



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI BİTKİ EKSTRELERİNİN *IN VITRO* BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Fulya Tuğba ARTUN**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**


**Doç. Dr. Ali KARAGÖZ**

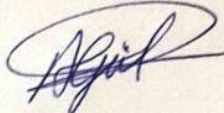
**Haziran, 2015**

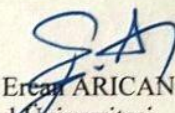
**İSTANBUL**


Bu çalışma 03/06/ 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

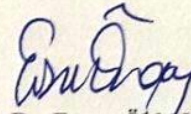
**Tez Jürisi:**

  
Doç.Dr. Ali KARAGOZ (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

  
Doç.Dr. Ercan ARICAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Doç.Dr. Bedia PALABIYIK  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Doç.Dr. Evren ÖNAY UÇAR  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 44778 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi her konuda benden destek, sevgi ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan değerli hocam Doç.Dr. Ali KARAGÖZ'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine;

Tezimde kullanılan bitkileri temin ettiğimiz İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim dalı öğretim üyeleri Doç.Dr. Gülay MELİKOĞLU, Doç.Dr. Şükran Kültür ve Prof.Dr. Nurhayat SÜTLÜPİNAR'a;

Antibakteriyel aktivite deneylerimde destek ve yardımlarından yararlandığım her daim güler yüzlü olan Yard.Doç.Dr. Zuhale ZEYBEK hocama ve sevgili Araş.Gör. Miray ÜSTÜNTÜRK'e;

Tez çalışmam sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her ihtiyaç duyduğumda desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan sevgili annem Şengül KESKİN'e ve hayatıma girdiği andan bu yana destek ve sevgisini tüm içtenliğiyle bana veren sevgili eşim Fatih ARTUN'a sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Biricik oğlum Metehan ARTUN'a tez çalışmamı hediye ediyorum.

Haziran, 2015

Fulya Tuğba ARTUN

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
3.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN ELDESİ.....	16
3.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI .....	16
3.3. HÜCRE HATLARI .....	16
3.4. EKSTRELERİN VERO VE HELA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ .....	18
3.4.1. Sitotoksisite Testi .....	18
3.4.2. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi.....	18
3.5. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE .....	19
3.5.1. 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Yöntemi.....	19
3.5.2. Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Yöntemi .....	20
3.5.3. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Yöntemi .....	21
3.6. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE .....	22
3.6.1. Bakteriyel Suşların Hazırlanması.....	22
3.6.2. Disklerin Hazırlanması.....	22
3.6.3. Disk Difüzyon Yöntemi .....	23

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	23
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>24</b>
4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN <i>İN VİTRO</i> SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN MTT YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ.....	24
4.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	39
4.2.1. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi .....	39
4.2.2. Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi .....	43
4.2.3. Tiyobarbitürik Asit Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi .....	43
4.3. BİTKİ EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ .....	45
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>56</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>64</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Bu çalışmada *in vitro* biyolojik aktiviteleri değerlendirilen bitkilerin genel görünümü.....13
- Şekil 3.1:** Tek tabaka halinde çoğalma gösteren Vero hücrelerinin 3 günlük kültürü (Recep DEMİRGAN'ın yüksek lisans tezinden alınmıştır).....17
- Şekil 3.2:** Tek tabaka halinde çoğalma gösteren HeLa hücrelerinin 3 günlük kültürü (Recep DEMİRGAN'ın yüksek lisans tezinden alınmıştır).....17
- Şekil 4.1:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E1 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9867$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9956$ ).....25
- Şekil 4.2:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E2 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9954$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9913$ ).....26
- Şekil 4.3:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E3 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9966$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9984$ ).....27
- Şekil 4.4:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E4 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9469$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9970$ ).....28
- Şekil 4.5:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E5 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9944$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9909$ ).....29
- Şekil 4.6:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E6 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,8828$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9958$ ).....30
- Şekil 4.7:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E7 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9964$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9909$ ).....31
- Şekil 4.8:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E8 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9925$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9973$ ).....32
- Şekil 4.9:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E9 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9963$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9898$ ).....33
- Şekil 4.10:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E10 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9945$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9866$ ).....34
- Şekil 4.11:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E11 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9380$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9891$ ).....35

<b>Şekil 4.12:</b> <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E12 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2: 0,9815$ , HeLa grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2: 0,9977$ ).....	36
<b>Şekil 4.13:</b> <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E13 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2:0,9943$ , HeLa grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2: 0,9981$ ).....	37
<b>Şekil 4.14:</b> <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E14 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2:0,9747$ , HeLa grafiği için; $P < 0.0001$ , $R^2: 0,9962$ ).....	38
<b>Şekil 4.15:</b> Vitamin E, BHA ve Askorbik asit standartlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.....	41
<b>Şekil 4.16:</b> E1-5 ekstrelerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.....	41
<b>Şekil 4.17:</b> E6-10 ekstrelerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.....	42
<b>Şekil 4.18:</b> E11-14 ekstrelerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.....	42
<b>Şekil 4.19:</b> Reaksiyon karışımına eklenen Tablo 4.1’de verilen $IC_{50}$ değerlerine göre hazırlanmış ekstrelerin ve $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki standart antioksidanların lipid peroksidasyonun erken aşamasındaki hidroperoksit oluşumuna inhibe edici etkileri.....	43
<b>Şekil 4.20:</b> Reaksiyon karışımına eklenen Tablo 4.1’de verilen $IC_{50}$ değerlerine göre hazırlanmış ekstrelerin ve $100 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki standart antioksidanların deney başlangıcının 7. gününde karbonil bileşikleri oluşumuna etkileri.....	44
<b>Şekil 4.21:</b> 5 ekstrenin antioksidan aktivitelerinin FTC ve TBA yöntemleri ile karşılaştırılması.....	44
<b>Şekil 4.22:</b> Disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilen antibakteriyel aktivitenin petrilerdeki görünümü.....	46



## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1:</b> Bu çalışmada <i>in vitro</i> biyolojik aktiviteleri değerlendirilen bitkiler.....	12
<b>Tablo 3.1:</b> Disk difüzyon yönteminde kullanılan bakteri suşları. ....	22
<b>Tablo 4.1:</b> Bitki ekstralarının IC <sub>50</sub> (µg/mL) ve SI değerleri.....	24
<b>Tablo 4.2:</b> Ekstrelerin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri. ....	39
<b>Tablo 4.3:</b> Ekstrelerin Vero hücrelerine karşı sitotoksik olmayan konsantrasyonları. ....	40
<b>Tablo 4.4:</b> Sitotoksik olmayan konsantrasyondaki ekstralar ve antibiyotiklerin standart bakteriler üzerine etkileri.....	47
<b>Tablo 4.5:</b> Sitotoksik olmayan konsantrasyondaki ekstralar ve antibiyotiklerin çevresel bakteri suşları üzerine etkileri.....	48
<b>Tablo 5.1:</b> <i>In vitro</i> biyolojik aktivite gösteren bitki ekstralarının karşılaştırılması.....	55

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>CFU</b>	: Koloni oluşturan birim “Colony Forming Unit”
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b>U</b>	: Ünite
<b>v/v</b>	: hacim/hacim oranı “volume/volume”
<b>w/v</b>	: ağırlık/hacim oranı “weight/volume”

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>BHA</b>	: Butillenmiş hidroksianizol
<b>BHT</b>	: Butillenmiş hidroksil toluen
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>DPBS</b>	: “Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
<b>DPPH</b>	: 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>EMEM</b>	: “Eagle’s Minimum Essential Medium”
<b>FBS</b>	: “Fetal Bovine Serum”
<b>FTC</b>	: Ferrik Tiyosiyanat
<b>HeLa</b>	: İnsan serviks kanser hücre hattı
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SI</b>	: Seçicilik indeksi (“Selectivity Index”)
<b>TBA</b>	: Tiyobarbiturik ait
<b>Vero</b>	: Normal Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattı

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI BİTKİ EKSTRELERİNİN *IN VITRO* BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fulya Tuğba ARTUN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ali KARAGÖZ

Bu çalışma kapsamında 8'i Türkiye'ye endemik olan 14 bitki türüne ait metanol ekstresinin *in vitro* biyolojik aktivite (*in vitro* antikanser, antioksidan ve antibakteriyel) taraması yapılmıştır.

Ekstrelerin, insan serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve normal Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücre hattı (Vero)'na karşı *in vitro* antikanser ve sitotoksik aktiviteleri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yöntemi ile belirlendi. Doza bağımlı çalışmalar sonucu HeLa ve Vero hücre hatları için tespit edilen ve hücre canlılığının % 50'sinin ölümüne neden olan IC<sub>50</sub> değerleri göz önüne alındığında sırasıyla *Cotinus coggygria* Scop. için 293 µg/mL ve >1000 µg/mL, *Rosa damascena* Miller için 265 µg/mL ve >1000 µg/mL, *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss için 2 µg/mL ve 454 µg/mL ve *Centaurea antiiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz için 427 µg/mL ve >1000 µg/mL'dir. Bileşiklerin seçicilik derecesi SI değeri (Selectivity Index) ile ifade edilmektedir. Yüksek SI değeri (>2) olan bileşikler kanser

hücrelerine karşı seçici bir toksisite göstermektedir. 14 metanol ekstresinden dördünün yüksek SI değerine sahip olduğu bu çalışmada ortaya konulmuştur. SI değerleri sırasıyla *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss (endemik) için 227, *Rosa damascena* Miller için >3.8, *Cotinus coggygia* Scop. için >3.4 ve *Centaurea antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz (endemik) için >2.3'tür. Sonuç olarak elde edilen parametreler doğrultusunda 2'si endemik 4 bitki metanol ekstresinin ümit verici antikanser aktivite potansiyeline sahip olduğu bu çalışmada ortaya konulmuştur.

14 metanolik bitki ekstresinin antioksidan aktiviteleri, toksik olmayan konsantrasyonları ve IC<sub>50</sub> değerlerine göre 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Ferrik tiyosiyanat (FTC) ve Tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemleri ile değerlendirildi. *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey. (endemik), *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L. (endemik) ve *Rosa damascena* Miller bitkilerinin metanol ekstrelerinin % 86.64- 95.69 aralığında DPPH inhibisyonu ile serbest radikal süpürme aktivitesine sahip oldukları ortaya konulmuştur. FTC yöntemi ile metanol ekstrelerinin lipid peroksidasyonun erken aşamadaki hidroperoksit oluşumunu durdurucu etkileri de belirlendi. 3'ü endemik 5 bitkinin [*Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemik), *Cotinus coggygia* Scop., *Scorzonera tomentosa* L. (endemik), *Rosa damascena* Miller ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss. (endemik)] metanol ekstrelerinin % 72.34-84.27 aralığında hidroperoksit oluşum inhibisyonu gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca TBA yöntemi ile metanol ekstrelerinin lipid peroksidasyonun geç aşamadaki karbonil bileşiklerinin oluşumunu durdurucu etkileri de belirlenmiştir. Yine aynı bitkilerin metanol ekstrelerinin % 84.88-92.93 aralığında karbonil bileşiklerinin oluşumunu inhibe ettiği TBA yöntemi ile de ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey. (endemik), *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L.(endemik), *Rosa damascena* Miller *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemik), *Scorzonera tomentosa* L.(endemik) ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss. (endemik) bitkilerinin metanol ekstrelerinin standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında yüksek antioksidan aktivite potansiyeline sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Bitki ekstrelerinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik olmayan konsantrasyonları kullanılarak antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. *Olea europaea* L. bitkisinin *Staphylococcus aureus* F1 çevresel suşuna, *Cotinus*

*coggyria* bitkisinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* standart suşlarına ve *Staphylococcus aureus* F1, *Staphylococcus aureus* F2, *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşlarına ve *Rosa damascena* bitkisinin de *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşuna karşı farklı derecelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur.

Haziran, 2015, 77 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *İn vitro* biyolojik aktivite, sitotoksisite, antikanser aktivite, antioksidan aktivite, antibakteriyel aktivite.

## **SUMMARY**

**M. Sc. THESIS**

### **EVALUATION OF *IN VITRO* BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DIFFERENT PLANT EXTRACTS**

**Fulya Tuğba ARTUN**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ali KARAGÖZ**

In this study, *in vitro* biological activities (*in vitro* anticancer, antioxidant and antibacterial activity) of the methanolic extracts of 14 plants 8 of which are endemic species to Turkey were screened.

The anticancer and cytotoxic activities of the extracts against the human cervical cancer cell line (HeLa) compared to the normal African green monkey kidney epithelial cell line (Vero) were determined by using the Mitochondrial Dehydrogenase Enzyme Activity assay (MTT). Dose-dependent studies revealed IC<sub>50</sub> of 293 µg/mL and >1000 µg/mL for *Cotinus coggygria* Scop., IC<sub>50</sub> of 265 µg/mL and >1000 µg/mL for *Rosa damascena* Miller, IC<sub>50</sub> of 2 µg/mL and 454 µg/mL for *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss, IC<sub>50</sub> of 427 µg/mL and >1000 µg/mL for *Centaurea antiiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz on the HeLa and the Vero cell lines, respectively. The degree of selectivity of the compounds can be expressed by its Selectivity Index

(SI) value. High SI value (>2) of a compound gives a selective toxicity towards cancer cells. Four of 14 plant methanol extracts were showed high SI values. The SI values are 227 for *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss (endemic species), >3.8 for *Rosa damascena* Miller, >3.4 for *Cotinus coggygia* Scop. and >2.3 for *Centaurea antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz (endemic species), repectively. According to the obtained results, it's shown that 4 plant methanolic extracts 2 of endemic species have the potential of a promising anticancer activity.

The antioxidant activity of 14 plant methanol extracts was evaluated according to non cytotoxic concentrations and IC<sub>50</sub> values by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric thiocyanate (FTC), and thiobarbituric acid (TBA) methods. It's shown that methanol extracts of *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey. (endemic), *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L.(endemic) ve *Rosa damascena* Miller plants have percent of DPPH radical scavenging activity in a range of 86,64% - 95,69% by DPPH method. FTC method was used to determine the methanol extracts' inhibition effect of the hydroperoxide production at an early stage of lipid peroxidation. 5 plants which 3 of endemic species [*Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemic), *Cotinus coggygia* Scop., *Scorzonera tomentosa* L. (endemic), *Rosa damascena* Miller ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss. (endemic)] were determined to have percent inhibition in a range of 72.34-84.27%.

TBA method was used to determine the methanol extracts' inhibition effect of the carbonyl compounds production at a later stage of lipid peroxidation. Same plant methanol extratcs was determined to have percent inhibition in a range of 84.88-92.93%. According to the obtained results, the methanol extracts of *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey. (endemic), *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L.(endemic), *Rosa damascena* Miller *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemic), *Scorzonera tomentosa* L.(endemic) ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss. (endemic) plants have a high potential of antioxidant activity.

By disk diffusion method, the antibacterial activity of plant extracts was evaluated by using the non cytotoxic concentrations determined by MTT method. *Olea europaea* L. plant inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* F1 environmental strain, *Cotinus coggygia* plant inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* standard strains and *Staphylococcus aureus* F1, *Staphylococcus aureus* F2, *Staphylococcus aureus* F3 environmental strains and *Rosa damascena* plant inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* F3 environmental strain.

June, 2015, 77 pages.

**Keywords:** *In vitro* biological activity, cytotoxicity, anticancer activity, antioxidant activity, antibacterial activity.



## 1. GİRİŞ

Bitkisel ürünler, antik çağlardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır ve bitkisel ilaçların kullanımının insanlık tarihi kadar eskidir denilmesi mübalağa değildir. Çeşitli hastalıkları tedavisi ve önlenmesi için kullanılan terapötik ajanların kaynağı olarak tıbbi bitkilerin dünyanın her yerine dağılmış olarak bulunması doğanın bir hediyesidir (Manjusha ve diğ., 2015). Modern tıp için bitkisel materyaller, doğal olmaları nedeniyle insan vücudu ile barışık olan, istenmeyen yan etkilerinin yılların tecrübesiyle ortaya konulması ve içermiş oldukları etken maddelerin yapılarının aydınlatılmasıyla, aynı etkiyi gösterebilecek birçok sentetik ilaç için model olarak kullanılabilen potansiyel kaynaklardır (Turker ve Koyluoglu, 2012).

Bitkisel tıbbi ürünler, sürekli değişmekte olan ve yüzyıllardır bir sonraki kuşağa aktarılan bilgi ve uygulama sistemini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, kuşkusuz insanların büyük bir çoğunluğu böyle ürünlere güven duymakta ya da modern tıba alternatif olarak bitkisel ilaçları tercih etmektedir (Ponni ve diğ., 2009).

Çok uzun zamandır, birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi için çoğu zaman bilimsel arka planı bilinmeyen tıbbi bitkiler kullanılmıştır. Günümüzde ise bunun aksi olarak, tıbbi bitkilerin kullanılmalarının gerekçeleri ve bilimsel açıdan biyolojik aktivitelerinin kanıtlanmasının önemine yapılan vurgu artmakta ve mevcut ilaçların pahalı, etkinliklerinin çoğu zaman sınırlı olması ve yan etkiye sahip olmaları sebebiyle bitkilerden elde edilen ilaçlara büyük bir ilgi gösterilmektedir (Salehi ve diğ., 2013; Manjusha ve diğ., 2015). İlaç keşfinde etnomedikal değeri olan bitkilerle yapılan tarama çalışmalarının rastgele yapılan taramalardan daha başarılı olduğu iyi bilinmektedir (Raja ve diğ., 2011).

Bitkilerden elde edilen antikanser ilaçların araştırılmasında kullanılan stratejiler genellikle ham ektrelerin insan tümör hücresinin canlılığı üzerine etkisinin gösterildiği bir tarama ile başlamaktadır (Taylor ve diğ., 2013).

Bu çalışmada, 8'i endemik 14 metanolik bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) Kolorimetrik Yöntemi ile belirlendikten sonra, *in vitro* antioksidan potansiyelleri 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Ferrik Tiyosiyanat (FTC) ve Tiyobarbitürik Asit (TBA) yöntemleri kullanılarak ve ekstrelerin toksik olmayan konsantrasyonları uygulanarak çeşitli *Gram* (-) ve *Gram* (+) bakterilere karşı antibakteriyel potansiyellerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte ülkemizde endemik olan ve olmayan biyolojik aktiviteleri ortaya konulmamış bitki ekstreleri ile bu konuda yapılacak olan çalışmalar yeni etkin ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

## 2. GENEL KISIMLAR

Bitkiler besin kaynağı olmalarının yanı sıra ilaç, tekstil, yakıt ve kimyasal bileşenlerin üretimi için insanlık tarihi boyunca kullanılmıştır. Geleneksel tıpta kullanılan bitkilere ve bu bitkilerin özelliklerine ait bilgiler günlük hayatta kullanılarak nesilden nesile aktarılmıştır (Polat ve diğ., 2013). Dünyadaki farklı geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılan tıbbi bitkilerin farmakolojik özellikleri ve kimyasal yapıları insanlık yararı için kullanılmak üzere ortaya konulmaktadır (Raja ve diğ., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya nüfusunun neredeyse % 80'i temel sağlık ihtiyaçları için bitkisel ilaçlara ve/veya bitkisel ürünlere bağımlıdır (Sagnia ve diğ., 2014).

Tıbbi bitkiler, modern ve geleneksel tıpta kullanılan ilaçların en zengin biyokaynaklarıdır. Geleneksel toplumlar tarafından kullanılan çoğu tıbbi bitkinin etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmamış olup bu bitkilerin biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi sağlayacak etkin biyoanalizlere ihtiyaç duyulmaktadır (Türker ve Yıldırım, 2013). Etnobotanik çalışmalardan elde edilen bilgi biyolojik kaynakların korunması ve bu kaynaklardan faydalanılması için oldukça önemlidir (Polat ve diğ., 2013). Bununla birlikte, geleneksel tıp, bitkilerden elde edilen 1600 yeni ilacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yüzden, etnomedikal bitkilere ait bilgilerin ve bilimsel analizlerin bir araya getirilmesi oldukça önemlidir (Raja ve diğ., 2011).

Temel sağlık tedavisi olarak doğal bitkilerin bölgesel kullanımı farmakolojik özelliklerinden ileri gelmektedir. Çoğu bitki ekstresi etkinliğini metabolitlerinin varlığına borçludur. Bu metabolitler genellikle bitkilerin kök, yaprak, sürgün ve kabuk gibi çeşitli kısımlarında bulunmaktadır. Tıbbi bitkilerin peptitler, doymamış uzun zincirli yağ asitleri, aldehitler, alkaloidler, esansiyel yağlar ve fenolik bileşenler içerdiği farklı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Bu bileşenler virüs, mantar ve bakteriler dahil insan ve hayvan patojenlerine karşı uygulanan tedavilerde oldukça etkindirler (Zarinah ve diğ., 2014). Bu nedenle, çoğu bitki önemli ilaçların kaynağı haline gelmiştir ve böylece ilaç endüstrisi sentetik ilaçların hazırlanmasında kullanılabilen biyoaktif

ajanların bir kaynağı ve/veya modeli olarak geleneksel tıptan faydalanmaktadır (Mann ve diğ., 2011).

Doğal ürünler ve doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar bakteriyel enfeksiyon, kanser ve immünolojik bozukluklar olarak kategorize edilen insan hastalıklarının % 87'sinin tedavisinde kullanılmaktadır. Dünyada reçetelendirilen ilaçların yaklaşık olarak % 25'i bitkisel orijinli olup 3000'den fazla bitki türünün ise antikanser özelliklerinin olduğu bildirilmiştir (Uddin ve diğ., 2009). "Paclitaxel", "vinblastine", "irinotecan", "topotecan", "etoposide" ve "combretastatin" gibi klinik öneme sahip ilaçlar bitkilerden elde edilmiştir.

Antikanser ilaçlar, kanser hücreleri dışında normal hücreleri hedef alan çeşitli mekanizmlarla etkili olabilirler. Bununla birlikte, çoğu antikanser ilaçların birincil hedefi tümör hücreleridir. *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen terpenoit ve "paclitaxel" apoptoz yolu ile hücre ölümünü tetiklerken, "vincristine" (Oncovin), "vinorelbine" (Navelbine) ve "teniposide" (Vumon) doğrudan tümör hücreleri üzerinde etkilidirler (Taylor ve diğ., 2013).

Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar, tıbbi bitkilere olan ilgiyi tekrar üzerine toplamıştır. Bunun başlıca sebepleri arasında; bitkilerin kolay ve ucuz tedavi olanağı sağlaması, sentetik bileşiklerin bazılarında görülen ve kullanılmaya başlandıktan sonra anlaşılan yan etkilerine göre bitkisel ilaçların yan etkilerinin daha az olması, sentetik bileşiklerin genellikle tek bir etkiye sahip olmasına karşın bitkisel ilaçların birkaç etkiye birden sahip olması sayılabilir. Doğal olmaları nedeniyle insan vücudu tarafından kolayca kabul edilen, arzu edilmeyen yan etkileri ya da zararları yılların deneyimiyle iyi bilinen, içermiş oldukları etken maddelerin yapılarının aydınlatılmasıyla, aynı etkiyi gösterebilecek birçok sentetik ilaç için model olarak kullanılabilen bitkisel materyaller halen modern tıbbın vazgeçilemez unsurlarındandır. Ayrıca iyi değerlendirildiklerinde, ülkeler için büyük bir ekonomik güç sağlayacak potansiyel kaynaklardır (Baytop, 1999; Turker ve Koyluoglu, 2012).

Serbest radikaller hücre metabolizmasında üretilen bir ya da daha fazla eşleşmemiş serbest elektronu olan atom ya da moleküller olarak tanımlanmaktadırlar (Wong ve diğ., 2014). İnsan vücudunda, serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROT)

fagositoz, yağ asiti beta oksidasyonu, araşidonik asit oksidasyonu ve oksidatif fosforilasyon gibi doğal mekanizmalar tarafından üretilmektedir (Motamed ve diğ., 2014). Normal şartlar altında ROT seviyesi, ROT'ların yapımının ve yıkımının dengede tutulduğu vücudun antioksidan savunma sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Sagnia ve diğ., 2014). Vücudun antioksidan savunma kapasitesinden çok daha fazla ROT üretimi oksidatif strese yol açmaktadır. Süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) canlı hücrelere oksijen alındığı zaman oluşan serbest radikaller arasında en güçlü ROT'lardan biridir.  $O_2^{\cdot-}$ , hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH^{\cdot}$ ) gibi zararlı ROT'lara dönüşmektedir. Başta en güçlü ROT'lardan biri olan hidroksil radikali ise vücuttaki makromolekülleri hedef almaktadır. Gıda sanayisi için lipid peroksidasyonu gıda bozulmalarının en önemli sebeplerindendir. İnsan sağlığı açısından ise oksidanlar başta kanser, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, erken yaşlanma, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıkların en önemli nedenleri arasında gösterilmektedir (Motamed ve diğ., 2014). Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda substratların oksidasyonunu önleyen, azaltan veya oksidanların zararlı etkilerini onaran maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidanlar serbest radikallerle ve diğer ROT'larla reaksiyona girerek insan vücudunu oksidatif hasardan korumaktadır (Khalili ve diğ., 2013).

Canlı organizmalar, serbest radikaller ve diğer ROT'ların zararlı etkilerini nötralize etmek için etkin bir savunma sistemi ile donatılmışlardır. Bu savunma sistemleri, glutatyon, E vitamini, C vitamini ve  $\beta$ -karoten gibi bileşikler veya katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimleri içermektedir (Fadda ve diğ., 2014). Beslenme yoluyla alınan E vitamini, C vitamini ve  $\beta$ -karoten gibi antioksidanların oksidatif hasarı azalttığı yine bitkisel kökenli fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitlerin oldukça geniş farmakolojik ve biyokimyasal aktivitelere sahip oldukları, aterosklerozis ve kanser gibi hastalıkların önlenmesine katkı sağladıkları yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Wong ve diğ., 2014). BHT (butillenmiş hidroksil toluen) ve BHA (butillenmiş hidroksianizol) gibi bazı sentetik antioksidanların hayvan modellerinde toksik ve kanserojen etki göstermeleri sebebiyle doğal antioksidanlarla değiştirilmelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, doğal kaynaklı etkin ve güvenilir yeni antioksidanların ortaya konulması oldukça önemlidir (Zarinah ve diğ., 2014).

Somut veriler, başta bitkisel besinlerin antioksidanlar içerdiğini ve özellikle antioksidan içeren besinlerin hastalıkların önlenmesinde büyük önem taşıdığını ortaya koymaktadır. Besinlerin ve bitki ekstraktlarının *in vitro* ve *in vivo* olarak antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde çok sayıda yöntem etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Alam ve diğ., 2012).

Son yıllarda, antibiyotik dirençli mikroorganizmaların çoğalması sebebiyle yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmelerinin gerekliliği de artmıştır. Geleneksel antimikrobiyal tedavi yeni nesil antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için potansiyel bir kaynak oluşturmaktadır. Yaklaşık 500.000 bitki türünün sadece küçük bir yüzdesi fitokimyasal, farmakolojik ve biyolojik aktivite yönünden araştırılabilmiştir (Raja ve diğ., 2011; Erdoğan ve diğ., 2013).

Türkiye büyük bir halk tıbbı bilgisine ve zengin bir floraya sahiptir, bu nedenle ilgili çalışmalar için potansiyel bir kaynak sunmaktadır. Bitki çeşitliliği anlamında en zengin ülkelerden birisi Türkiye'dir. Sınırları dahilinde yaklaşık 10,500 tür tanımlanmış olup bunların % 30'u endemiktir (Polat ve diğ., 2013). Bir yerin çevresel öneminin ortaya konulmasında endemiklik önemli bir belirleyicidir. Diğer Avrupa ülkeleriyle kıyaslandığında Türkiye'deki endemiklik oranı oldukça fazladır. Türkiye'deki geleneksel tıp çalışmaları Cumhuriyetin kuruluşundan (1923) bu yana ilerleyerek devam etmiştir (Baytop, 1999; Polat ve diğ., 2013). Günümüzde kırsal alanlarda yaşayan insanların büyük bir çoğunluğu geleneksel olarak besin ve tedavi amaçlı bitkileri kullanmaktadır. Son yıllarda, tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin geleneksel kullanımları Türkiye'de de araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Polat ve diğ., 2013).

Çalışmamızda kullandığımız bitkilere ait bilgiler Tablo 2.1'de ve bitkilerin genel görünüşleri Şekil 2.1'de gösterilmektedir. *Crataegus* cinsi Kuzey Amerika, Kuzey Afrika, Asya'nın doğusu ve batısı, Orta Asya ve Avrupa'yı içine alan ılıman bölgelerin kuzeyinde ve Hindistan, Çin gibi ülkelerde doğal olarak yetişmekte ve Alıç olarak isimlendirilmektedir (Edwards ve diğ., 2012; Kumar ve diğ., 2012). Halk tıbbında çok eski zamanlardan beri kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle kalp rahatsızlıklarının tedavisindeki kullanımı 1800'lere kadar gitmekte olup, çok sayıda laboratuvar ve klinik testler ile Alıç'ın kardiyovasküler hastalıkların tedavisindeki etkisi ortaya konulmuştur (Edwards ve diğ., 2012). Aynı zamanda sahip olduğu oligomerik prosiyanitler,

flavonoitler, triterpenler, polisakkaritler, katekolaminler gibi fitokimyasallar değerlendirilerek sitotoksik, anti-HIV, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitelerini de gösterdiği farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Kumar ve diğ., 2012). Günümüzde ise kanser, diyabet ve iktidarsızlık için terapötik ajan olarak kullanımına ek olarak genelde kardiyovasküler hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Türkiye’de ise halk tıbbında bu bitkinin farklı kısımları kullanılarak öksürük, grip, astım, mide ağrıları, romatizmal ağrılar, hemoroid ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Özyürek ve diğ., 2012). Türkiye’de yetişen farklı alıç bitkileri ile yapılan biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışmaları son yıllarda bu cinse olan ilginin artmasına yol açmıştır (Özyürek ve diğ., 2012). Ancak, çalışmamızda kullandığımız *Crataegus microphylla* C. Koch türü ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması yapılmamış olup sadece Melikoğlu ve diğ., (2004) tarafından bu türden 7 farklı flavonoit izole edilip tanımlanmıştır.

*Teucrium* cinsi özellikle Akdeniz’de ve ılıman bölgelerde doğal olarak yetişmektedir. Tıbbi bitki olarak 2000 yıldır kullanılmakta olup, *Teucrium* cinsine ait bazı türler halen halk tıbbında antiseptik, idrar söktürücü, diabetik, ateş düşürücü, antispazmodik olarak ve kronik bronşit, astım, gut ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanında hipoglisemik, hipolipidemik, hepatoprotektif, ateş düşürücü, antiinflamatuvar, antiülser, antitümör, antioksidan, antifungal ve antibakteriyel aktivitelerine de sahiptir (Kaya ve diğ., 2009; Kılıç, 2014). Yemek sektöründe ise gıdaların bozulmasına sebep olan mikropların üremesini önlemek amaçlı olarak da kullanılmaktadır. İçerdikleri esansiyel yağlar oldukça çeşitli olup bu cinse ait üyeler en zengin diterpen içeren bitkilerden olup 220’den fazla diterpene sahiptirler (Kılıç, 2014). *Teucrium sandrasicum* O. Schwarz türü Türkiye’de endemik olarak yetişen ve Ülper olarak adlandırılan bir bitkidir (Özcan ve diğ., 2015). Bu tür ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması henüz yapılmamıştır.

*Centaurea* L. Türkiye’de 199 takson ile temsil edilmekte ve bunların % 61.1’i de endemiktir. Çeşitli *Centaurea* türleri hazımsızlık giderici, balgam söktürücü, ateş düşürücü, antidiyaretik ve tonik olarak halk tıbbında kullanılmaktadır. *Centaurea* türleri ile yapılan farmakolojik çalışmalarla antiinflamatuvar, antimikrobiyal, ateş düşürücü, sitotoksik, antioksidan, antifungal ve immünolojik aktiviteleri tespit edilmiştir (Astari

ve diğ., 2014). *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür ve *Centaurea antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz türleri Türkiye'ye endemik bitkiler olup (Kültür, 2010; Bona, 2013) sırasıyla Hanım Kavgalaz ve Peygamber çiçeği olarak isimlendirilmektedirler. Bu iki endemik tür ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması henüz yapılmamıştır.

*Olea europaea* L. Akdeniz havzasında doğal olarak yetişen ve antik çağdan bu yana tedavi edici özellikleri iyi bilinen bir bitkidir (Ghanbari ve diğ., 2012; Omer ve diğ., 2012). Zeytin bitkisinin meyveleri antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, kardiyotonik gibi biyolojik aktiviteleri gösteren oldukça fazla hidrofilik (fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler ve sekoiridoitler) ve lipofilik (kresoller) bileşenlere sahiptir (Ghanbari ve diğ., 2012). Zeytinin meyve ve yapraklarında bulunan maslinik asit antitümoral, antidiyabetik, antioksidan ve anti-HIV aktiviteleri yapılan fitokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuştur (González ve diğ., 2013). Zeytin bitkisinin yapraklarında oldukça fazla bulunan oleuropein isimli fenolik bileşenin lipit metabolizmasını ve obezite ile ilgili problemleri iyileştirdiği, antitümör ajan olarak davrandığı ve anti-HIV aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Marino ve diğ., 2014).

*Salvia* dünya çapında tıbbi amaçlı olarak kullanılan bir bitki olup Türkiye'de 96 takson ile temsil edilmektedir (Topcu ve diğ., 2008). Bu taksonların % 50.6'sı endemiktir (Kandemir, 2003). *Salvia* türleri diterpenler açısından oldukça zengin kaynaklar olup antiseptik, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiviral, sitotoksik, kardiyovasküler, yatıştırıcı, spazmolitik, antikonvülsan ve gaz giderici gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Etnobotanikal, fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar *Salvia* türlerinin "her şeyi iyileştiren" türde bitkiler olduğunu ortaya koymuştur (Topcu ve diğ., 2008). *Salvia hypargeia* Fisch. & Mey. Türkiye'ye endemik bir tür olup Siyahot olarak isimlendirilmektedir. Bu türün antioksidan (Tepe ve diğ., 2006) ve antibakteriyel (Topcu ve Gören, 2007) aktivitelere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

*Cotinus coggygria* Scop. (sumak) Güney ve Güney Batı Avrupa'da doğal olarak yetişen bir bitkidir. Antiinflamatuvar, antiseptik ve kanama durdurucu özellikleri sebebi ile halk tıbbında kullanılmaktadır. Genellikle ishal tedavisinde, yara iyileştirici ve çeşitli cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Cotinus coggygria* Scop. monoterpen, yüksek miktarda tanin, gallik asit, metil galat, pentagalöl glukoz ve flavonoid, mirisetin,



kersetin ve kaempiferol içermektedir. Antioksidan, sitotoksik (Marčetić ve diğ., 2013) yara iyileştirici, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etkileri yapılan biyolojik aktivite çalışmaları ile de ortaya konulmuştur (Matić ve diğ., 2013).

*Hypericum* L. cinsine ait bitkiler Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yetişmektedir. Türkiye *Hypericum* cinsi için oldukça önemli bir merkez olup 43'ü endemik olmak üzere toplam 89 türe sahiptir (Duman, 2012). *Hypericum* türleri depresyon, anksiyete, nevralsi gibi psikolojik bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır. Hiperisin, psödohiperisin, hiperforin, adhiperforin, kersetin, kersitrin, tanin ve esansiyel yağlar bu cinse ait türlerin kimyasal bileşenleridir (Özkan ve diğ., 2013). *Hypericum kotschyianum* Boiss. Türkiye'ye endemik bir tür olup Dümbelek kantaronu olarak isimlendirilmektedir. *Hypericum kotschyianum* Boiss. bitkisinin sitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Duman, 2012).

*Nepeta* L. Avrupa, Asya ve Afrika'nın bazı bölgelerinde doğal olarak yetişen bir bitkidir. Türkiye'de 33 türü olup en yaygın olan türü *Nepeta italica* L. (Eşek çayı)'dır. *Nepeta* cinsine ait birçok tür araştırıldığında monoterpenoit, diterpenoit ve triterpenoit içerdikleri bulunmuştur (Kökdil ve Kurucu, 1997). *Nepeta italica* L. türünün içerdiği vitamin, flavonoid ve yağ asitleri sebebiyle antibakteriyel aktivite gösterdiği ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu İrfan ve diğ. (2011) ve Orhan ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

*Stachys* cinsi en çok Akdeniz, Güney-batı Asya, Kuzey ve Güney Amerika ve Güney Afrika'da doğal olarak yetişmektedir. Ancak, Yeni Zelanda ve Avustralya'da doğal olarak yetişmemektedir. Akdeniz bölgesinde ve İran'da bitkisel ilaç ve dağ çayı olarak kullanılmaktadır (Gören, 2014). Halk tıbbında dezenfektan, antispazmodik, balgam sökücü, öksürük kesici, genital tümörün gelişmesini ve ülser kanserini önleyici olarak kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarla sitotoksik, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri ortaya konulmuştur. Bu cinse ait türlerin sahip olduğu ana sekonder metabolitler olarak flavonoidler, iridoitler, yağ asitleri ve fenolik asitler bulunmuştur (Tundis ve diğ., 2014). *Stachys cretica* L. subsp. *vacillans* Rech.fil (Dik deli çayı) alt türü ile ilgili yapılan herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması henüz mevcut değildir.

*Scorzonera* L. cinsi sayısız biyoaktif bileşene sahip olduğu bilinen bir kaynak olup Asya'nın kurak bölgelerinde, Avrupa'da ve Kuzey Afrika'da doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'de 17'si endemik 39 türü bulunmaktadır (Sarı ve diğ., 2007; Acıkara ve diğ., 2013). *Scorzonera* L. cinsinden dihidroizokumarin, bibenzil türevleri, flavonoidler, lignanlar, stilben türevleri, kumik ve kafeik asit türevleri, seskiterpen, seskiterpen laktonlar ve triterpenler izole edilmiştir (Acıkara ve diğ., 2013). *Scorzonera tomentosa* L. Türkiye'de endemik olarak yetişen bir tür olup Alabent olarak isimlendirilmektedir. Bu bitkinin toprakaltı kısımları analjezik, antiromatizmal, antihelmintik olarak ve kısırlık tedavisi için halk tıbbında kullanılmaktadır (Sarı ve diğ., 2007).

*Origanum* cinsi Akdeniz bölgesinde doğal olarak yetişmektedir. İçerdiği esansiyel yağlar sebebiyle sahip olduğu antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri yemek endüstrisinde bu bitkiyi oldukça değerli hale getirmiştir (Davidence ve diğ., 2015). Bu cinse ait farklı türlerin analjezik, sitotoksik, balgam söktürücü, antiseptik ve antibakteriyel aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Oluk ve diğ., 2013). *Origanum sipyleum* L. (Anadolu çayı) bitkisel çay olarak kullanılan Türkiye'de endemik olarak yetişen bir türdür. İçerdiği apijenin, kafeik asit, karvakrol, hesperidin, narinjenin, rozmarinik asit, rutin, viteksin sekonder metabolitler olup antioksidan ve antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Ozkan ve diğ., 2007).

*Rosa damascena* gül yağı üretimi için yüzyıllardır yetiştirilmektedir (Rusanov ve diğ., 2011). Monoterpen alkoller ve hidrokarbonlar gibi sekonder metabolitler izole edilmiştir. Halk tıbbında analjezik, antidepresan, antiinflamatuvar, diüretik ve kozmetik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Rosa damascena* Miller (Isparta gülü) türünün antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Basim ve Basim, 2003). Dünyada gül yağı parfüm, krem, sabun, losyon ve diğer kozmetik ürünlerin esans bileşeni olarak kullanılmakta olup gül suyu ise yiyecekler ve içecekler için aroma verici olarak kullanılmaktadır. Gül yağı ve gül suyu üreticilerinin başında Bulgaristan, Türkiye ve İran olup Kuzey Afrika, Hindistan ve Çin'de de az da olsa gül suyu üretilmektedir (Rusanov ve diğ., 2011).

*Colchicum* cinsi dünyada 225 türe sahip olup (Alali ve diğ., 2006) Türkiye'de 15'i endemik toplam 35 tür ile temsil edilmektedir (Akan ve Eker, 2005). *Colchicum* cinsine

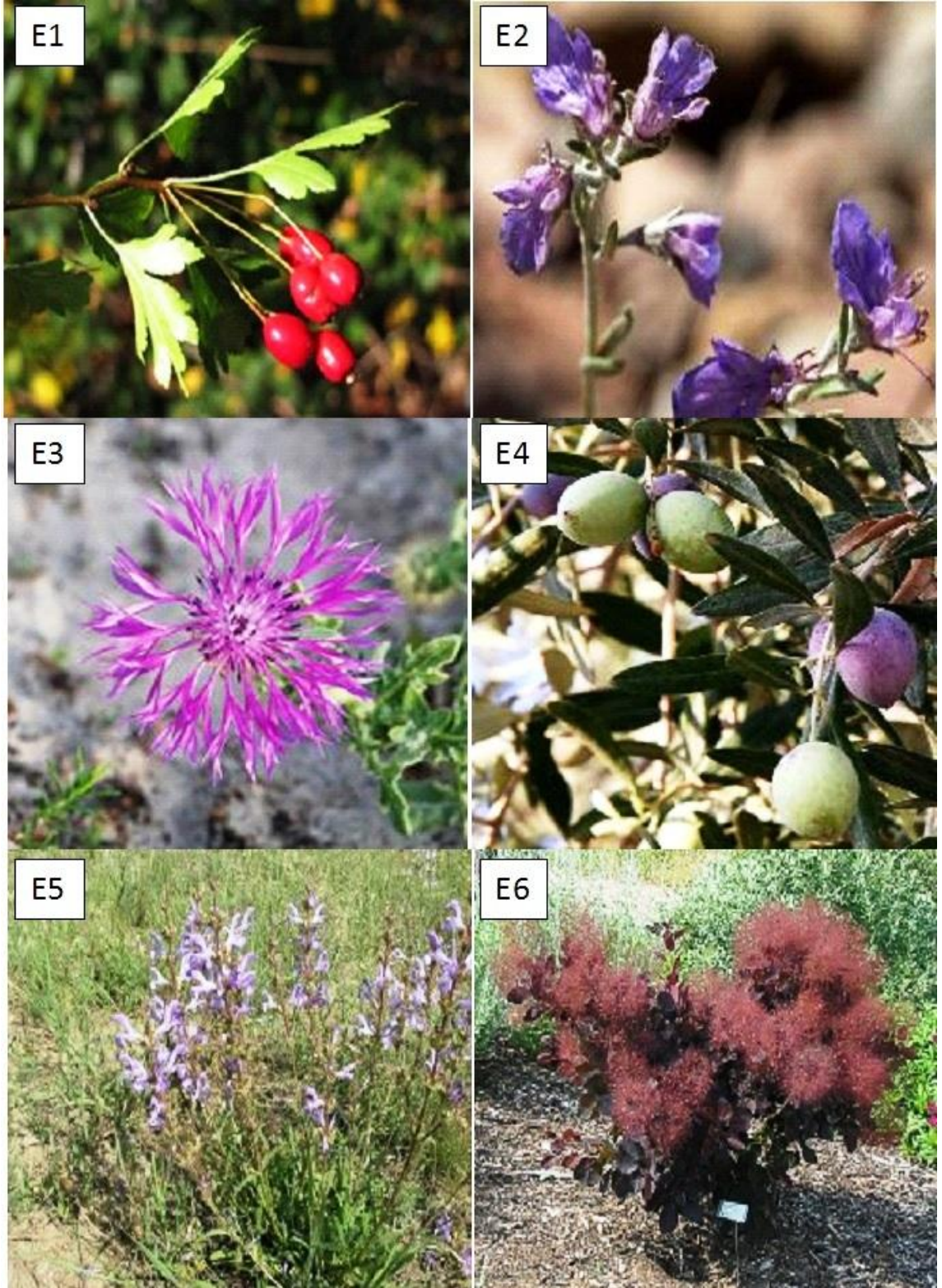
ait bazı türlerin tıbbi ve toksik özelliklerinin bilinmesi 2000 yıldan daha öteye gitmektedir. 1820’de Pelletier ve Caventou tarafından ilk defa *Colchicum autumnale* bitkisinden izole edilen kolşisin günümüzde hala gut hastalığı, Akdeniz ateşi, Behçet hastalığı ve proinflatuar bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır. Kolşisinin antitümör aktivitesi ise klinik araştırmalarla tespit edilmiştir (Alali ve diğ., 2006). *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss. bitkisi Türkiye’de endemik olarak yetişmekte ve Acı çiğdem olarak isimlendirilmektedir (Akan ve Eker, 2005). Bu tür ile ilgili yapılan herhangi bir biyolojik aktivite ve kimyasal bileşen analizi çalışması henüz mevcut değildir.

Çalışmamızda, ülkemizde de çeşitli amaçlarla etnomedikal kullanımı olan 8’i endemik 14 bitki türünden elde edilen metanol ekstratlarının *in vitro* antikanser, antioksidan ve antibakteriyel potansiyellerini ortaya koymak amacı ile kullanılmıştır.

**Tablo 2.1:** Bu çalışmada *in vitro* biyolojik aktiviteleri değerlendirilen bitkiler.

<b>Kod</b>	<b>Tür</b>	<b>Bölgesel isimlendirme</b>	<b>Familya</b>	<b>Bitkinin Kullanılan Kısmı</b>	<b>Toplandığı Bölge</b>	<b>ISTE* no</b>
E1	<i>Crataegus microphylla</i> C. Koch	Alıç, Akdiken	Rosaceae	Yapraklar	Gölcük- Bolu	76223
E2	<i>Teucrium sandrasicum</i> O. Schwarz (Endemik)	Ülper	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	Köyceğiz-Muğla	87526
E3	<i>Centaurea nerimaniae</i> Ş. Kültür (Endemik)	Hanım Kavgalaz	Asteraceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	98163
E4	<i>Olea europaea</i> L.	Zeytin	Oleaceae	Yapraklar	Şarköy-Tekirdağ	106286
E5	<i>Salvia hypargeia</i> Fisch.& Mey.(Endemik)	Siyahot	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	98205
E6	<i>Cotinus coggygia</i> Scop.	Boyacı sumacı	Anacardiaceae	Yapraklar	Kırklareli	80926
E7	<i>Hypericum kotshcyanum</i> Boiss.(Endemik)	Dümbelek kantaronu	Hypericaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	98173
E8	<i>Nepeta italica</i> L.	Eşek çayı	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	98192
E9	<i>Stachys cretica</i> L. subsp. <i>vacillans</i> Rech.fil	Dik deli çay	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	98166
E10	<i>Scorzonera tomentosa</i> L.(Endemik)	Alabent	Asteraceae	Toprak üstü kısımları	Malatya	98954
E11	<i>Origanum sipyleum</i> L.(Endemik)	Anadolu çayı	Lamiaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	86060
E12	<i>Rosa damascena</i> Miller	Isparta gülü	Rosaceae	Çiçekler	Isparta	106285
E13	<i>Colchicum sanguicolle</i> K.M. Perss.(Endemik)	Acı çiğdem	Colchicaceae	Tohum	Antalya	48868
E14	<i>Centaurea antiochia</i> Boiss. var. <i>praealta</i> (Boiss. &Bal) Wagenitz (Endemik)	Peygamber çiçeği	Colchicaceae	Toprak üstü kısımları	Mersin	48868

\***ISTE:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariyumu



Şekil 2.1: Bu çalışmada *in vitro* biyolojik aktiviteleri değerlendirilen bitkilerin genel görünümü.



Şekil 2.1: (devamı)



Şekil 2.1: (devamı)

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN ELDESİ

Bu çalışmada kullanılan bitkilerin toplanması, tür tayinleri ve ekstralarının hazırlanması İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri tarafından gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Kurutulmuş bitki materyalleri (*Crataegus microphylla*, *Teucrium sandrasicum*, *Centaurea nerimaniae*, *Olea europaea*, *Salvia hypargeia*, *Cotinus coggygia*, *Hypericum kotschyanum*, *Nepeta italica*, *Stachys cretica* subsp. *vacillans*, *Scorzonera tomentosa*, *Origanum sipyleum*, *Rosa damascena*, *Centaurea antiochia* var. *praealta*) oda sıcaklığında metanol (% 95) ile perkole edildi. Metanol ekstraları 40 ile 50 °C’de kuruyana kadar döner evaporatörde bekletildi.

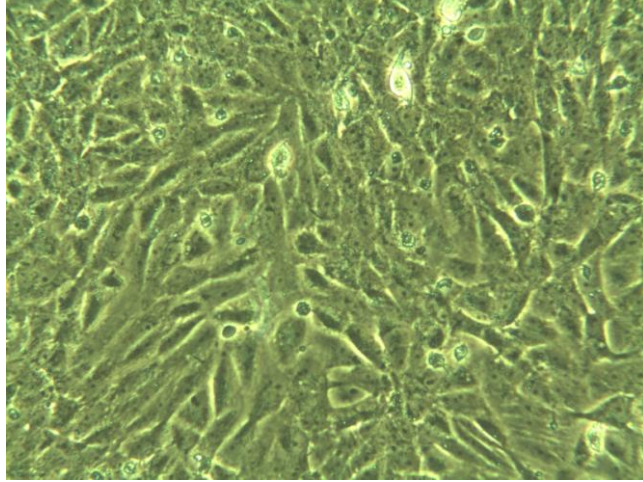
*Colchicum sanguicolle* bitkisinin kurutulmuş tohumları petrol eteri ile Soxhlet aparatında ve daha sonra metanol (% 95) ile ekstrakte edildi. Metanol ekstresi 40 ile 50 °C’de kuruyana kadar döner evaporatörde bekletildi.

Tüm ekstralar -20 °C’de bekletilip kullanılmadan önce konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde su içine alınarak vorteks ve ultrasonikasyon su banyosu ile tam olarak çözümleri sağlandı. Ana stoklar 45 µm çapında milipor filtreler yardımı ile steril hale getirildi. Hazırlanan ekstre ana stokları (5 mg/mL) Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve kültür ortamlarına aktarıldı.

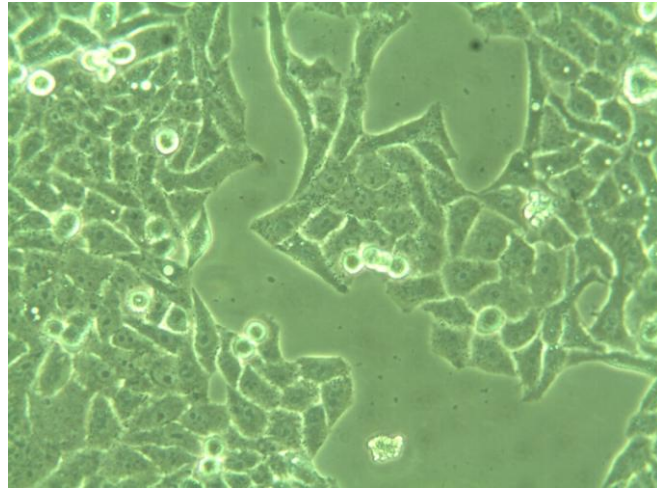
#### 3.3. HÜCRE HATLARI

*In vitro* sitotoksik aktivite potansiyelini belirlemek amacıyla deneylerimizde normal transforme hücre hattı olan Vero (Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı) ve kanser hücre hattı olan HeLa (1951 yılında insan serviks karsinomundan elde edilmiş epitel hücre hattı) hücreleri kullanıldı. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez pasajlarla sağlandı.





**Şekil 3.1:** Tek tabaka halinde çoğalma gösteren Vero hücrelerinin 3 günlük kültürü (Recep DEMİRĞAN'ın yüksek lisans tezinden alınmıştır).



**Şekil 3.2:** Tek tabaka halinde çoğalma gösteren HeLa hücrelerinin 3 günlük kültürü (Recep DEMİRĞAN'ın yüksek lisans tezinden alınmıştır).

### 3.3.1. Hücre Kültürlerinin Devamlılığının Sağlanması

Vero ve HeLa tam tabaka oluşturmuş hücrelerinin (monolayer), yeni kültür ortamına aktarılması (pasajı) için, öncelikle hücre tabakası Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile üç kez yıkandı ve Tripsin/EDTA enzim çözeltisi (kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS içerisinde hazırlanmış % 0.1 Tripsin ve % 0.04 EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik asit çözeltisi) ile 10-15 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine antibiyotik-antimikotik karışımı [penisilin (100 U/mL); streptomisin (100 µg/mL); amphoteresin B (0.25 µg/mL)] ve % 10 fetal bovine

serum (FBS) içeren taze Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) eklendi ve hücreler 1000 devir/dakikada, 5 dakika süreyle santrifüj edilerek toplandılar ve daha sonra taze EMEM ile yeniden süspanse edildiler. Hücreler hemositometrede sayılarak, yaklaşık  $1 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarıldılar. Daha sonra kültür kapları % 90'dan fazla bağıl nem ve % 5 CO<sub>2</sub> sağlayan 37 °C'lik etüve (Heraus B-5060 EK/CO<sub>2</sub>) kaldırıldılar. Aynı işlemler ortalama haftada iki kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlandı.

Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak saklandılar. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüjlenerek toplandılar. % 45 FBS, % 10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve % 45 EMEM içeren saklama ortamında yaklaşık  $1 \times 10^7$  hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları donduruldular (- 80 °C ve -196 °C).

### **3.4. EKSTRELERİN VERO VE HELA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

#### **3.4.1. Sitotoksisite Testi**

Sitotoksisite testlerinin en önemli uygulamalarından birisi bitki ekstralarının uygulandıkları hücre hattına toksik olmayan konsantrasyonun üst sınırının belirlenmesi amacıyla kullanılmasıdır (Praveena ve diğ., 2014). Bitki ekstralarının *in vitro* antikanser aktivitesini ortaya koymak amacı ile Vero ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini belirlemede Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT yöntemi ile ortaya koyduğumuz Vero hücreleri için toksik olmayan ekstre konsantrasyonları antioksidan ve antibakteriyel aktivite testlerinde temel parametre olarak kullanılmıştır.

#### **3.4.2. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi**

Deney gruplarının çoğalma hızları ve canlılıkları, hücre canlılığını tayin eden MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid] yöntemi (Mosmann, 1983; Karagöz ve Aslan, 2005; Mahadev ve diğ., 2015 ) ile tayin edildi. Bu yöntem, canlı hücrelerin MTT'yi mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile suda çözünmeyen mavi formazan kristalleri şekline çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO ile çözündürülerek canlılıkla doğru orantılı olarak oluşan rengin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçümü temeline dayanır.

Bu amaçla, 24 kuyucuklu kültür kaplarına  $1 \times 10^5$  hücre/mL'lik hücre (Vero ve HeLa) stoğundan 1 mL/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara değişik konsantrasyonlarda (1-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 72 saatlik inkübasyonundan sonra kuyulardaki MEM besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara (150  $\mu\text{L}$ /kuyu) MTT (DPBS içinde hazırlanmış 5  $\text{mg/mL}$ 'lik stok) eklendi ve 3-4 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda her kuyuya 750  $\mu\text{L}$  DMSO eklendi ve kültür kapları 15 dakika oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için karıştırıldı. Daha sonra oluşan renk 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Absorbsiyon değerlerinden kontrole göre karşılaştırılarak % cinsinden hücrelerin canlılığı aşağıdaki formüllere göre hesaplanarak belirlendi.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$$

$$\% \text{ İnhibisyon} = (1 - \text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$$

Ekstrelerin Vero ve HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkilerini ortaya koymak için hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten  $\text{IC}_{50}$  (Hücrelerin % 50'sinin ölümüne neden olan  $\mu\text{g/mL}$  cinsinden ekstre konsantrasyonu) değerleri belirlendi. Her iki hücre hattı için elde edilen  $\text{IC}_{50}$  dğerleri ile her bir metanolik bitki ekstresinin Seçicilik İndeksi (Selectivity Index;  $\text{SI} = \text{IC}_{50} \text{ Vero hücre} / \text{IC}_{50} \text{ HeLa hücre}$ ) değeri de belirlendi. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

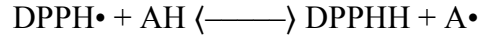
### 3.5. ANTIOKSİDAN AKTİVİTE

Toksik olmayan konsantrasyonlarına ve  $\text{IC}_{50}$  değerlerine göre 14 metanolik bitki ekstresinin antioksidan aktivite potansiyelleri 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürme, Ferrik tiyosiyanat (FTC) ve Tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.5.1. 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Yöntemi

DPPH molekülü, serbest elektronunun tüm molekülün üzerinde delokalizasyonu sebebiyle kararlı serbest bir radikaldır ve diğer çoğu serbest radikallerde olduğu gibi bu molekül de dimerleşmez. Elektron delokalizasyonu, etanol solüsyonunda koyu mor renk artışına sebep olarak 517 nm'de maksimum absorpsiyon göstermesine neden olur.

DPPH solüsyonu, H atomu verebilecek bir substrat ile karıştırıldığında aşağıda yer alan reaksiyon gerçekleşeceği için mor renk oluşumunun azalması gerçekleşir.



Serbest radikallerin test örnekleri tarafından süpürülmesini değerlendirebilmek için DPPH radikallerinin optik yoğunluğundaki değişimi gözlenerek antioksidan potansiyeli ortaya konulur. Bu amaçla, metanol ile sulandırılan ekstre içeren ve içermeyen 0.2 mL örneğe 2 mL metanolde hazırlanan DPPH (0.5 mM) eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika bekletildi. Ardından 517 nm'deki absorbansları ölçüldü ve aşağıdaki formül yardımı ile DPPH radikalinin süpürülmesi % cinsinden hesaplandı (Uddin ve Rauf, 2012; Proestos ve diğ., 2013; Sadeghi ve diğ., 2015).

$$\text{Süpürülen DPPH radikali (\%)} = (\text{A}_{\text{Kontrol}} - \text{A}_{\text{Örnek}}) / \text{A}_{\text{Kontrol}} \times 100$$

$\text{A}_{\text{Kontrol}}$ : Kontrol absorbansı

$\text{A}_{\text{Örnek}}$ : Örnek absorbansı

### 3.5.2. Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Yöntemi

Ferrik tiyosiyanat yöntemi lipid peroksidasyonun başlangıç aşamasındaki peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntemde *in vitro* koşullarda linoleik asit oksidasyonu oluşturulur ve oksidasyon sırasında  $\text{Fe}^{2+}$  iyonları  $\text{Fe}^{3+}$  iyonlarına yükseltgenir.  $\text{Fe}^{3+}$  iyonları ise amonyum tiyosiyanat ile reaksiyona girerek kırmızı renk oluşumuna neden olan ferrik tiyosiyanat molekülünü oluşturur. Belirli aralıklarla inkübasyondaki karışımdan örnek alınarak spektrofotometrik ölçüm ile peroksitlerin oluşumu takip edilir. Yüksek absorbans değeri yüksek peroksit konsantrasyonunu ifade eder (Sharipah ve diğ., 2009; Khalili ve diğ., 2013).

Bu amaçla, reaksiyon karışımı etanolde hazırlanan örneklerden (ekstreler ve standart antioksidanlar) 2 mL, etanol içinde hazırlanan % 2.51'lik linoleik asitten 2.052 mL, 0.02 M fosfat tamponundan (pH 7.0) 4 mL ve 1.948 mL saf su bir cam şişe içinde karıştırılarak hazırlandı. Reaksiyon karışımı çalkalayıcı etüvde 40 °C'de karanlıkta bekletildi. Deneyin başlangıcı 0. saat olarak kabul edilerek her 24 saatte bir 0.1 mL

reaksiyon karışımı deney tüpüne alındı ve üzerine 9.7 mL % 75'lik (v/v) etanol ardından 0.1 mL % 30'luk amonyum tiyosiyanat ve % 3.5'luk hidroklorik asitte hazırlanan 0.02 M 0.1 mL FeCl<sub>2</sub> eklendi. Reaksiyon karışımına FeCl<sub>2</sub> eklenmesinden 3 dakika sonra 500 nm'de ölçümü gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımına eklenen ekstrelerin konsantrasyonları Tablo 4.1'de verilen Vero hücrelerine karşı IC<sub>50</sub> değerler ve standart antioksidanlar için 100 µg/mL konsantrasyonu baz alınmıştır. Standart antioksidanlar pozitif kontrol olarak ve örnek olmayan karışım ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Linoleik asit peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol Maksimum Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Maksimum Absorbansı}} \times 100$$

### 3.5.3. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Yöntemi

Tiyobarbitürik asit yöntemi lipid peroksidasyonunun geç aşamasında peroksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan karbonil bileşiklerinin oluşumunun inhibisyonunu göstermek için kullanılır (Inatani ve diğ., 1983; Khalili ve diğ., 2013). FTC yöntemi için hazırlanan reaksiyon karışımlarından deney başlangıcının 7. gününde 2 mL örnekler alınarak üzerine 2 mL % 20'lik trikloroasetik asit ve 1 mL % 0.67'lik tiyobarbitürik asit eklendi. Bu karışım kaynayan su banyosunda 10 dakika bekletildi ve soğuduktan sonra 3000 devir/dakika'da 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatantın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Karbonil bileşiklerinin oluşumunun % inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

### 3.6. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE

Antibakteriyel aktivite çalışmaları İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu aktivitenin tayini için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI, 2012).

#### 3.6.1. Bakteriyel Suşların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bakteriler Tablo 3.1'de yer almaktadır. Bakterilerin üretiminde Mueller Hinton Broth (Oxoid) ve Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyerleri kullanılmıştır. Distile su kullanarak hazırlanan besiyerleri (pH 7.3±0.1) otoklavlanarak (15 dak., 121 °C) steril hale getirildi. Petri kutularına dökülen Mueller Hinton agara ekilen bakteriler 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

**Tablo 3.1:** Disk difüzyon yönteminde kullanılan bakteri suşları.

Standart Suşlar	
Gram (+)	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14153)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
	<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 13880)
	<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)
Çevresel Suşlar	
Gram (+)	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> F1	<i>Serratia marcescens</i> F4
<i>Staphylococcus aureus</i> F2	<i>Serratia marcescens</i> F5
<i>Staphylococcus aureus</i> F3	<i>Serratia marcescens</i> F6
	<i>Serratia marcescens</i> F7
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F9
	<i>Pseudomonas</i> spp. F10
	<i>Salmonella</i> spp. F11

#### 3.6.2. Disklerin Hazırlanması

Filtre kağıdından kesilen 6 mm çapında diskler otoklavda (121 °C, 20 dakika) steril edilmiştir. Diskler, Tablo 4.3'te yer alan sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki metanolik bitki ekstre çözeltilerinden emdirildikten sonra steril ortamda oda sıcaklığında kurutuldu. Karşılaştırma yapmak amacıyla standart antimikrobiyal ajanları

içeren hazır diskler (Ampicillin 10 µg, Cefotaxime 30 µg, Erythromycin 15 µg, Gentamicin 10 µg, Methicillin 10µg, Penicillin G 10 ünite, Polymyxin B 300 ünite, Vancomycin 30 µg) ticari olarak temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril distile su emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

### **3.6.3. Disk Difüzyon Yöntemi**

Disk difüzyon yöntemine göre önce her bir bakterinin Mueller Hinton Broth besiyeri içerisinde Mac Farland 0.5 standardına ( $1-4 \times 10^8$  CFU/mL) göre hazırlanan bakteri süspansiyonlarından, 100'er µL alınarak petri kutularında hazırlanan Mueller Hinton Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekimleri yapıldı. Sonra değişik konsantrasyonlarda bitki ekstraları emdirilmiş diskler ve ticari olarak temin edilmiş antibiyotik diskler petri kutularına yerleştirildi. Tüm petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra gözlenen inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülüp ekstraların antibakteriyel aktivite potansiyelleri standart antibakteriyel ajanlarla birlikte değerlendirildi. Her deney 3 tekrarlı yapıldı ve ortalama sonuçlar alındı.

### **3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER**

Deneylere ait tüm sayısal veriler kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel olarak GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 5.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla elde edilen verilere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları Dunnett's testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0,05$  seviyesi temel alındı.

## 4. BULGULAR

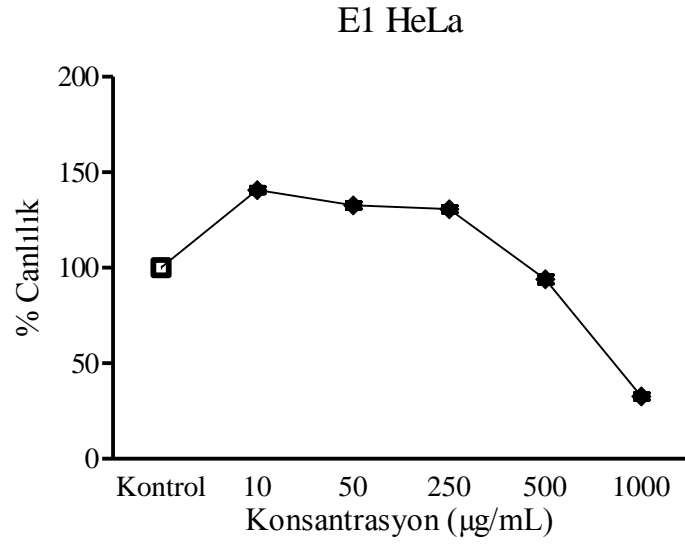
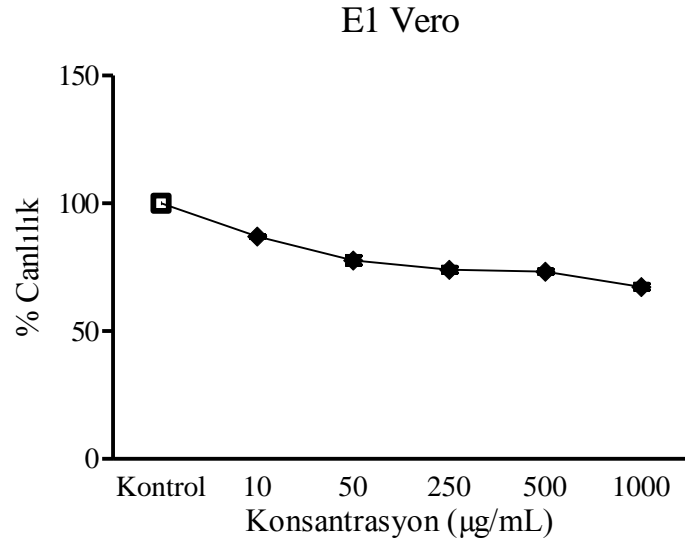
### 4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN *İN VİTRO* SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN MTT YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda 14 metanolik bitki ekstresinin ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyon değerlerine göre Vero ve HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerleri ortaya konulmuştur. Bileşiklerin seçicilik derecesi SI (Selectivity Index) değeri ile ifade edilmektedir. Yüksek SI değeri (>2) olan bileşikler kanser hücrelerine karşı seçici bir toksisite göstermektedir (Machana ve diğ., 2011; Awang ve diğ., 2014). 14 metanolik bitki ekstresinden 4'nün yüksek SI değerine sahip olduğu yaptığımız çalışma ile ortaya konulmuştur. SI değerleri sırasıyla *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss (endemik) için 227, *Rosa damascena* Miller için >3.8, *Cotinus coggygia* Scop. için >3.4 ve *Centaurea antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz (endemik) için >2.3'tür. Bu değerlere göre hazırlanan grafikler Şekil 4.1-14'te gösterilmektedir. Ayrıca her iki hücre hattı için elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerine ve SI değerlerine göre hazırlanan sonuçlar ise Tablo 4.1'de verilmektedir.

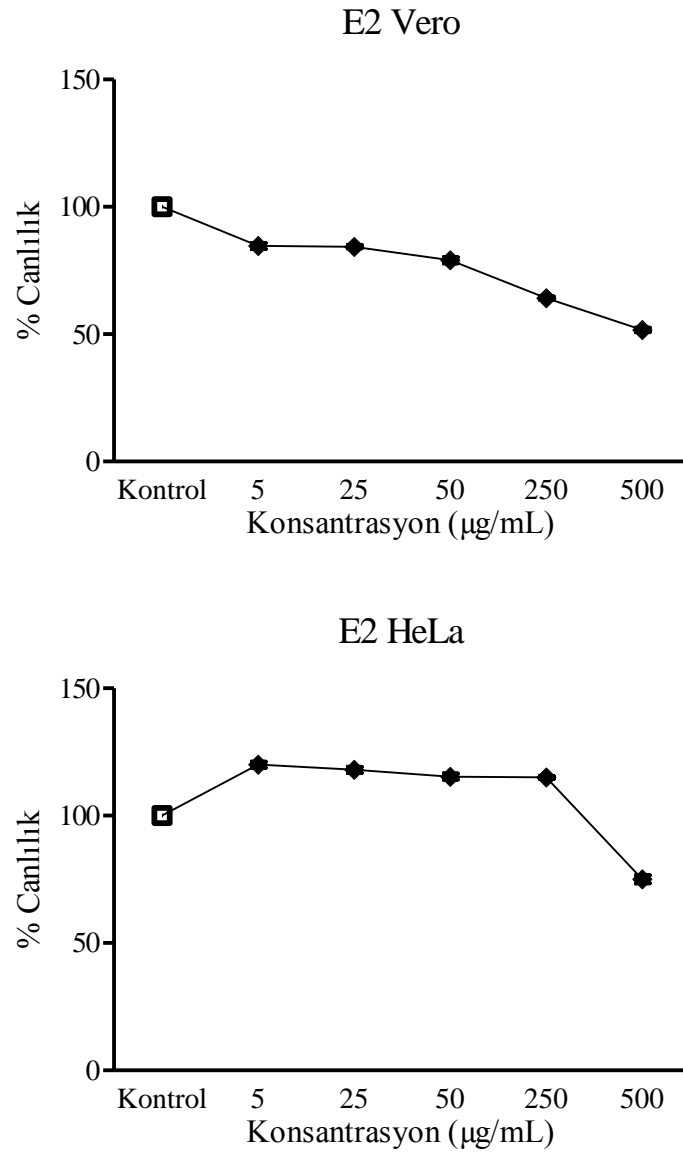
**Tablo 4.1:** Bitki ekstrelerinin IC<sub>50</sub> (µg/mL) ve SI değerleri.

Bitki ekstreleri	HeLa IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Vero IC <sub>50</sub> (µg/mL)	SI
E1	576±3.06	>1000	>1.7
E2	513±1.53	593±3.12	1.2
E3	253±0.764	194±1.04	0.8
E4	>1000	>1000	≥1
E5	>1000	>1000	≥1
E6	293±1.00	>1000	>3.4
E7	507±1.53	367±1.15	0.7
E8	980±3.01	>1000	>1
E9	759±1.53	426±1.76	0.6
E10	987±1.73	195±2.08	0.2
E11	>1000	>1000	≥1
E12	265±1.00	>1000	>3.8
E13	2±0.02	454±3.06	227
E14	427±3.06	>1000	>2.3

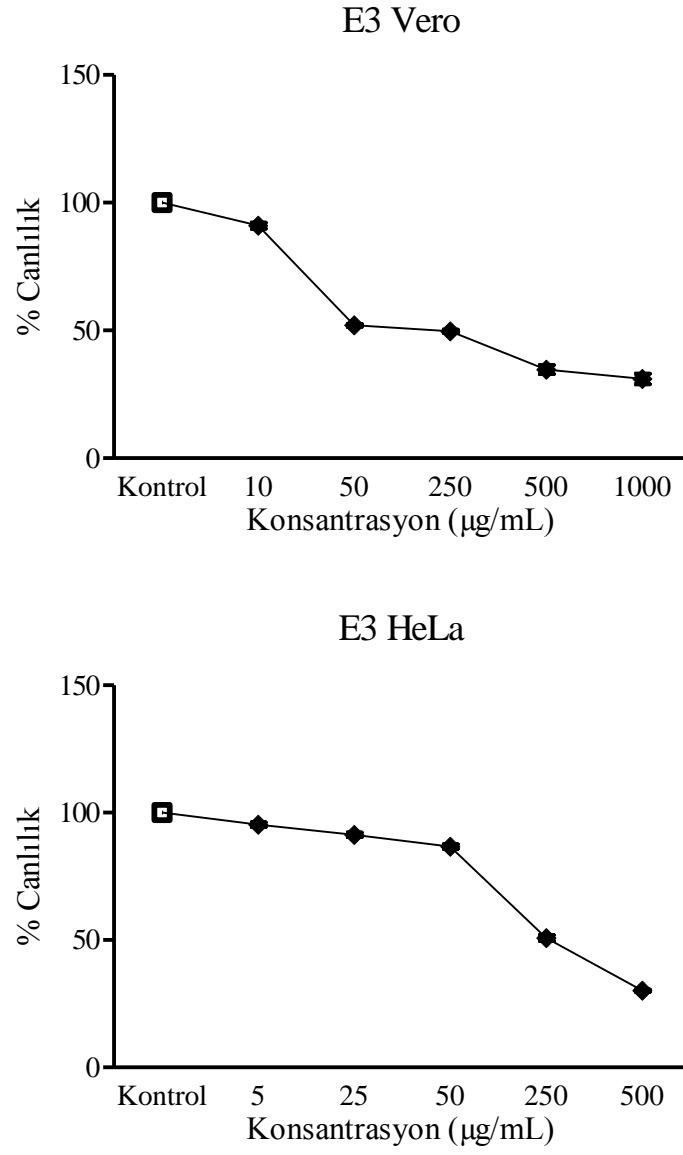




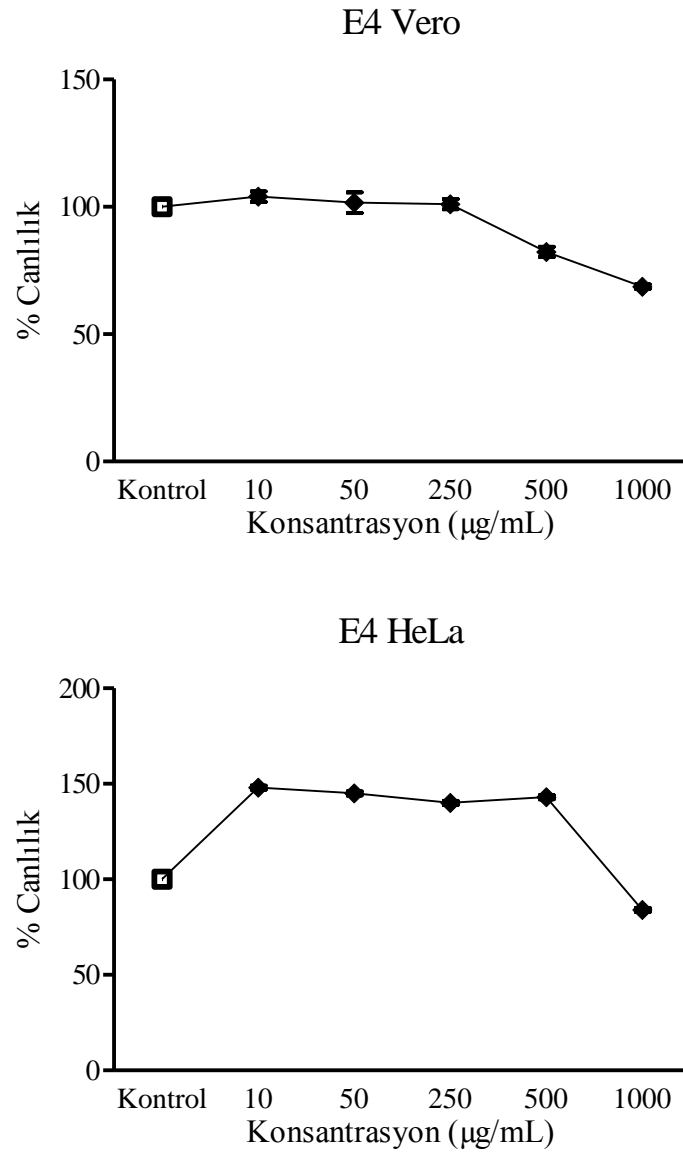
**Şekil 4.1:** *İn vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E1 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9867$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9956$ ).



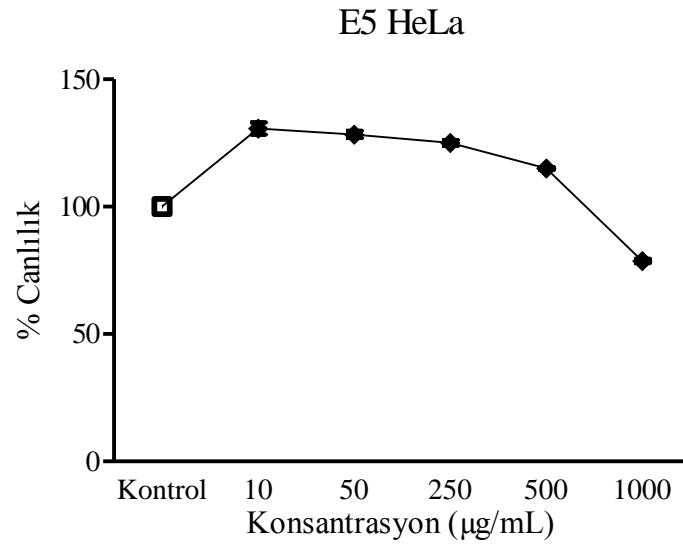
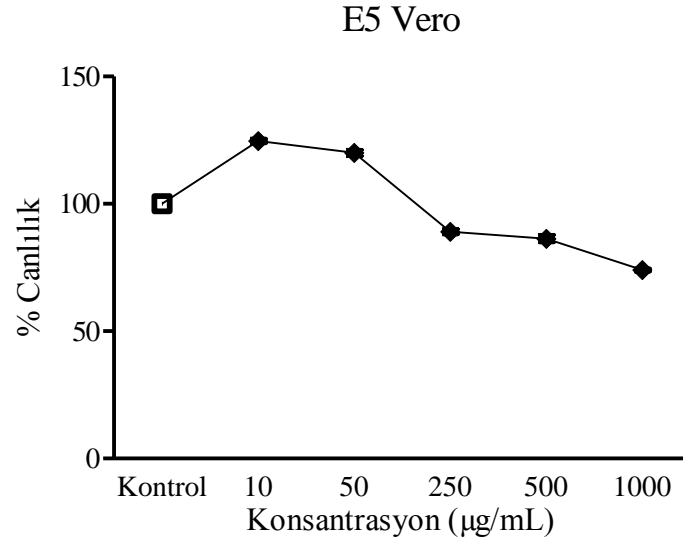
**Şekil 4.2:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E2 ekstrelerinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9954$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9913$ ).



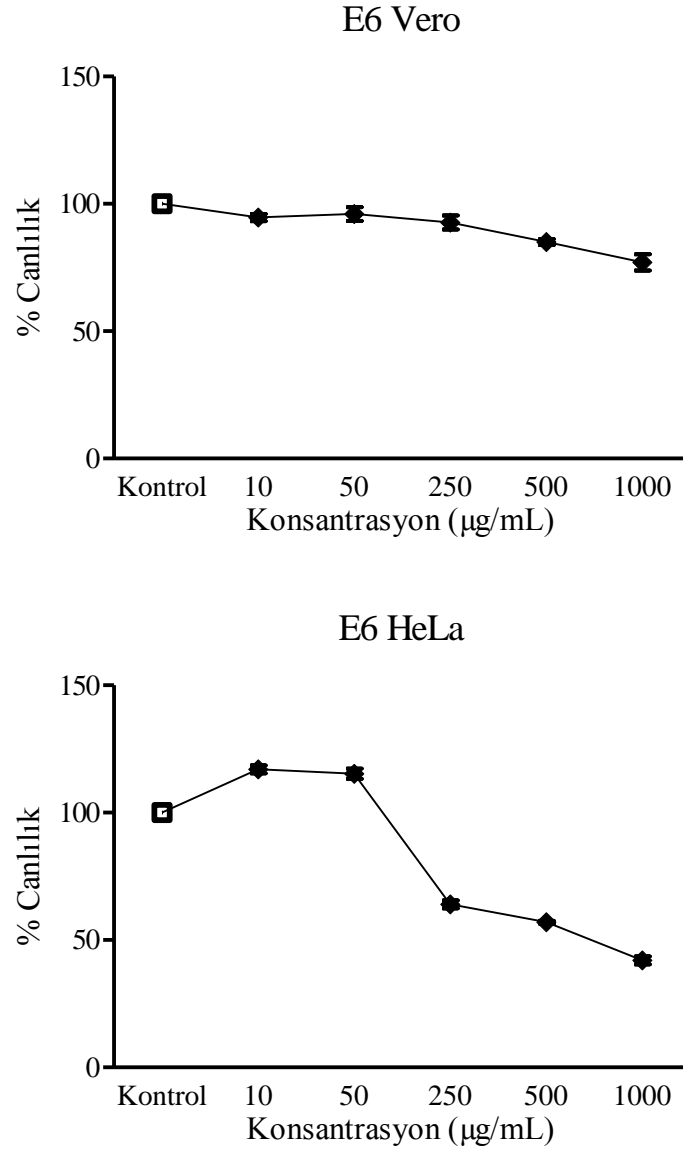
**Şekil 4.3:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E3 ekstrelerinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9966$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9984$ ).



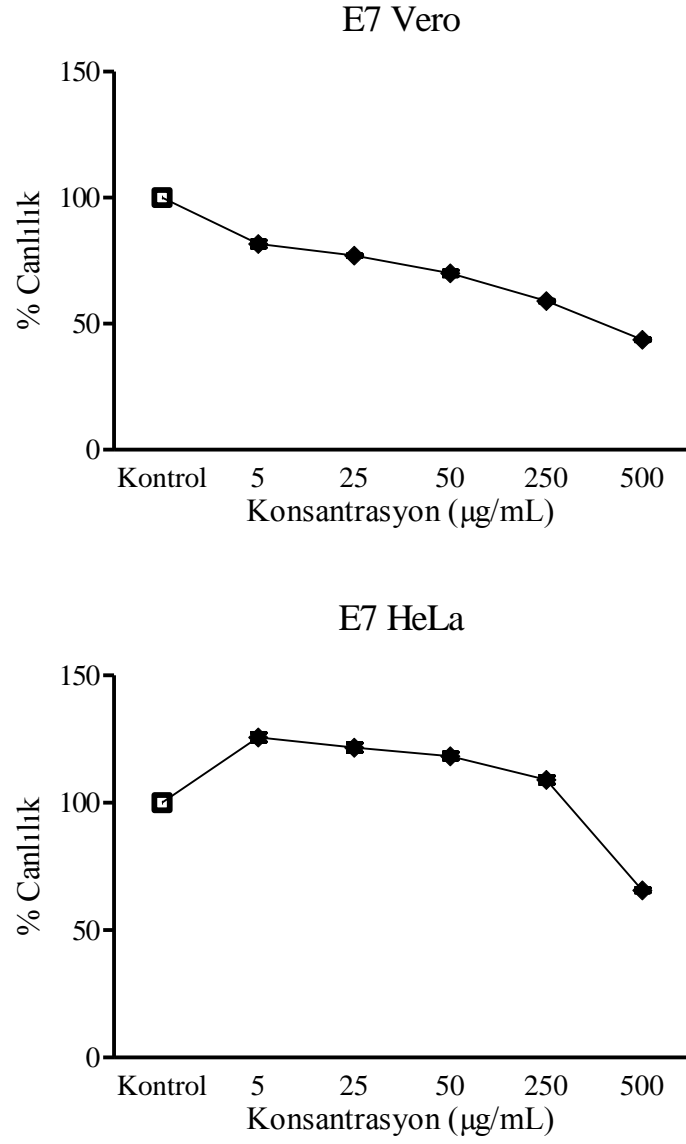
**Şekil 4.4:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E4 ekstrelerinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9469$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9970$ ).



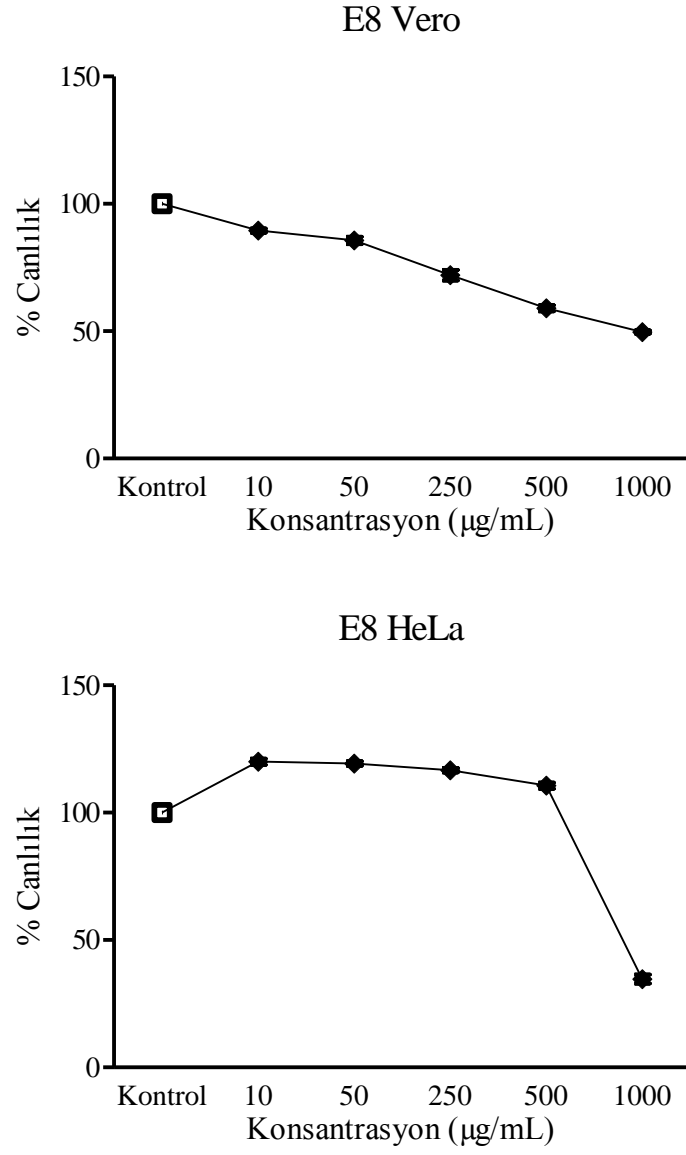
**Şekil 4.5:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E5 ekstrelerinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9944$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9909$ ).



**Şekil 4.6:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E6 ekstrelerinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,8828$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9958$ ).

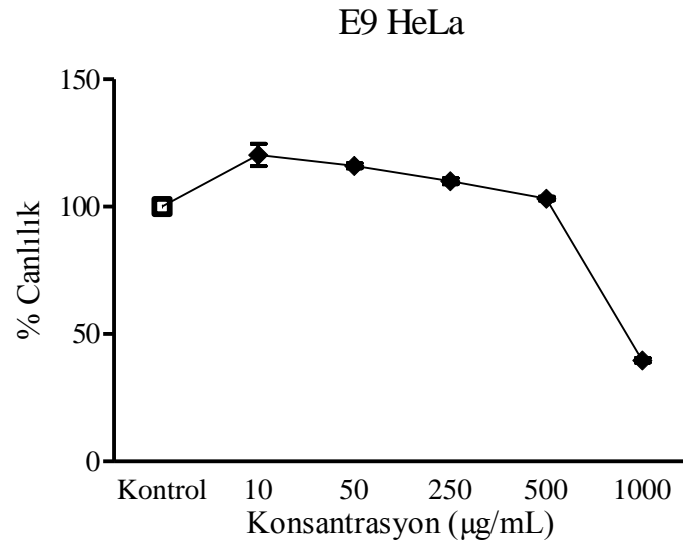
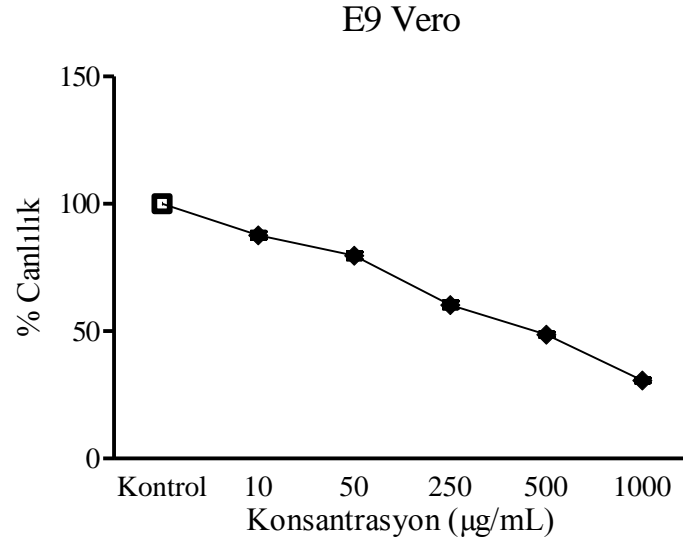


**Şekil 4.7:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E7 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9964$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9909$ ).

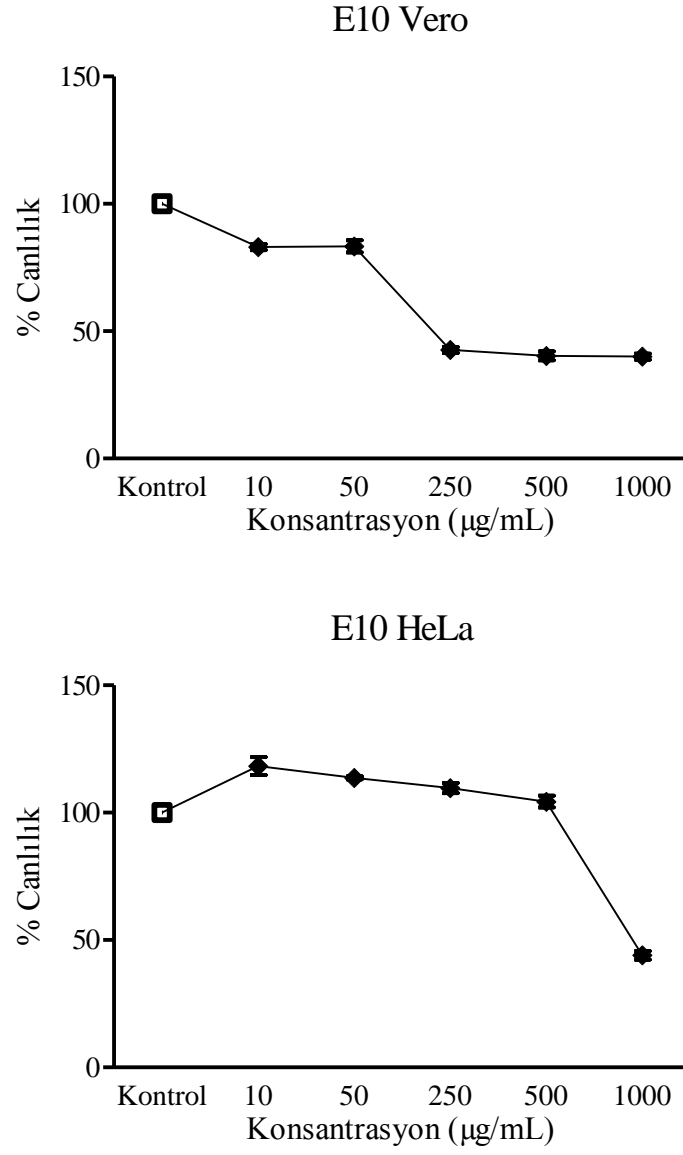


**Şekil 4.8:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E8 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9925$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9973$ ).

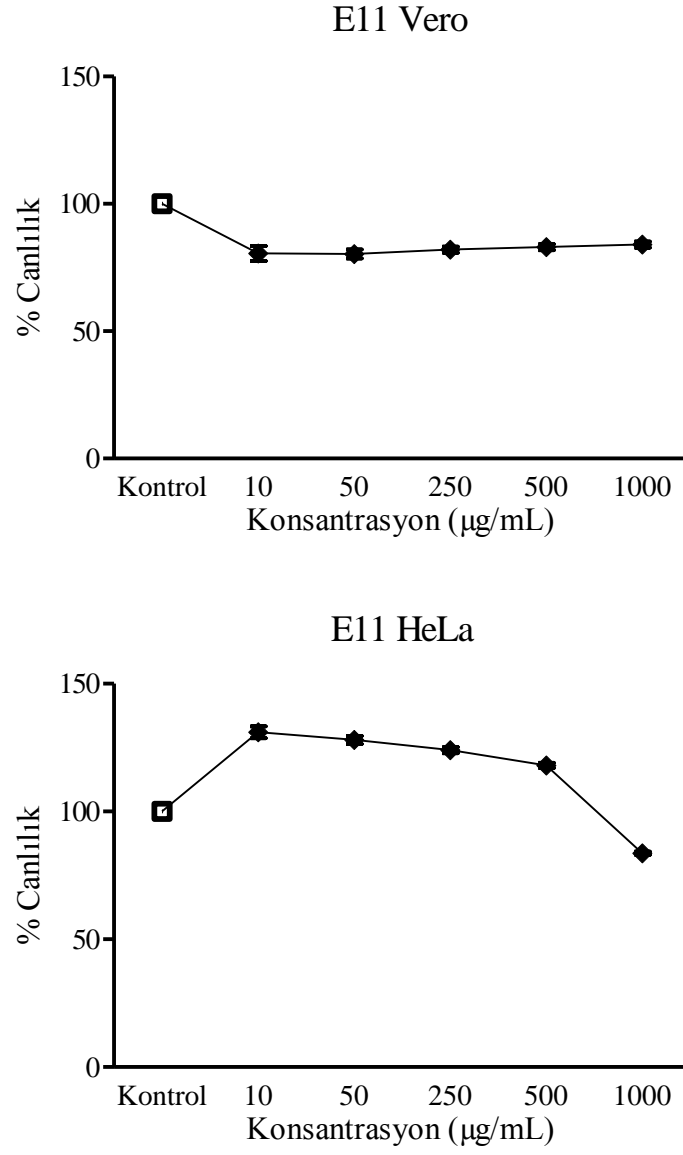




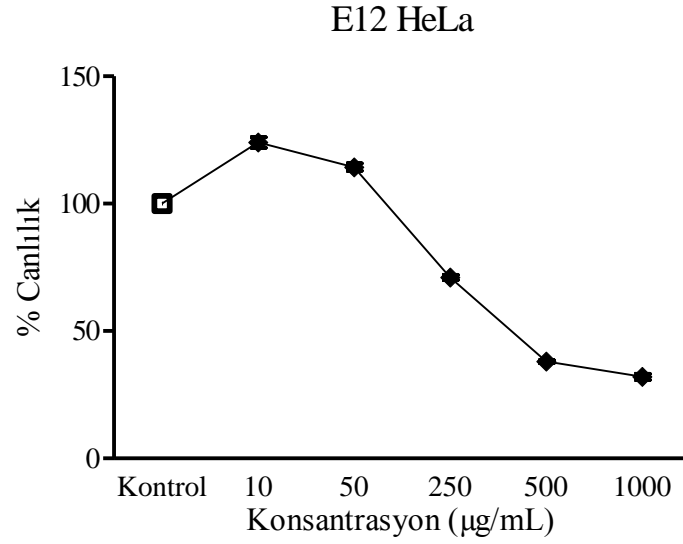
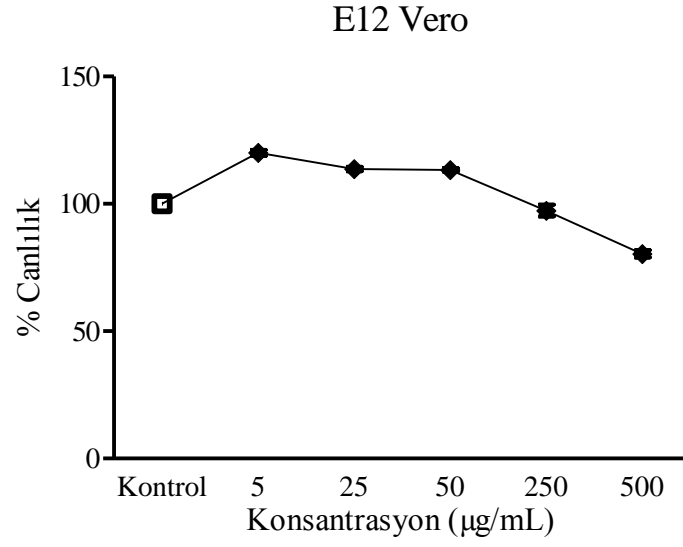
**Şekil 4.9:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E9 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9963$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9898$ ).



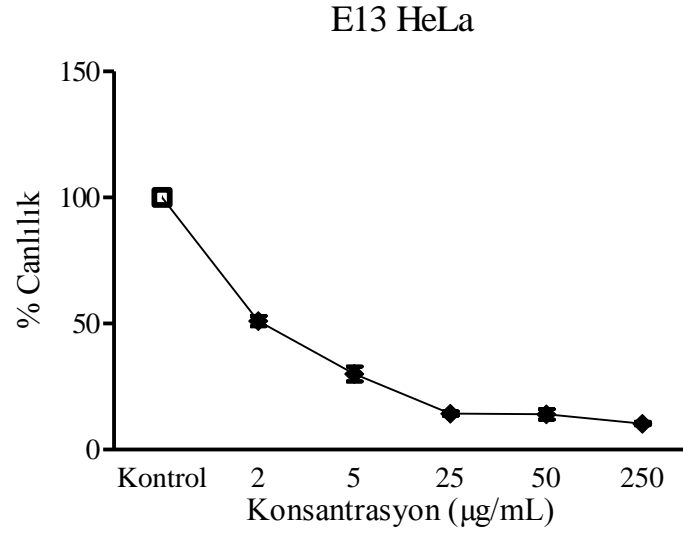
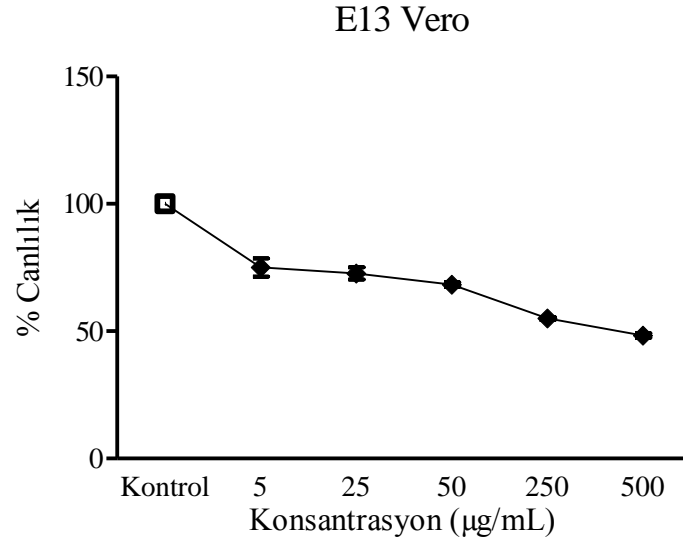
**Şekil 4.10:** *İn vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E10 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9945$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9866$ ).



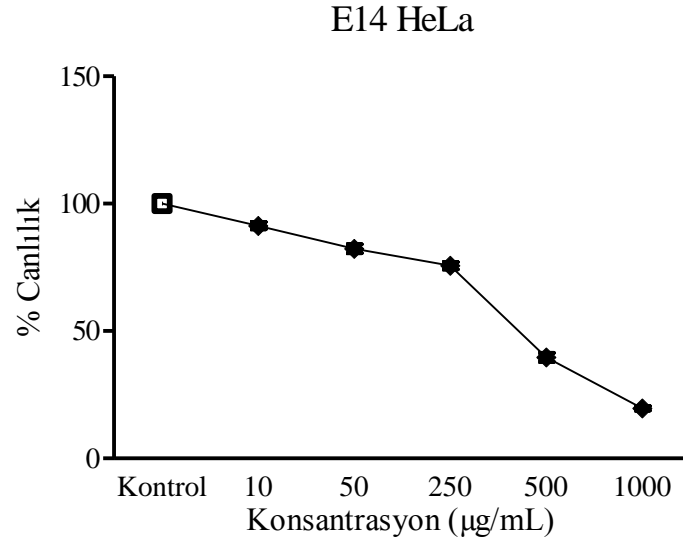
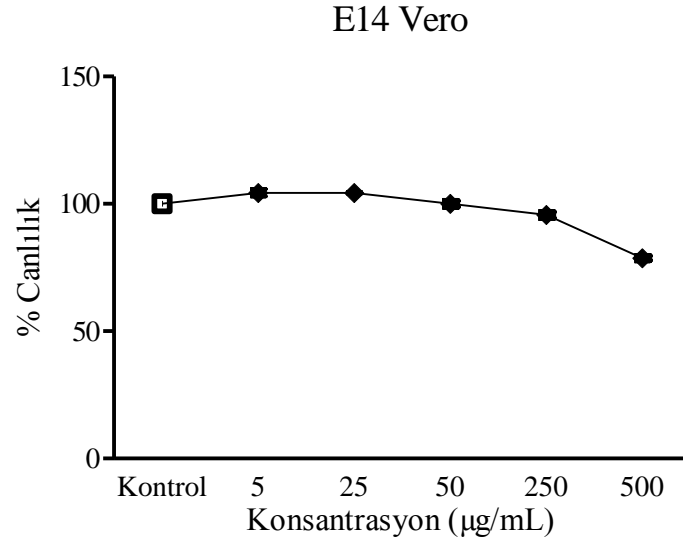
**Şekil 4.11:** *İn vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E11 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9380$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9891$ ).



**Şekil 4.12:** *İn vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E12 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9815$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9977$ ).



**Şekil 4.13:** *In vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E13 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9943$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9981$ ).



**Şekil 4.14:** *İn vitro* Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine E14 ekstresinin etkisi (Vero grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9747$ , HeLa grafiği için;  $P < 0.0001$ ,  $R^2: 0,9962$ ).

## 4.2. BİTKİ EKSTRELERİNİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### 4.2.1. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi ile Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

14 metanolik bitki ekstresinin toksik olmayan ve standart antioksidanların [E vitamini, BHA (butillenmiş hidroksianizol), Askorbik asit] ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyonlarına göre elde edilen % DPPH radikali süpürme aktivitesi sonuçları Tablo 4.2’de ve bu değerlere göre hazırlanan grafikler Şekil 4.15-18’de gösterilmektedir. *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey., *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L. ve *Rosa damascena* Miller bitkilerinin metanolik ekstrelerinin doğal bir antioksidan olan E vitamininden (% 72.01) daha yüksek (% 86.64-95.69) % DPPH radikali süpürme aktivitesi ile serbest radikal süpürme aktivitesine sahip oldukları ortaya konulmuştur. Diğer bitki ekstrelerinin standart antioksidanlarla kıyaslandığında anlamlı bir antioksidan aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir.

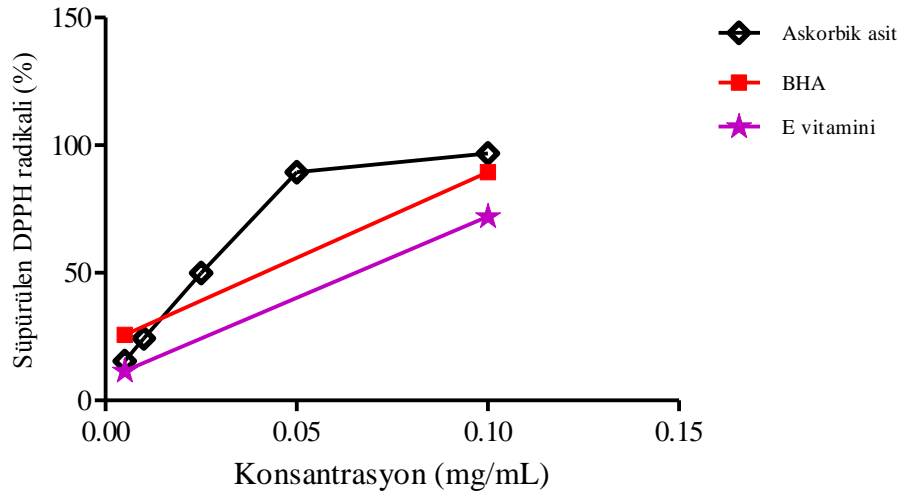
**Tablo 4.2:** Ekstrelerin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.

Ekstreler	Konsantrasyon (µg/mL)	Absorbans (517 nm)	Süpürülen DPPH radikali (%)
E1	500	0,111±0,0015	92,82±0,79
E2	50	0,783±0,001	15,53±4,2
E3	500	0,718±0,008	23,81±2,38
E4	500	0,323±0,018	71,84±9,02
E5	500	0,306±0,015	86,64±9,27
E6	500	0,082±0,002	95,69±0,17
E7	50	0,809±0,003	4,52±0,47
E8	250	0,756±0,005	13,5±1,90
E9	50	0,792±0,024	13,77±4,28
E10	50	0,756±0,016	10,8±0,01
E11	500	0,139±0,083	93,19±3,80
E12	500	0,085±0,002	95,67±0,68
E13	250	0,779±0,015	15,5±3,40
E14	500	0,693±0,007	26,7±3,88
BHA	100	0,122±0,0075	89,49±4,63
Vitamin E	100	0,223±0,011	72,01±5,85
Askorbik asit	100	0,075±0,001	96,78±0,24

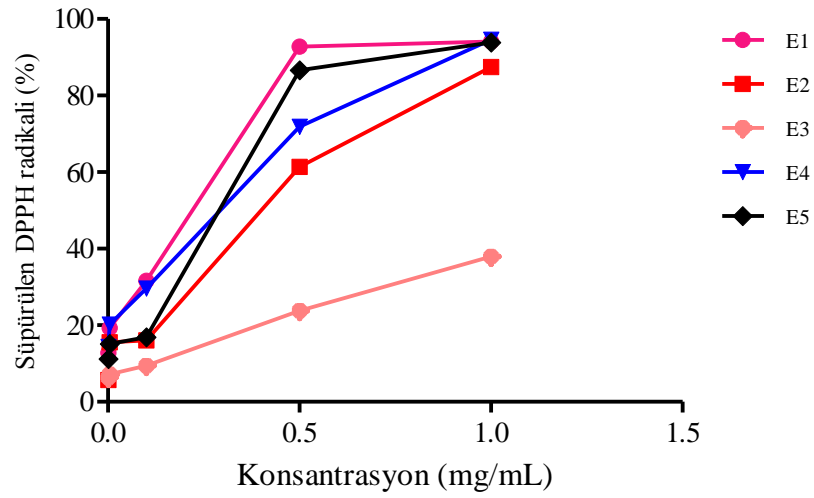
**Tablo 4.3:** Ekstrelerin Vero hücrelerine karşı sitotoksik olmayan konsantrasyonları.

<b>Bitkiler</b>	<b>Kod</b>	<b>Konsantrasyon (µg/mL)</b>
<i>Crataegus microphylla</i>	E1	500
<i>Teucrium sandrasicum</i>	E2	50
<i>Centaurea nerimaniae</i>	E3	500
<i>Olea europaea</i> L.	E4	500
<i>Salvia hypargeia</i>	E5	500
<i>Cotinus coggygria</i>	E6	500
<i>Hypericum kotschyianum</i>	E7	50
<i>Nepeta italica</i> L.	E8	250
<i>Stachys cretica</i> L. subsp. <i>vacillans</i>	E9	50
<i>Scorzonera tomentosa</i> L.	E10	50
<i>Origanum sipyleum</i> L.	E11	500
<i>Rosa damascena</i>	E12	500
<i>Colchicum sanguicolle</i>	E13	250
<i>Centaurea antiochia</i> Boiss. var. <i>praealta</i>	E14	500

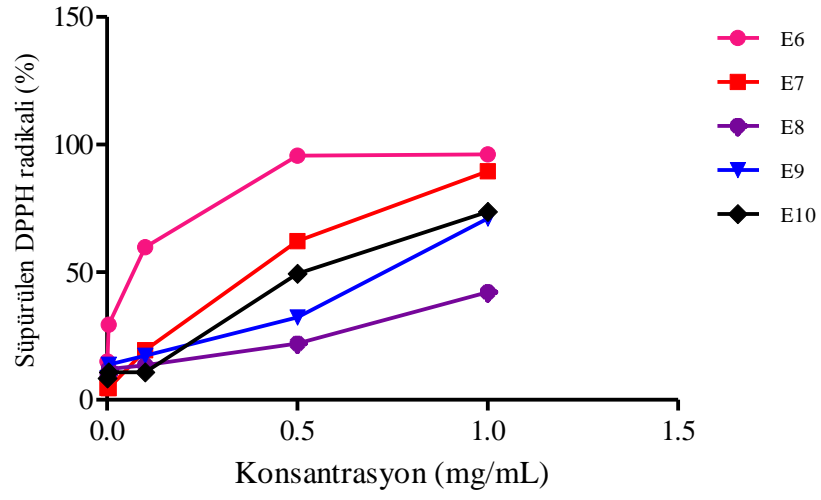




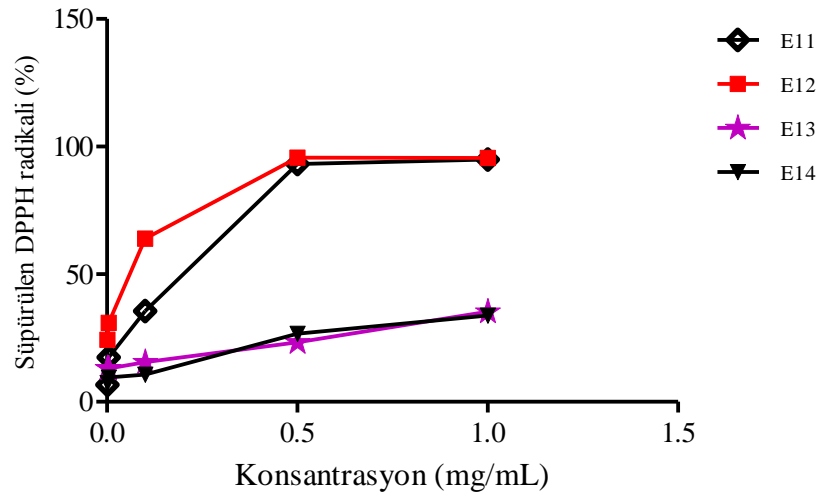
Şekil 4.15: Vitamin E, BHA ve Askorbik asit standartlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.



Şekil 4.16: E1-5 ekstrilerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.



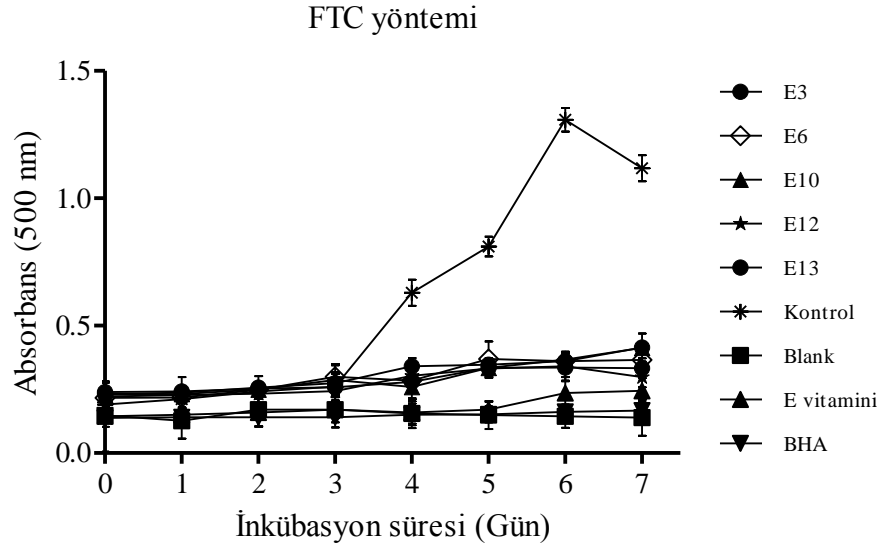
**Şekil 4.17:** E6-10 ekstrelerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.



**Şekil 4.18:** E11-14 ekstrelerinin DPPH radikalini süpürme aktiviteleri.

#### 4.2.2. Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

Ferrik tiyosiyanat yöntemi lipid peroksidasyonunun başlangıç aşamasındaki peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntemde antioksidan aktivitenin artmasıyla peroksit konsantrasyonunun azalması gerçekleşir (Emynur ve diğ., 2012; Khalili ve diğ., 2013). Deney sonucunu değerlendirdiğimizde hidroperoksit oluşumu 3. günde başlayıp 6. günde maksimum değere ulaşmıştır. Bu yöntemde 14 metanolik bitki ekstresinden 9 tanesi anlamlı antioksidan aktivite göstermemiştir. Şekil 4.19'da 5 aktif metanolik ekstrenin (E3, E6, E10, E12, E13) standart antioksidanlarla karşılaştırmalı olarak farklı zaman aralıklarındaki absorbansları yer almaktadır.

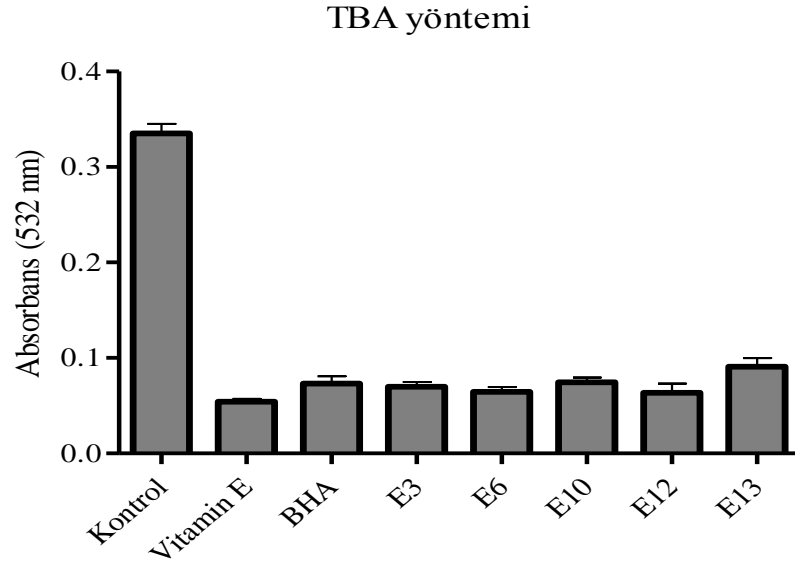


**Şekil 4.19:** Reaksiyon karışımına eklenen Tablo 4.1’de verilen IC<sub>50</sub> değerlerine göre hazırlanmış ekstrelerin ve 100 µg/mL konsantrasyondaki standart antioksidanların lipid peroksidasyonunun erken aşamasındaki hidroperoksit oluşumuna inhibe edici etkileri.

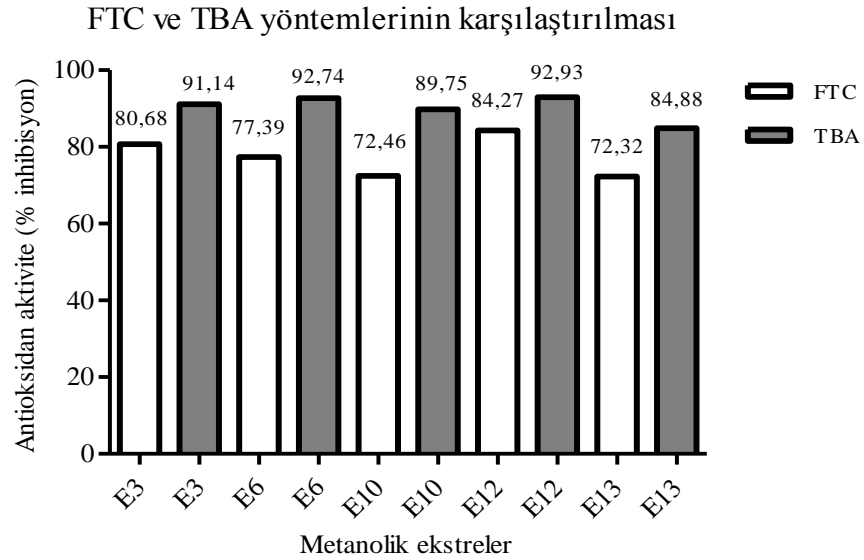
#### 4.2.3. Tiyobarbitürik Asit Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivitenin Değerlendirilmesi

Tiyobarbitürik asit yöntemi lipid peroksidasyonunun geç aşamasında hidroperoksitin indirgenmesi ile oluşan karbonil bileşiklerinin inhibisyonunu ortaya koymak için kullanılır. Bu yöntem ile deney başlangıcınının 7. gününde elde edilen veriler Şekil 4.20’de yer almaktadır. FTC yönteminde yüksek inhibisyon gösteren 5 bitki ekstresi

(E3, E6, E10, E12, E13) TBA yönteminde de yüksek inhibisyon göstermiştir. Bu ekstrelerin her iki yöntemle ortaya çıkan antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması Şekil 4.21’de yer almaktadır



**Şekil 4.20:** Reaksiyon karışımına eklenen Tablo 4.1’de verilen  $IC_{50}$  değerlerine göre hazırlanmış ekstrelerin ve 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyondaki standart antioksidanların deney başlangıcının 7. gününde karbonil bileşikleri oluşumuna etkileri.

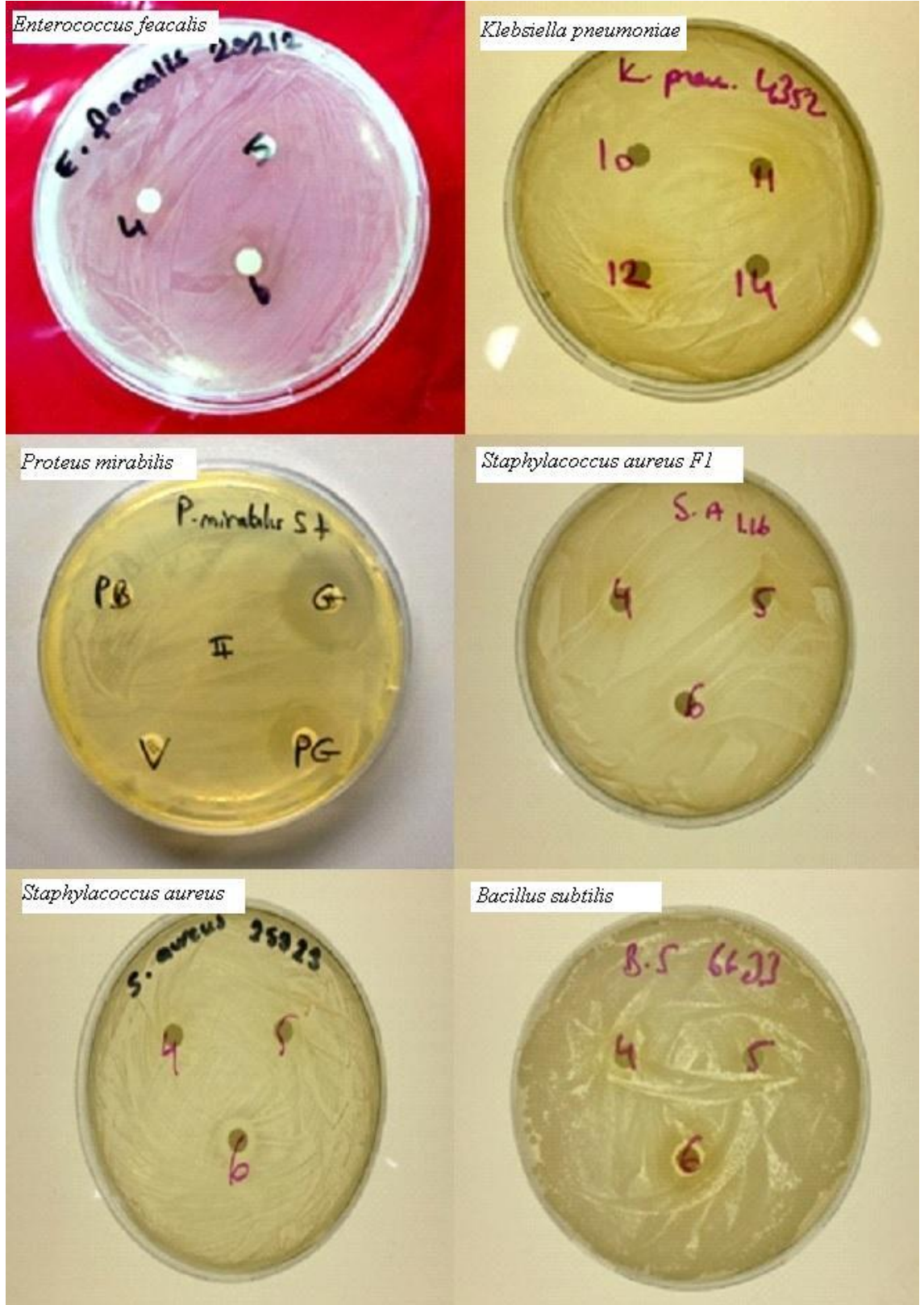


**Şekil 4.21:** 5 ekstrinin antioksidan aktivitelerinin FTC ve TBA yöntemleri ile karşılaştırılması.

Şekil 4.21’de ortaya çıkan sonuçlara göre aktif 5 ekstrenin özellikle FTC yöntemine kıyasla TBA yönteminde aktivitelere daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

#### **4.3. BİTKİ EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN DİSK DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bitki ekstrerelerinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik olmayan (Vero hücreleri için) konsantrasyonları kullanılarak antibakteriyel aktivite disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ekstrelerin ve standart antibiyotiklerin standart bakteriler ve çevresel bakteri suşları üzerine etkileri Tablo 4.4 ve 4.5’te ve antibakteriyel aktivitenin petriyelerdeki görünümü Şekil 4.22’de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre *Olea europaea* L. bitkisinin *Staphylococcus aureus* F1 çevresel suşuna, *Cotinus coggygia* bitkisinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* standart suşlarına ve *Staphylococcus aureus* F1, *Staphylococcus aureus* F2, *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşlarına ve *Rosa damascena* bitkisinin de *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşuna karşı farklı derecelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.22: Disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilen antibakteriyel aktivitenin petrilerdeki görünümü.

**Tablo 4.4:** Sitotoksik olmayan konsantrasyondaki ekstreler ve antibiyotiklerin standart bakteriler üzerine etkileri.

Ekstre ve antibiyotikler	Bakteriler ve İnhibisyon zonları (mm)								
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.marcescens</i> ATCC 13880	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	<i>S.enteritidis</i> ATCC 13076	<i>P.mirabilis</i> ATCC 14153	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 4352
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	11,33	-	-	9	9,33	8,33	11	10,67	-
E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin 10µg	34,33	-	-	22	37	28	27,33	27,67	13,67
Cefotaxime 30µg	33	10	29,33	35,33	40,33	15	29,67	38,67	45
Erythromycin 15µg	28,33	-	12	-	35,33	20	11,67	-	25,33
Gentamicin 10µg	24,33	24,33	22,33	25	32,67	16,33	23,67	24,33	23
Methicillin 10µg	29	-	-	-	37,33	10	-	-	11,67
Penicillin G 10 ünite	41	-	-	-	36,67	16	12,67	22,33	10
Polymyxin B 300 ünite	10,67	18,33	16,33	16,67	15,33	-	15,33	-	16,33
Vancomycin 30 µg	19,67	-	-	-	28	20	-	-	-
Negatif kontrol (H <sub>2</sub> O)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-“: inhibisyon zonu yok.

**Tablo 4.5:** Sitotoksik olmayan konsantrasyondaki ekstreler ve antibiyotiklerin çevresel bakteri suşları üzerine etkileri.

Ekstre ve antibiyotikler	Bakteriler ve İnhibisyon zonları (mm)										
	<i>S. aureus</i> F1	<i>S. aureus</i> F2	<i>S. aureus</i> F3	<i>Serratia marcescens</i> F4	<i>Serratia marcescens</i> F5	<i>Serratia marcescens</i> F6	<i>Serratia marcescens</i> F7	<i>P. aeruginosa</i> F8	<i>P. aeruginosa</i> F9	<i>P. spp.</i> F10	<i>Salmonella</i> spp. F11
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	10,7	9	10,7	-	-	-	-	-	-	-	-
E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	-	-	8,67	-	-	-	-	-	-	-	-
E13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin 10µg	22,7	37,7	16,3	-	12	-	22	13	-	-	26,7
Cefotaxime 30µg	40	31,7	29,3	30,3	37,67	36	34,33	28	21,33	9,67	34
Erythromycin 15µg	35	27,7	30	13,7	10,67	15	14,67	10	-	-	9
Gentamicin 10µg	29	21	21,7	22,3	22	29,33	23	19	20,67	22,33	24
Methicillin 10µg	24,7	28	25,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin G 10 ünite	21,3	41	16,3	-	-	-	-	-	-	-	13
Polymyxin B 300 ünite	14	-	-	11	16,67	15,33	12,67	15	17	16,33	16,7
Vancomycin 30 µg	20,3	19,7	19,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Negatif kontrol (H <sub>2</sub> O)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“-“ : inhibisyon zonu yok.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ham bitki ekstralarının biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesinin en temel yaklaşımı ilaç olarak doğrudan kullanım için biyoaktif ajanlarının izolasyonu ya da sentetik ve/veya yarı sentetik ilaçların hazırlanmasında model olarak kullanılacak biyoaktif bileşiklerin ortaya konulmasıdır (Svejda ve diğ., 2010).

Tedavi amaçlı kullanılan ilaçların yaklaşık % 50'si bitkisel kaynaklıdır. Bitkilerin biyolojik olarak aktif moleküllerin zengin kaynakları olmalarına rağmen şimdiye kadar sadece çok az bir kısmının biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Etkin biyoaktif ajanlara olan gereksinim nedeniyle, etnobotanik yaklaşıma dayalı olarak bitkilerin fitokimyasal ve biyoaktivite özelliklerine yönelik araştırmalar da hız kazanmıştır (Elhardallou, 2011). Çeşitli bitkisel ürünler insanlık tarihi boyunca kullanıldığından genellikle düşük riskli olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte, bitkilerden elde edilen çeşitli ekstralar veya saf bileşiklerin bazıları insanlar için toksik de olabilmektedir. Bu nedenle, çeşitli *in vitro* ve *in vivo* tarama testleri ile bitkisel ürünlerin hem faydalı hem de toksik etkilerinin ortaya konulması oldukça önemlidir (Sieniawska ve diğ., 2013).

Çalışmamızda 14 metanolik bitki ekstresinin ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyon değerlerine göre Vero ve HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerleri ortaya konulmuştur. Biyoaktif bileşiklerin seçicilik derecesi SI (Selectivity Index) değeri ile ifade edilmektedir. Yüksek SI değeri (>2) olan bileşikler kanser hücrelerine karşı seçici bir toksisite göstermektedir (Machana ve diğ., 2011; Awang ve diğ., 2014). Çalışmamızda kullanılan bitki ekstraları, Vero ve HeLa hücre hatları için elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri ve SI değerleri Tablo 4.1'de verilmektedir. 14 metanolik bitki ekstresinin normal hücre hattı Vero ve kanser hücre hattı HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinden (IC<sub>50</sub>) ortaya çıkan SI değerleri karşılaştırıldığında özellikle ikisi endemik olan dört bitki ekstresinin yüksek SI değerine sahip olduğu ortaya konulmuştur (*Colchicum sanguicolle* K.M. Perss (endemik) için SI = 227, *Rosa damascena* Miller için SI = >3.8, *Cotinus coggygria* Scop. için SI = >3.4 ve *Centaurea antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal) Wagenitz (endemik) için SI = >2.3'tür).

Şu ana kadar doğal kaynaklardan bazı antikanser ilaçlar keşfedilmiş olup günümüzde ise doğal kaynaklardan yeni ve daha etkin antikanser ajanları ortaya koymak için yoğun bir çaba sarf edilmektedir. Geleneksel kemoterapötik ilaçların toksik yan etkileri ve sınırlı etkinlikleri göz önüne alındığında ortaya konulacak yeni ve etkin doğal ajanlar kanser tedavisinde oldukça önemli bir rol oynayacaktır (Yaacob ve diğ., 2010).

Daha önce yapılan bir çalışmada, bir antikanser ajanı olan Aktinomisin D'nin IC<sub>50</sub> değeri HeLa hücreleri için  $0.002 \pm 0.0000395$  µg/mL ve Vero hücreleri için  $0.027 \pm 0.00021$  µg/mL olarak bulunmuş ve SI değeri 13.5 olarak ortaya konulmuştur (Berrington ve Lall, 2012). Çalışmamızda, ön plana çıkan dört aktif bitki ekstresinden özellikle endemik bir tür olan *Colchicum sanguicolle* bitkisinden elde edilen metanolik ekstrenin IC<sub>50</sub> değerleri HeLa hücreleri için  $2 \pm 0.02$  µg/mL ve Vero hücreleri için  $454 \pm 3.06$  µg/mL ve SI değeri de 227 olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç, antikanser ajan olan Aktinomisin D (SI = 13.5) ile kıyaslandığında *Colchicum sanguicolle* bitkisinin ümit verici bir antikanser ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Endemik olan bu tür ile ilgi yapılan literatür taramalarında herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasının ortaya konulmamış olması ve ilk defa *in vitro* antikanser aktivitesinin yaptığımız çalışma ile ortaya konulması çalışmamızın en dikkat çekici yönünü oluşturmaktadır. Buna ek olarak, *Colchicum sanguicolle* bitkisi ile ilgi yapılan literatür taramalarında bitkiye ait herhangi bir kimyasal bileşen analizi çalışmasına da rastlanılmamıştır. Çalışmamızda ortaya çıkan sonuca bağlı olarak, başka *in vitro* ve *in vivo* biyolojik aktivite taramalarına, antikanser aktiviteden ve diğer muhtemel biyolojik aktiviteden sorumlu bileşiklerin izolasyonunun ve saflaştırılmasının yapılacağı detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda, oksidatif strese karşı koruyucu olabilecek doğal maddelerin tanımlanması için oldukça fazla çaba sarf edilmektedir. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin üretilmesinin inhibisyonu, doğrudan ya da dolaylı serbest radikallerin süpürülmesi ve hücre içi redoks potansiyelinin değiştirilmesini de içeren oldukça geniş biyokimyasal aktivitelere sahiptir. Antioksidan, hedef moleküldeki oksidatif hasarı ortadan kaldıran, önleyen ya da geciktiren herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır (Lakshmi ve diğ., 2015). Antioksidanlar sıklıkla serbest radikalleri hücrelerdeki hedeflerine saldırmadan önce durdurmakta ya da stabilize etmektedirler (Nunes ve diğ., 2012). İnsanlarda nörodejenerasyon, immünosüpresyon, yaşlanma, aterosklerozis ve diyabet gibi çok

sayıda akut ve kronik hastalıkların patolojisinin serbest radikallerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Ko EY ve diğ., 2015). Meyve, sebze, baharat ve çeşitli tıbbi bitkilerde fenolikler, flavonoidler, taninler ve proantosiyaninler gibi antioksidan metabolitlerin varlığı yapılan çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuştur (Gulcin, 2012).

Çok sayıda hastalık ve rahatsızlıkların sebebi olarak reaktif oksijen türlerinin ve diğer oksidanların önemli rol oynadıklarının ortaya konulması, bilim insanlarının hastalıkların önlenmesi, tedavi edilmesi ve insan sağlığının korunması için antioksidanların ne kadar önemli olduğu gerçeğine giderek daha fazla ilgi göstermelerine neden olmuştur (Hossain ve diğ., 2015). Düşük *in vitro* antioksidan aktiviteye sahip olan maddelerin *in vivo* olarak da düşük antioksidan aktivite göstereceği beklendiğinden dolayı maddelerin hızlı taranmasına olanak sağlayan *in vitro* antioksidan aktivitenin ortaya konulması için bazı yöntemler etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Nunes ve diğ., 2012). Bu yöntemlerden biri olan DPPH radikal süpürme yöntemi, saf bileşiklerin ve bitkisel ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan en eski ve yaygın yöntemlerden birisidir. Araştırılan antioksidanların DPPH radikalini süpürme aktiviteleri, hidrojen atomu ya da elektron donörü gibi davranan bileşiklerin varlığına işaret etmektedir (Skotti ve diğ., 2014). Bu yöntem, bir antioksidanla reaksiyonu sonucunda DPPH radikalinin tüketilmesinin spektroskopik olarak ölçümü temeline dayanır. DPPH molekülünün yapısındaki 3 aromatik halkanın varlığı bu molekülü oldukça kararlı kılmaktadır. DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir. DPPH radikalini süpürebilen doğal ve sentetik her madde bu dalga boyundaki absorpsiyonu düşürmektedir. Bu nedenle, DPPH radikalini süpürme yöntemi örneklerin serbest radikallerin inhibisyonundaki etkilerinin değerlendirilmesi için etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Fadda ve diğ., 2014).

14 metanolik bitki ekstresinin Vero hücreleri için toksik olmayan konsantrasyonları ve doğal ve sentetik antioksidan ajanların (E vitamini, Askorbik asit, BHA) ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyonlarına göre elde edilen % DPPH radikal süpürme aktivitesi sonuçları Tablo 4.2'de ve bu değerlere göre hazırlanan grafikler Şekil 4.15-18'de gösterilmektedir. Tablodan ortaya çıkan sonuca göre *Crataegus microphylla* C. Koch, *Salvia hypargeia* Fisch.& Mey. (endemik), *Cotinus coggygria* Scop., *Origanum sipyleum* L. (endemik) ve *Rosa damascena* Miller bitkilerinin metanolik ekstraktlarının doğal bir antioksidan ajan olan E vitamininden (% 72.01) daha yüksek (% 86.64- 95.69)

% DPPH radikal süpürme aktivitesi ile serbest radikal süpürme aktivitelerine sahip oldukları ortaya konulmuştur. Diğer bitki ekstralarının standart antioksidanlarla kıyaslandığında anlamlı bir antioksidan aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Ayrıca, *Crataegus microphylla* C. Koch, *Cotinus coggygia* Scop., *Origanum sipyleum* L. (endemik) ve *Rosa damascena* Miller bitkilerinin metanolik ekstralarının sentetik bir antioksidan ajan olan BHA'dan (% 89.49) daha yüksek (% 92.82-95.69) % DPPH radikal süpürme aktivitesi ile serbest radikal süpürme aktivitelerine sahip oldukları ortaya konulmuştur.

Doymamış bir yağ asiti olan linoleik asit oksidanların varlığında kolayca peroksidede olabilmekte, epoksitler ve aldehitler gibi çeşitli bileşiklere dönüşebilmektedir. Bu bileşiklerin absorbansının ölçülmesi ile peroksidasyon seviyesinin belirlenmesi mümkündür. Eğer bir bileşik lipid peroksidasyonunu inhibe ediyorsa spesifik bir dalga boyunda absorbans düşer. Lipid peroksidasyonu doğal ya da sentetik antioksidan maddelerin varlığı ile engellenebilir (Motamed ve diğ., 2014). Ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemi lipid peroksidasyonunun erken aşamasında linoleik asitten oluşan hidroperoksitlerin miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu yöntemde antioksidan aktivite arttıkça oluşan peroksit konsantrasyonu azalır (Emynur ve diğ., 2012; Khalili ve diğ., 2013).

FTC yöntemi sonuçlarına göre 9 bitki ekstresinin anlamlı bir antioksidan aktivite sergilemediği, 5 bitki ekstresinin ise standart antioksidan ajanlarla karşılaştırıldığında anlamlı bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. Şekil 4.19'da aktif olan *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemik), *Cotinus coggygia* Scop., *Scorzonera tomentosa* L. (endemik), *Rosa damascena* Miller ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss.(endemik) metanolik bitki ekstralarının standart antioksidanlarla karşılaştırmalı olarak farklı zaman aralıklarındaki absorbansları yer almaktadır. Hidroperoksit oluşumu 3. günde başlayıp 6. günde maksimuma ulaşmaktadır.

Tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi lipid peroksidasyonunun geç aşamasında hidroperoksitin indirgenmesi ile oluşan karbonil bileşiklerinin inhibisyonunu ortaya koymak için kullanılır. Bu yöntem ile deney başlangıcının 7. gününde elde edilen veriler Şekil 4.20'de gösterilmektedir. FTC yönteminde yüksek inhibisyon gösteren 5 bitki ekstresi [*Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür (endemik), *Cotinus coggygia* Scop.,

*Scorzonera tomentosa* L. (endemik), *Rosa damascena* Miller ve *Colchicum sanguicolle* K.M. Perss.(endemik)] TBA yönteminde de yüksek inhibisyon göstermiştir.

Bu ekstrelerin her iki yöntemle ortaya çıkan antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması Şekil 4.21’de yer almaktadır ve ortaya çıkan sonuçlara göre aktif 5 ekstrenin özellikle FTC yöntemine kıyasla TBA yönteminde antioksidan aktivitelerinin daha yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bitkilerde, antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümöral aktiviteler de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteden fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin sorumlu olduklarını ve özellikle bu bileşiklerin varlığı ile antioksidan aktivite arasında korelasyon olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Santharam ve diğ., 2012; Skotti ve diğ., 2014; Hossain ve diğ., 2015; Khaliq ve diğ., 2015). Çalışmamızda, antioksidan aktivite gösteren bitkilerin önemli oranda fenolik bileşik ve flavonoid içerdikleri fitokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuş olup bulgularımızla örtüşmektedir.

Bazı sentetik antioksidanların (BHA, BHT, butillenmiş hidrokinon ve gallik asit esterleri) yüksek konsantrasyonlarının doğal antioksidanlara göre mutajenik ve tümörojenik aktivitelere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Hossain ve diğ., 2015; Ko EY ve diğ., 2015). Diğer taraftan, doğal antioksidan ajanların yüksek konsantrasyonlarda dahi kendilerinin ve parçalanma ürünlerinin toksik etkilerinin olmaması doğal antioksidanlara ilgi duyulmasının en önemli sebebini oluşturmaktadır. Özellikle başta bitki fenolik bileşiklerinin etkin kimyasal profilaktif ajan olarak değerlendirilmesi bu bileşiklere sahip bitkileri mevcut sentetik antioksidanlara alternatif haline getirmiştir (Das ve diğ., 2013; Santharam ve diğ., 2015). Çalışmamızda önemli bir kısmı fenolik bileşiklerce zengin olan bitkilerin, özellikle sentetik antioksidan olan BHA’dan daha yüksek antioksidan potansiyeline sahip olması bu bitkilerin güçlü ve güvenilir antioksidan ajanların önemli bir kaynağı olarak değerlendirilebileceği düşüncesini ortaya koymaktadır. Ayrıca, antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstralarının sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda bu aktiviteyi göstermeleri çalışmamızın özgünlüğü ve önemi olarak ortaya çıkmaktadır.

Dünyanın farklı yerlerindeki araştırmacılar bitki ekstralarını sahip oldukları antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivitelerinden dolayı etkin bir şekilde kullanmaktadır. 500.000

bitki türünün medikal özelliklere sahip olduğu rapor edilmekle birlikte, geleneksel tedavide kullanılan bitkilerin büyük bir kısmı detaylı olarak araştırılmamıştır. Bitkilerden elde edilen antimikrobiyal bileşikler mevcut antibiyotiklerden daha farklı mekanizmalar ile mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe edebilmektedir. Bu nedenle, bitkilerden elde edilen antimikrobiyallar dirençli mikrobiyal suşların tedavisinde oldukça önemli bir klinik değere sahiptir ( Bakht ve diğ., 2011).

İlaç dirençliliği, insanlık için giderek büyüyen bir sorun haline geldiğinden oldukça fazla sayıda araştırma daha etkili ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin keşfine odaklanmıştır (Özçelik ve diğ., 2011). Gelişigüzel antibiyotik kullanımı bakteriyel mutasyonlarla ortaya çıkan ilaç dirençliliğine neden olmaktadır. Bu durumun sonucu olarak çok güçlü antibiyotiklere karşı bile direnç kazanan bakteriler ortaya çıkmaktadır. Şu anki tabloda, bulaşıcı hastalıkların sayısı ve türü alarm 3 seviyesinde hızla artmaktadır. Dolayısıyla, geleneksel tıbbi bitkilerin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirildiği yeni bir dönem başlamıştır. Bitkisel kökenli ilaçların olumlu etkisi (az ve/veya hiç yan etki) tehlikesiz ve güvenilir olduklarını ortaya koymaktadır (Moorthy ve diğ., 2015).

Bitki ekstralarının MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik olmayan (Vero hücreleri için) konsantrasyonları kullanılarak ortaya çıkan antibakteriyel aktivite potansiyelleri Tablo 4.4 ve 4.5'te verilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Olea europaea* L. bitkisinin *Staphylococcus aureus* F1 çevresel suşuna, *Cotinus coggygia* bitkisinin *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* standart suşlarına ve *Staphylococcus aureus* F1, *Staphylococcus aureus* F2, *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşlarına ve *Rosa damascena* bitkisinin de *Staphylococcus aureus* F3 çevresel suşuna karşı farklı derecelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Özellikle, antibakteriyel aktiviteye sahip bitki ekstralarının sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda bu aktiviteyi sergilemesi bu bitkilerin önemli birer antibakteriyel ajan kaynağı olarak değerlendirilebileceği fikrini ortaya koymaktadır. Bitki ekstralarının antibakteriyel aktiviteleri ile ilgili literatür taramalarında (Özçelik ve diğ., 2011; Arullappan ve diğ., 2014; Lakshmi ve diğ., 2015) büyük bir kısmının sitotoksik aktivite parametresini göz önünde bulundurmaması antibakteriyel aktivite bulgularımızın en özgün yönünü oluşturmaktadır.

**Tablo 5.1:** *In vitro* biyolojik aktivite gösteren bitki ekstralarının karşılaştırılması.

Bitki	Antikanser aktivite	Antioksidan aktivite	Antibakteriyel aktivite
<i>Crataegus microphylla</i> C. Koch		+	
<i>Centaurea nerimaniae</i> Ş. Kültür		+	
<i>Olea europaea</i> L.			+
<i>Salvia hypargeia</i> Fisch.& Mey.		+	
<i>Cotinus coggygria</i> Scop.	+	+	+
<i>Origanum sipyleum</i> L.		+	
<i>Scorzonera tomentosa</i> L.		+	
<i>Rosa damascena</i> Miller	+	+	+
<i>Colchicum sanguicolle</i> K.M. Perss	+	+	
<i>Centaurea antiochia</i> Boiss. var. <i>praealta</i>	+		

8'i endemik olan 14 bitkiden metanol ile hazırlanan ham ekstralarının *in vitro* biyolojik aktivite (antikanser, antioksidan ve antibakteriyel) taramaları sonucunda; 4 tanesinin SI parametresine göre etkin antikanser, 8 tanesinin antioksidan ve 3 tanesinin de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Tablo 5.1). Bu bitkilerden bir kısmının fitokimyasal analizleri ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamış olup biyolojik aktiviteleri ilk defa tarafımızca ortaya konulmuştur. Özellikle, etkin biyolojik aktiviteye sahip başta *Colchicum sanguicolle* K. M. Perss olmak üzere bu bitkilerin içerikleri ile ilgili detaylı analizlere ve *in vitro/in vivo* alışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ortaya çıkacak sonuçların insanlık yararına katkı sağlayacağı beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Acıkara, Ö., Citoglu, G.S., Gencler Ozkan, A., 2013, Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in *Scorzonera tomentosa* L., *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1-8.
- Akan, H., Eker, İ., 2005, Check-list of the genus *Colchicum* in the flora of Turkey, *Turkish Journal of Botany*, 29(4), 327-331.
- Alali, F.Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Qasaymeh, R., Li, C., Burgess, J., Oberlies, N.H., 2006, Phytochemical studies and cytotoxicity evaluations of *Colchicum tunicatum* Feinbr and *Colchicum hierosolymitanum* Feinbr (Colchicaceae): two native Jordanian meadow saffrons, *Natural Product Research*, 20(06), 558-566.
- Alam, N., Bristi, N., Rariquzzaman, J., 2012, Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidants activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Arullappan, S., Rajamanickam, P., Thevar, N., Kodimani, C.C., 2014, *In vitro* Screening of Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1455-1461.
- Astari, K.A., Erel, S.B., Köse, F.A., Köksal, Ç., Karaalp, C., 2014, Cytotoxic and Antibacterial Activities of *Centaurea cadmea* Boiss., *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 101-106.
- Awang, N., Aziz, Z.A., Kamaludin, N.F., Chan, K.M., 2014, Cytotoxicity and mode of cell death induced by Triphenyltin (IV) compounds *in vitro*, *Journal of Biological Sciences*, 14 (2), 84-93.
- Bakht, J., Ali1, H., Khan, M.A., Khan, A., Saeed, M., Shafi, M., Islam, A.,Tayyab, M., 2011, Antimicrobial activities of different solvents extracted samples of *Linum usitatissimum* by disc diffusion method, *African Journal of Biotechnology*, 10(85),19825-19835.
- Basim, E., Basim, H., 2003, Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil, *Fitoterapia*, 74(4), 394-396.
- Baytop, T., 1999, Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul, 978-9-754-20021-8.
- Berrington, D., Lall, N., 2012, Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (HeLa) Cell Line. eCAM, Article ID 564927.



- Bona, M., 2013, An overview to *Centaurea* s.l. (Asteraceae) based on Herbarium specimens of ISTE, *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University*, 43(2), 121-137.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition, January 2012, Vol. 32 No. 1.
- Das, R., Bhattacharjee, C., 2013, *In vitro* Evaluation of Antioxidant Activity and Radical Scavenging Activity of Sesame Bioactive Peptides, *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 3(11), 521-527.
- Duman, R., 2012, Antiherpetic activity of some endemic *Hypericum* species in Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 11(5), 1240-1244.
- Edwards, J.E., Brown, P.N., Talent, N., Dickinson, T.A. , Shipley, P.R. , 2012, A Review of the Chemistry of the genus *Crataegus*, *Phytochemistry*, 79, 5-26.
- Emre, İ., Kürşat, M., Yılmaz, Ö., Erecevit, P., 2011, Some biological compounds, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in the seeds of *Nepeta italica* L. and *Sideritis montana* L. subsp. *montana* from Turkey, *Grasas Y Aceites*, 62(1), 68-75.
- Elhardallou, S.B., 2011, Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants, *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(3), 201-229.
- Erdoğan, E.A., Everest, A., Kaplan, E., 2013, Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey, *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 12(2), 221-224.
- Emynur, S.S., Catherine, Z.A., Siti Syakiroh, A., Ummu Habibah A.H., Norhayati, M.Y., Nor Farhanah, Z., Noor Husna, M.B., Siti Nafizah, M., Azlina, A.R., Noor, S.S., Khalili, R.A., 2012, Total antioxidant activity, total phenolic content and free radical scavenging activity of methanol, chloroform and thyl acetate extracts of *Vigna sinensis*, *International Food Research Journal*, 19, 1393-1400.
- Fadda, A., Serra, M., Molinu, M.G., Azara, E., Barberis, A., Sanna, D., 2014, Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH, *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 112-119.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A.H., Saari, N., 2012, Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) a review, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291-3340.
- González, M.S., Lozano-Mena, G., Juan, M. E., García-Granados, A., Planas, J. M., 2013, Assessment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L., *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(2), 339-346.

- Gören, A.C., 2014, Use of *Stachys* Species (Mountain Tea) as Herbal Tea and Food, *Records of Natural Products*, 8(2), 71-82.
- Gulcin, I., 2012, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Hossain, A.A., Hossain, S., Fatema, K., Siddique B.A., Sikder, H., Sarker, S., Jain, P., 2015, An evaluation on Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavanoid Contents of Extracts from *Adina cordafolis* (Roxb.), *American Journal of Plant Sciences*, 6, 633-639.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., 1983, Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives, *Agricultural Biological Chemistry*, 47(3), 521-528.
- Khaliq, A., Ahmad, S.D., Sabir, S.M., Khan, A., 2015, Antioxidant activity and inhibitory effect of cultivars of Olive (*Olea europaea*) against lipid peroxidation in mice liver, *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 188-196.
- Kandemir, N., 2003, The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia hypargeia* Fich. & Mey.(Lamiaceae) in Turkey, *Pakistan Journal of Botany*, 35(2), 219-236.
- Karagöz, A., Aslan, A., 2005, Antiviral and cytotoxic activity of some lichen extracts, *Biologia Bratislava*, 60 (13), 281-286.
- Kaya, A., Demirci, B., Başer, K.H.C., 2009, Compositions of Essential Oils and Trichomes of *Teucrium chamaedrys* L. subsp. *Trapezunticum* Rech. fil. and subsp. *sypirensis* (C. Koch) Rech. fil., *Chemistry & Biodiversity*, 6(1), 96-104.
- Khalili, R.M.A., Shafekh, S.E., Norhayati, A.H., Fatahudin, I.M., Rahimah, R., Norkamaliah, H., Azimah, A.N., 2013, Total phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*), *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(5):416-422.
- Kılıç, Ö., 2014, Essential oil composition of four *Teucrium* L. taxa from Turkey, their chemotaxonomy and potential usefulness, *International Journal of Pharmacy Education and Research*, 1(2), 68-73.
- Ko, E.Y., Kim, D., Roh, S.W., Yoon, W.J., Jeon, Y.J., Ahn, G., Kim, K.N., 2015, Evaluation on antioxidant properties of sixteen plant species from Jeju Island in Korea, *Experimental and Clinical Sciences*, 14, 133-145.
- Kökdil, G., Kurucu, S., Topçu, G., 1997, Chemical constituents of the essential oils of *Nepeta italica* L. and *Nepeta sulfuriflora* PH Davis, *Flavour and Fragrance Journal*, 12(1), 33-35.
- Köksal, C.K., 2014, Cytotoxic and Antibacterial Activities of *Centaurea cadmea* Boiss., *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 101-106.

- Kumar, D., Arya, V., Bhat, Z. A., Khan, N. A., Prasad, D. N., 2012, The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 1187-1200.
- Kültür, Ş., 2010, *Centaurea nerimaniae* sp. nov.(Asteraceae) from south Anatolia, Turkey, *Nordic Journal of Botany*, 28(5), 613-616.
- Laskhmi, G.M., Bhuvaneshwari, V., Amsaveni, R., Ragavendran, P., Kalaiselvi, M., 2015, Antioxidant and antibacterial activity from whole plant of *Eclipta alba* (L.)- an *in vitro* model, *International Journal of Biosciences and Nanosciences*, 2(1), 1-8.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T., 2011, Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line, *Chinese Medicine*, 6(1), 39-47.
- Mahadev, R., Ramakrishnaiah, H., Krishna, V., Deepalakshmi, A.P., Kumar, N., 2015, Cytotoxic activity of methanolic extracts of *Solanum erianthum* D.don., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 106-108.
- Manjusha, C., Vipin, K., Hitesh, M., Surender, S., 2015, Medicinal plants with potential antiarthritic activity, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2), 147-179.
- Mann, A., Ifarajimi, O.R., Adewoye, A.T., Ukam, C., Udemé, E.E., Okorie, I.L., Sakpe, M.S., Ibrahim, D.R., Yahaya, Y.A., Kabir, A.Y., Ogbadoyi, E.O., 2011, In vivo antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from Nupeland of North Central Nigeria, *Journal of Traditional Complementary Alternative Medicine*, 8(1), 15-21.
- Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Nini, A., Antenucci, L., Raimo, G., Iorizzi, M., 2014, Antioxidant Activity and Chemical Components as Potential Anticancer Agents in the olive leaf (*Olea europaea* cv *Leccino*), *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(10), 1376-1385.
- Marčetić, M., Božić, D., Milenković, M., Malešević, N., Radulović, S., Kovačević, N., 2013, Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity of young shoots of the smoke tree, *Cotinus coggygria* Scop, *Phytotherapy Research*, 27(11), 1658-1663.
- Matić, S., Stanić, S., Bogojević, D., Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Solujić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, M., 2013, Methanol extract from the stem of *Cotinus coggygria* Scop., and its major bioactive phytochemical

- constituent myricetin modulate pyrogallol-induced DNA damage and liver injury, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(2), 81-89.
- Melikoğlu, G., Bitiş, L., Meriçli, A.H., 2004, Flavonoids of *Crataegus microphylla*, *Natural Product Research*, 18(3), 211-213.
- Moorthy, K., Punitha, T., Vinodhini, R., Mickymaray, S., Shonga, A., Tomass, Z., Thajuddin, N., 2015, Efficacy of different solvent extracts of *Aristolochia krisagathra* and *Thottea ponmudiana* for potential antimicrobial activity, *Journal of Pharmacy Research*, 9(1), 35-40.
- Motamed, M.S., Motlagh, S.S., Bagherzadeh, H., Forouz, S.A., Tafazoli, H., 2014, Evaluation of antioxidant activity of *Ruta graveolens* L. extract on inhibition of lipid peroxidation and DPPH radicals and the effects of some external factors on plant extract's potency, *Research Journal of Pharmacognosy*, 1, 45-50.
- Nunes, P.X., Silva, S.F., Guedes, R.J., Almeida, S., 2012, Biological oxidations and antioxidant activity of natural products, Phytochemicals as nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health, 1-20.
- Omer, S.A., Elobeid, M.A., Elamin, M.H., Hassan, Z.K., Virk, P., Daghestani, M.H., Almarhoon, Z.M., 2012, Toxicity of olive leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar Albino rats. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(11), 1175-1182.
- Oluk, A.E., Çakır, A., Yaşa, İ., Çapanlar, S., Kırmızıgül, S., 2013, Comparison of the antimicrobial activity and essential oil content of wild and micropropagated *Origanum sipyleum* L.: A medicinal herb native to Turkey, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(6), 230-233.
- Orhan, D.D., Özçelik, B., Hoşbaş, S., Vural, M., 2012, Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi, *Turkish Journal of Biology*, 36(6), 672-686.
- Ozkan, G., Sagdic, O., Ekici, L., Ozturk, I., Ozcan, M., 2007, Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities, *Journal of Food Lipids*, 14(2), 157-169.
- Özcan, N.T., Dirmancı, T., Martin, E., Altınordu, F., 2015, Cytotaxonomical study in five taxa of the genus *Teucrium* L.(Lamiaceae), *Caryologia*, 68(1), 1-8.
- Özçelik, B., Kartal, M., Orhan, I., 2011, Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.
- Özkan, E.E., Demirci, B., Gürer, Ç.Ü., Kültür, Ş., Mat, A., Başer, K.H.C., 2013, Composition of Essential Oils from Five Endemic *Hypericum* Species of Turkey, *Organic Chemistry Current Research*, 2(113), 2161-0401.

- Özyürek, M., Bener, M., Güçlü, K., Dönmez, A.A., Süzgeç-Selçuk, S., Pırıldar, S., Apak, R., 2012, Evaluation of antioxidant activity of *Crataegus* species collected from different regions of Turkey, *Records of Natural Products*, 6(3), 263-277.
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Satil, F., 2013, Traditional use of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 951-963.
- Ponni, V., Thenmozhi, S., Rajan, S., 2009, Screening of bioactive potentials and phytochemical nature of *Solanum trilobatum* extracts. *Journal of Basic Applied Biology*, 3(4), 134-39.
- Praveena, A., Suriyavathana, M., 2014, *In vitro* cytotoxicity of the crude alkaloids of *Toddalia asiatica* L. against human liver cancer cell lines (HEP G2) and normal liver cell lines (LO2), *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 1781-1788.
- Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O.K., Zoumpoulakis, P., Sinanoglu, V.J., 2013, Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils, *Antioxidants*, 2, 11-22.
- Raja, R. D. A., Jeeva, S., Prakash J. W., Antosinamy, J. M., Irudayaraj, V., 2011, Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, 375-378.
- Rusanov, K., Kovacheva, N., Rusanova, M., Atanassov, I., 2011, Traditional *Rosa damascena* flower harvesting practices evaluated through GC/MS metabolite profiling of flower volatiles, *Food Chemistry*, 129(4), 1851-1859.
- Sadeghi, Z., Valizadeh, J., Shermeh, O.A., 2015, Antioxidant activity and total phenolic contents of some date varieties from Saravan region, *Iranian Journal of Medicinal Plants Research*, 9(4), 78-83.
- Sagnia, B., Fedeli, D., Casetti, R., Montesano, C., Falcioni, G., Colizzi, V., 2014, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscia fulva* Medicinal Plants Collected in Cameroon, *Plos One*, 9(8), 1-10.
- Salehi, A., Kariminik, A., Hasanabadi, Z., 2013, Antibacterial activity of methanol extracts of 4 plants used in traditional herbal medicine of Kerman, Iran, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 7(12), 911-914.
- Santharam, E., Ganesh, P., Soranam, R., Divya, V.V., Packia Lekshmi, N.C.J., 2015, Evaluation of *in vitro* free radical scavenging potential of various extracts of whole plant of *Calycopteris floribunda* (Lam), *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 860-864.

- Sari, A., Zidorn, C., Ellmerrer, E.P., Özgökçe, F., Ongania, K.H., Stuppner, H., 2007, Phenolic compounds from *Scorzonera tomentosa* L., *Helvetica Chimica Acta*, 90(2), 311-317.
- Sieniawska, E., Baj, T., Dudka, J., Gieroba, R., Swiatek, L., Rajtar, B., Polz-Dacewicz, M., 2013, Cytotoxicity, antioxidant activity and an effect on CYP3A4 and CYP2D6 of *Mutellina purpurea* L. extracts, *Food and Chemical Toxicology*, 52, 188-192.
- Sharipah, R.S.A., Sunalti, M., Norizan, A., Faridahanim, M.J., Rohaya, A., 2009, Phenolic content and antioxidant activity of fruits of *Ficus deltoidea* var *angustifolia* sp., *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 13(2), 146-150.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P.A., 2014, Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants, *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.
- Svejda, B., Moser, V.A., Sturm, S., Höger, H., Ingolic, E.V., Siegl, H.S., Stuppner, H., Pfragner, R., 2010, Anticancer Activity of Novel Plant Extracts from *Trailliaedoxa gracilis* (W. W. Smith & Forrest) in Human Carcinoid KRJ-I Cells. *Journal of Advanced Research*, 30, 55-64.
- Taylor, P., Arsenak, M., Abad, M.J. Fernández, Á., Milano, B., Gonto, R., Ruiz, M.C., Fraile, S., Taylor, S., Estrada, O., Michelangeli, F., 2013, Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines, *Phytotherapy Research*, 27, 530-539.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A., 2006, Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey, *Food Chemistry*, 95(2), 200-204.
- Topcu, G., Turkmen, Z., Schilling, J. K., Kingston, D.G. I., Pezzuto, J. M., Ulubelen, A., 2008, Cytotoxic Activity of Some Anatolian *Salvia* Extracts and Isolated Abietane Diterpenoids, *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 180-184.
- Topçu, G., Gören, A.C., 2007, Biological activity of diterpenoids isolated from Anatolian Lamiaceae plants, *Records of Natural Products*, 1(1), 1-16.
- Tundis, R., Peruzzi, L., Menichini, F., 2014, Phytochemical and Biological Studies of *Stachys* species in Relation to Chemotaxonomy: A Review, *Phytochemistry*, 102, 7-39.
- Turker, A.U., Koyluoglu, H., 2012, Biological activities of some endemic plants in Turkey, *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 6949-6961.
- Turker, A.U., Yildirim, A. B., 2013, Evaluation of Antibacterial and Antitumor Activities of Some Turkish Endemic Plants, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1003-1010.

- Uddin, G., Rauf, A., 2012, Phytochemical screening and biological activity of the aerial parts of *Elaeagnus umbellata*, *Science Research Essays*, 7, 3690-3694.
- Uddin, S. J., Grice, I.D., Tiralongo, E., 2009, Cytotoxic effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-7.
- Wong, Y.J., Matanjun, P., Ooi, Y.B.H., Chia, K.F., 2014, Evaluation of antioxidant activities in relation to total phenolics and flavonoids content of selected Malaysian wild edible plants by multivariate analysis, *International Journal of Food Properties*, 17, 1763-1778.
- Yaacob, N., Hamzah, N., Kamal, N.N., Abidin, S.A., Lai, C.S., Navaratnam, V., Kamal, M.N., 2010, Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 10(42), 1472-6882.
- Zarinah, Z., Maaruf, A.G., Nazaruddin, R., Wong, W.W.W., Xuebing, X., 2014, Antioxidant, antimicrobial activity and *in-vitro* cytotoxicity screening study of Pili nut oil, *International Food Research Journal*, 21(1), 309-316.

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	FULYA TUĞBA ARTUN
Uyruğu	TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Doğum tarihi, Yeri	08.01.1985
E-mail	fulyaartun@gmail.com

### Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Lisans ve Tezsiz Yüksek Lisans	K.T.Ü. /Fatih Eğitim Fak. / Orta Öğr. Mat. ve Fen Bilimleri Bölümü/ Biyoloji Öğretmenliği Programı	2008
Lise	Bahçelievler Adnan Menderes Anadolu Lisesi	2003

### Makaleler / Bildiriler

- Artun, F. T., Karagöz, A., Özcan, G., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., Sütlüpnar, N. (2015) *In vitro* Anticancer and Cytotoxic Activities of Some Plant Extracts on HeLa and Vero Cell Lines. *Mitteilungen Klosterneuburg* 65(4): 55-64.
- Demirgan, R., Karagöz, A., Pekmez, M., Önay-Uçar, Ö., Artun, F. T., Gürer, Ç., Mat, A. (2015) *In Vitro* Anticancer Activity and Cytotoxicity of Some *Papaver* Alkaloids on Cancer and Normal Cell Lines. *Mitteilungen Klosterneuburg* 65(4): 275-284.