., Jafri, A., Arshad, M. ve Siddiqui, M. A. (2019). Green synthesis of silver nanocomposites of *Nigella sativa* seeds extract for hepatocellular carcinoma. *Current Nanomaterials*, **4(3)**, 191-200.
- Wasilewska, A., Klekotka, U., Zambrzycka, M., Zambrowski, G., Świącicka, I. ve Kalska-Szostko, B. (2023). Physico-chemical properties and antimicrobial activity of silver nanoparticles fabricated by green synthesis. *Food Chemistry*, **400**, 133960.
- Yılmaz Öztürk, B., Yenice Gürsu, B. ve Dağ, İ. (2020). Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, **89**, 208-219.
- Zhang, D., Ma, X. L., Gu, Y., Huang, H. ve Zhang, G. W. (2020). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer. *Front Chem*, **8**, 799.