

**BAZI *FERULA* UÇUCU YAĞLARININ
KİMYASAL BİLEŞİMİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE,
IN VITRO SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTE YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

**BAZI *FERULA* UÇUCU YAĞLARININ
KİMYASAL BİLEŞİMİ, BİYOLOJİK
AKTİVİTE, *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTE VE
GENOTOKSİSİTE YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Merve Baysal

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Mayıs 2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Betül DEMİRCİ

Yardımcı Danışman : Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI

Bu tez çalışmasının bir kısmı, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1404S128).

Jüri ve Enstitü Onayı

Merve BAYSAL'ın "Bazı *Ferula* Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimi, Biyolojik Aktivite, *In Vitro* Sitotoksosite ve Genotoksosite Yönünden İncelenmesi" başlıklı, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans 29.05.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Betül DEMİRCİ Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Neş'e KIRIMER Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Nurgün KÜÇÜKBOYACI Gazi Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..08.05.2015 tarih ve13..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Dilek AK

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Merve Baysal
Doğum tarihi ve yeri : 1989, Eskişehir
Uyruğu : T. C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir
0 (222) 335 05 80/3754
mbaysal@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim Okulu Atatürk İlköğretim Okulu (2003)
Lise Şehit Tuncay Durmuş Çok Programlı Lisesi (2007)
Lisans Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2012)
Yüksek Lisans Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü- Farmakognozi- Tezli Yüksek Lisans (2015)
Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji- Tezli Yüksek Lisans (Devam ediyor)

Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim : Araştırma Görevlisi
(Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 2014-)

Bilimsel Etkinlikler

Katılan kurslar ve eğitim programları:

Türk Eczacılar Birliği;

- Dermakozmetik-Kozmetik Eğitimi
- İyi Eczacılık Uygulamaları-Klinik Eczacılık ve Farmasötik Bakım Eğitimi
- Uygun Antibiyotik Kullanımı ve Klinik Eczacı Eğitimi
- Antidepresanlar ve Cinsel İşlev Bozukluğu Eğitimi, 2012, Ankara, Türkiye.

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanımı ile İlgili B Sınıfı Eğitim Programı, 2014, Eskişehir, Türkiye.

Türk Toksikoloji Derneđi, Sürekli Eğitim Kursu: Endokrin Bozucu Bileşikler ve Analizleri, 3. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu, 2014, İzmir, Türkiye.

Türk Toksikoloji Derneđi, Sürekli Eğitim Kursu: Kimyasalların Neden Olduğu Hastalıkların Gelişimi ve Tedavisinde Genetik Farklılıkların Önemi ve Analizi, 3. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu, 2014, İzmir, Türkiye.

Türk Farmakoloji Derneđi, Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu-Klinik Toksikoloji Eğitim Programı, 2015, Eskişehir, Türkiye.

ÖNSÖZ

Uçucu yağlar eski çağlardan beri kullanımını olan, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip karışımlardır. Daha çok bitkisel kaynaklı olan bu karışımların, sağlıktan kozmetiğe, gıda sektöründen aromaterapiye kadar pek çok alanda kullanımları vardır. Apiaceae familyasının üyelerinden olan *Ferula* L. türleri İran başta olmak üzere Orta Asya ve Akdeniz’de dağılım göstermektedir. Türkiye’de de var olan bu bitkilerin afrodisyak, yara iyi edici, karminatif, antispazmodik gibi aktivitelerine bağlı olarak halk arasında kullanımları bulunmaktadır.

Çalışmamızda bazı *Ferula* uçucu yağlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve kullanımlarının güvenilirliği açısından *in vitro* sitotoksisite ve genotoksisite deneyleri yapılmıştır.

Tez çalışmam boyunca değerli fikir ve yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım Prof. Dr. Betül DEMİRCİ’ye; sevgili hocamız Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Neş’e KIRIMER’e; akademik kariyerimi sürdüreceğim alanın değerli hocaları, ikinci ailem gibi gördüğüm sevgili Doç. Dr. Bülent ERGUN, Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI ve Yrd. Doç. Dr. Sinem ILGIN’a desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem ATLI’ya tez çalışmamın yardımcı danışmanı olması nedeniyle ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Bitkisel materyallerin toplanmasındaki ve teşhisindeki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Mehmet SAĞIROĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili Uzm. Bio. Gamze GÖGER’e; başta Yeşim HALİLOĞLU ve Bilge KARA olmak üzere Farmakognozi Anabilim Dalı’nda lisanüstü eğitimini devam ettiren tüm arkadaşlarıma, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca desteklerini esirgemeyen, iyi ki yanımda olan canım arkadaşım Elif KAYA’ya; sevgili Selin ENGÜR’e ve Güçlü ÖZARDA’ya; burada ismini sayamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Hayattaki en değerlilerim canım ailem anneme, babama, ablalarıma, abime, enişteme ve neşe kaynaklarım biricik yeğenlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BAZI *FERULA* UÇUCU YAĞLARININ KİMYASAL BİLEŞİMİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE, *IN VITRO* SİTOTOKSİSİTE VE GENOTOKSİSİTE YÖNÜNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde doğal kaynaklı ürünlere ilginin artmasıyla bilimsel alanda bu yöndeki çalışmalar da hız kazanmıştır. Uçucu yağlar, eski çağlardan günümüze kadar kullanılagelen aromatik sıvılardır. Koku, tat maddesi olarak kullanımlarının dışında farklı biyolojik aktiviteleri nedeniyle sağlık alanında da kullanımları bulunmaktadır. *Ferula* L. cinsi Apiaceae familyasının en önemli cinslerinden biridir. Türkiye’de 17, Asya’da 177, dünyada ise 180-185 türü bulunmaktadır.

Bu çalışmada *Ferula hermonis* Boiss., *F. brevipedicellata* Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman ve *F. rigidula* DC. uçucu yağlarının analizleri eş zamanlı olarak GK ve GK/KS ile gerçekleştirilmiştir. *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının ana bileşikleri α -pinen (% 68.9 ve % 73.0, sırasıyla), β -pinen (% 5.3 ve % 4.0, sırasıyla) ve naftalen (% 4.3 ve % 8.5, sırasıyla); *F. hermonis* uçucu yağının ana bileşikleri ise α -pinen (% 64.1), naftalen (% 8.3) ve *trans*-verbenol (% 4.8) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağların mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiş, mikroorganizmalara göre değişen orta ya da zayıf derecede aktivite tespit edilmiştir. DPPH• radikali ile yapılan serbest radikal süpürücü etki tayini sonucunda uçucu yağların 0.5 mg/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivite göstermediği saptanmıştır. Uçucu yağların sağlıklı bir hücre hattı olan NIH3T3’e (ATCC® CRL-1658™, fare embriyonik fibroblast hücreleri) karşı sitotoksiteleri belirlenmiştir. Aktivite deneyleri ve sitotoksosite testi sonucunda umut vademedebileceği düşünülen *F. rigidula* uçucu yağına uygulanan Ames MPF™ 98/100 testi sonucunda, uçucu yağın test edilen dozlarda mutajenik olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma *F. hermonis*, *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının antioksidan aktivite ve sitotoksosite; *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının kimyasal bileşimlerinin belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivite; *F. rigidula* uçucu yağının genotoksosite değerlendirilmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Ferula* sp., uçucu yağ, antimikrobiyal, antioksidan, NIH3T3, Ames MPF™ 98/100

INVESTIGATION OF ESSENTIAL OILS OF SOME *FERULA* SPECIES IN TERMS OF CHEMICAL COMPOSITION, BIOLOGICAL ACTIVITY, *IN VITRO* CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY

ABSTRACT

Today with growing interest in natural products, works in this field also have gained momentum in the scientific field. Essential oils are aromatic liquid that have been used since ancient times. Besides being used as flavours and fragrances, they have been used in health care due to the different biological activities. The genus *Ferula* is one of the most important species of the Apiaceae family. It contains 17 species in Turkey, 177 in Asia and 180-185 in the world.

In this study, analyses of essential oils of *Ferula hermonis* Boiss., *F. brevipedicellata* Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman ve *F. rigidula* DC. were simultaneously performed by GC and GC/MS. The main components of the essential oils of *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* were determined as α -pinen (68.9% and 73.0%, respectively), β -pinen (5.3% and 4.0%, respectively) ve naftalen (4.3% and 8.5%, respectively); the main components of the essential oils of *F. hermonis* were determined as α -pinen (64.1%), naftalen (8.3%) and *trans*-verbenol (4.8%). Antimicrobial activity of the essential oils was determined by microdilution method and according to results the essential oils have moderate or weak activity against microorganisms. The results of determination of free radical scavenging effects with DPPH[•] was showed that the essential oils have no antioxidant activity at 0.5 mg/mL and lower concentrations. The cytotoxicity of essential oils was determined against NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™, mouse embryonic fibroblast cell line) which is a normal cell line. The essential oil of *F. rigidula*, may be promising one according to the results of biological activity and cytotoxicity assays, was applied Ames MPF™ 98/100 test and it was determined that not mutagenic in tested doses.

The study is the first investigation in terms of antioxidant activity and cytotoxicity of essential oils of *F. hermonis*, *F. brevipedicellata* and *F. rigidula*; antimicrobial activity and determination of chemical composition of essential oils of *F. brevipedicellata* and *F. rigidula*; evaluation of genotoxicity of essential oil of *F. rigidula*.

Keywords: *Ferula* sp., essential oil, antimicrobial, antioxidant, NIH3T3, Ames MPF™ 98/100

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Apiaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler	2
<i>Ferula L. Cinsi Hakkında Genel Bilgiler</i>	3
<i>Ferula rigidula DC., Ferula brevipedicellata</i> Peşmen ex M. Sağıroğlu & <i>H. Duman ve Ferula hermonis Boiss.</i>	3
Uçucu Yağlar Hakkında Genel Bilgiler	5
<i>Ferula rigidula DC. Üzerinde Yapılan Çalışmalar</i>	6
<i>Antibakteriyal etki</i>	6
<i>Antioksidan etki</i>	6
<i>Ferula brevipedicellata</i> Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman Üzerinde Yapılan Çalışmalar	7
<i>Ferula hermonis Boiss. Üzerinde Yapılan Çalışmalar</i>	7
<i>Fitokimyasal çalışmalar</i>	7
<i>Biyolojik aktivite çalışmaları</i>	8
<i>Antimikrobiyal etki</i>	8
<i>Sitotoksik etki</i>	9
<i>Antiinflamatuvar etki</i>	9
<i>Afrodizyak etki</i>	9
<i>Uçucu yağ çalışmaları</i>	10
<i>Ferula L. Türleri Üzerinde Yapılan Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları</i>	11

<i>Ferula L. Türleri Üzerinde Yapılan Uçucu Yağların Biyolojik</i>	
Aktivite Çalışmaları	11
GEREÇLER	19
Bitkisel Materyaller	19
DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Aletler	20
YÖNTEMLER	22
Uçucu Yağların Elde Edilmesi	22
Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle	
Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Şartları	22
Biyolojik Aktivite Çalışmaları	22
<i>Antimikrobiyal aktivite çalışmaları</i>	22
<i>Mikroorganizmaların canlandırılması</i>	22
<i>Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel ve antifungal etkinin</i>	
<i>belirlenmesi</i>	23
<i>Antioksidan aktivite çalışması</i>	24
<i>1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini</i>	24
<i>In vitro sitotoksosite ve genotoksosite çalışmaları</i>	25
<i>XTT sitotoksosite testi</i>	25
NIH3T3 hücrelerinin çoğaltılması	26
NIH3T3 hücrelerine XTT sitotoksosite testinin uygulanması	26
<i>AMES MPF™ 98/100 genotoksosite testi</i>	27
BULGULAR ve TARTIŞMA	29
Uçucu Yağların Verimleri	29
Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz	
Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonuçları	29
Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	31
Antioksidan Aktivite Sonuçları	32
<i>In Vitro Sitotoksosite ve Genotoksosite Testi Sonuçları</i>	34
<i>XTT sitotoksosite testi sonuçları</i>	34
<i>AMES MPF™ 98/100 genotoksosite testi sonuçları</i>	35
SONUÇ ve ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 <i>Ferula hermonis</i> , <i>Ferula brevipedicellata</i> ve <i>Ferula rigidula</i> 'nın Makroskopik Özelliklerinin Karşılaştırılması	5
Çizelge 2 Bazı <i>Ferula</i> Türlerine Ait Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları	12
Çizelge 3 Bazı <i>Ferula</i> Türlerine Ait Uçucu Yağ Analizleri ve Biyolojik Aktivite Sonuçları	15
Çizelge 4 Bitkisel Materyallere Ait Bilgiler	19
Çizelge 5 Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar	23
Çizelge 6 <i>Ferula hermonis</i> Uçucu Yağının (Fh) Kimyasal Bileşimi	29
Çizelge 7 <i>Ferula brevipedicellata</i> Uçucu Yağının (Fb) Kimyasal Bileşimi	30
Çizelge 8 <i>Ferula rigidula</i> Uçucu Yağının (Fr) Kimyasal Bileşimi	30
Çizelge 9 Uçucu Yağların ve Standart Maddelerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)	31
Çizelge 10 DPPH• Radikal Süpürücü Etki Sonuçları	33
Çizelge 11 Uçucu Yağların NIH3T3 Hücre Hattına Karşı İK ₅₀ Değerleri	34
Çizelge 12 Ames MPF™ 98/100 Testi Sonuçları	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 <i>Ferula</i> Türlerinin Doğadaki Görünüşleri a: <i>Ferula rigidula</i> ; b: <i>Ferula brevipedicellata</i> ; c: <i>Ferula hermonis</i>	4
Şekil 2 Resazurin'in MİK Belirlenmesinde Kullanılması	24
Şekil 3 DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayininin Mekanizması	25
Şekil 4 XTT Sitotoksosite Testinin Prensibi	26
Şekil 5 Ames MPF™ 98/100 Testinin Uygulanışı	27
Şekil 6 Fr Uçucu Yağının AMES MPF™ 98/100 Test Sonuçlarına Ait Grafikler	37

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

2D NOESY	: Two-dimensional nuclear overhauser spectroscopy (İki boyutlu nükleer Overhauser etkisi spektroskopisi)
ABTS	: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ATCC	: American Type Culture Collection
CSLI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CUPRAC	: Cupric reducing antioxidant capacity (Bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan kapasitesi analizi)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FID	: Alev iyonlaşma dedektörü
FRAP	: Ferric ion reducing antioxidant power (Demir indirgenme antioksidan kapasitesi analizi)
GK	: Gaz kromatografisi
GK/KS	: Gaz kromatografisi/Kütle spektrometrisi
GM	: Growth medium
İK ₅₀	: İnhibitör konsantrasyon 50
MFK	: Minimum fungisidal konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB 2	: Mueller Hinton Broth 2
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MTT	: (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
OD	: Optical density (Optik yoğunluk)
PDA	: Potato Dextrose Agar
RRI	: Relatif tutunma zamanı
UV	: Ultraviyole
XTT	: [2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum]
YBSK	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyada ve ülkemizde doğal kaynaklı ürünlere gösterilen ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bu durum gıdalarda kullanılacak yeni koruyucu maddelerin, tat ve koku verici maddelerin bulunmasında veya ilaç geliştirme sürecinde araştırmacıların doğal kaynaklı ürünlere yönelimini arttırmaktadır.

Uçucu yağlar genellikle bitkilerden elde edilen aromatik sıvı karışımlardır. Tat ve koku verici olarak kullanımlarının dışında antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri nedeniyle gıdalarda koruyucu olarak kullanılabilir. Farklı biyolojik aktivitelere sahip uçucu yağların, sağlık alanında da kullanımları bulunur.

Apiaceae familyasının önemli üyelerinden olan ve ülkemizde de yetişen *Ferula* cinsi, sülfür içeren bileşiklerin yanı sıra seskiterpenler, kumarinler, monoterpenler gibi biyolojik olarak aktif olan bileşiklerce zengin türlere sahiptir (Sahebkar ve ark., 2010, Iranshahi ve ark., 2010). *Ferula hermonis*, yaygın olarak "Shilsh-el-zallouh (Saçaklı kök)", "Hashishat-al-kattira (Bereket otu)" veya "The Lebanese viagra (Lübnan viagrası)" isimleriyle bilinen, Suriye ile Lübnan arasındaki Hermon Dağı'nda yetişen çalimsı bir bitkidir. Bitkinin tohumları ve kökleri uzun zamandır Orta Doğu'da hem erkek hem de kadınlar için cinsel isteksizlik, frijidite tedavisinde afrodizyak olarak kullanılmaktadır (Al-Ja'fari ve ark., 2011; Geroushi ve ark., 2011). *Ferula rigidula*, Orta ve Doğu Anadolu'da yetişen halk arasında "Siyabu ya da Suyabu" adıyla anılan, Van ve çevresinde severek tüketilen otlu peynire katılan bir bitkidir (Ağaoğlu ve ark., 2005; Elibol, 2009). *Ferula brevipedicellata* ise Türkiye'de yetişen endemik bir türdür (Sağiroğlu ve Duman, 2010).

Tez çalışması kapsamında *F. hermonis*, *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının kompozisyonları aydınlatılmış, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ayrıca etkinlik kadar önemli olan güvenilirlik değerlendirmesi açısından uçucu yağlara sitotoksisite ve genotoksisite testleri uygulanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Apiaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait Asya kıtasında 286 cins (2089 tür), Avrupa'da 141 cins, Afrika'da 133 cins, Kuzey Amerika'da 93 cins, Orta Amerika'da 27 cins, Güney Amerika'da 51 cins ve Avustralya'da 36 cins bulunur. Asya'da en çok bulunan cinsler *Ferula* L., *Bupleurum* L., *Pimpinella* L., *Heracleum* L., *Seseli* L., *Angelica* L., *Bunium* L., *Prangos* Lindl., *Ferulago* W. D. J. Koch, *Hymenidium* Lindl., *Hydrocotyle* L., *Chaerophyllum* L., *Eryngium* L., *Pternopetalum* Franch., *Elaeosticta* Fenzl, *Acronema* Falc. ex Edgew. ve *Semenovia* Regel & Herder'dir. Çin, Türkiye'nin Asya'daki kısmı, İran, Rusya'nın Asya'daki kısmı, Kazakistan, Hindistan, Afganistan, Kırgızistan, Özbekistan, Gürcistan ve Suriye tür çeşitliliğinin en fazla görüldüğü coğrafyalardır. Endemik tür sayısı, hemen hemen bütün bu ülkelerde fazladır. Türkiye 4 endemik cinse (*aegokeras* Raf., *ekimia* H. Duman, *postiella* Kljuykov ve *crenosciadium* Boiss. & Heldr. ex Boiss.) ve 140 endemik türe (6 tanesi tartışmalı) ev sahipliği yapmaktadır. Genel olarak güney batı Asya, Apiaceae familyasının endemik tür ve çeşitliliği açısından oldukça önemlidir (Pimenov ve Leonov, 2004).

Apiaceae familyası üyeleri genellikle internodlarda içi dolu ve kuvvetli gövdeye sahip otsu bitkilerdir. Yapraklar tabanda rozet şeklinde; gövdede almaçlı dizilmiş; tabanda yaprak kını bulunur; basit ya da bileşik bazen peltattır, bileşik olduğunda ternat, pinnat, bipinnat ya da çok pinnat bazen de palmat; yaprak kenarı düz, parçalı, dikenli olabilir; stipul bulunmaz; yaprak büyüklüğü değişkendir; damarlanma pinnat, palmat ya da paraleldir. Genellikle birleşik umbel, basit umbel nadiren de simöz çiçek durumları görülür. Çiçek durumunda 3 brakte vardır ya da yoktur. Çiçekler genellikle brakteollü; brakteoller küçüktür. Kaliks indirgenmiş; indirgenmemişse serbest ya da birleşik, kesinlikle kaliks tüpü oluşturmaz, sepal 5, çok küçüktür. Korolla serbest; petal 5; beyaz, sarı, pembe ya da eflatun; nadiren petalsızdır. Stamen 5, perianttan bağımsız, sepallerle karşılıklı dizilir, fertil, tomurcukta içe dönüktür. Ovaryum alt durumlu (1-2) bölmelidir. Stilus 2, tabanı genişleyip stilopodyum oluşturmuştur. Plesantasyon aksillar ya da apikaldır. Ovül her bölmede 1 ya da 2 tanedir. Meyve kuru, 2 merikarplı şizokarptır. Her merikarp 1 tohumludur; merikarpların iç yüzleri birbirine bakar; arada birbirine bağlayan karpofor bulunur; dış yüz ise 5 birincil sırtlı, nadiren 4 ikincil sırt da bulunur. Sırtlar arasında vitta (yağ kanalları) bulunur. Tohumlarda yağlı endosperm bulunur (Davis, 1972)

Apiaceae tipik şemsiye şeklindeki çiçekleri ve kuru, iki mezokarplı meyveleri gibi kendine özgü botanik özellikleri ile en iyi bilinen familyalardan biridir. Genellikle ılıman iklime sahip bölgelerde yetişirler (Sang-Bok ve Søren, 2000; Sahebkar ve Iransahi, 2011). İçerdikleri kumarin, uçucu yağ ve seskiterpen gibi sekonder metabolitleri nedeniyle baharat olarak veya tedavi amaçlı kullanımları vardır (Sang-Bok ve Søren, 2000; Tavares ve ark., 2008). *Anethum graveolens* (dereotu), *Anthriscus cerefolium* (frenk maydanozu), *Angelica* spp. (melek otu türleri), *Apium graveolens* (kereviz), *Carum carvi* (frenk kimyonu), *Coriandrum sativum* (kişniş), *Cuminum cyminum* (kimyon), *Foeniculum vulgare* (rezene), *Ferula*

gummosa (kasnı) ve *Pimpinella anisum* (anason) bu familyanın en çok bilinen üyeleridir. Apiaceae familyası, tanıdık birçok yenilebilir bitkinin yanı sıra *Conium maculatum* (baldıran), *Cicuta virosa* (su baldıranı), *Aethusa cynapium* (zehirli maydanoz) gibi çok sayıda ölümcül zehirli bitkiyi de içerir (Tabanca ve ark., 2007).

Apiaceae familyasındaki bitkiler, çeşitli biyolojik aktiviteye sahip bileşik sınıflarını içerir. Bu bileşiklere apoptozu indükleyen, antibakteriyal, hepatoprotektif, vazodilatör, siklooksijenazı inhibe eden, antitümoral etki gösteren bileşikler örnek gösterilebilir (Oroojalian ve ark., 2010). Bu familyanın üyelerine ait birçok önemli tıbbi ürün antiseptik, balgam söktürücü, diüretik, karminatif, vazodilatör veya spazmolitik olarak bazı Farmakopelerde yer almaktadır (Tavares ve ark., 2008).

Ferula L. Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

Ferula cinsi Apiaceae familyasının en önemli cinslerinden biridir (Akhgar ve ark., 2011). Türkiye’de 17, Asya’da 177, dünyada ise 180-185 türü yetişmektedir (Pimenov ve Leonov 2004). Özellikle Orta Asya ve Akdeniz’de dağılım gösteren *Ferula*, İran florasında önemli bir yere sahiptir. Bu cinse ait türlerin en popüler farsça ismi "Koma"dır (Sahebkar ve ark., 2010; Akhgar ve ark., 2011). *Ferula* cinsi hakkında ana bilgi kaynağı 133 türün teşhisini içeren Korovin’in monografidir (Korovin, 1951). Monografin yayınlanmasından sonraki dönemde çoğu Türkiye, İran ve Afganistan’dan olmak üzere 50 yeni tür tanımlanmıştır. 100’ü endemik olan 180 türün 130’u, Orta Asya’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de *Ferula* cinsi adına Peşmen tarafından yapılan ilk revizyon, P.H. Davis’in *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* kitabının 4. cildinde yer almaktadır. Peşmen 9’u endemik, 1’i tamamen yeni olan toplam 18 türün teşhisini yapmıştır (Duman ve Sağıroğlu, 2005).

Bu cinse ait türler seskiterpenler, kumarinler, monoterenler ve sülfür içeren bileşikler gibi biyolojik olarak aktif olan bileşikler açısından iyi birer kaynaktır (Sahebkar ve ark., 2010, Iranshahi ve ark., 2010). Akdeniz Bölgesi’nde Roma ve Grek dönemlerinden beri geleneksel tıpta *Ferula* türlerinin de kullanıldığı bilinmektedir (Iranshahi ve ark., 2010). *Ferula* cinsine ait bazı türlerin halk arasında sedatif, antispazmodik, antienflamatuar, antipiretik, analjezik, anti-HIV, karminatif, kurt düşürücü, antispazmodik, kontraseptif, dijestif, antikonvülzan, yara iyi edici, afrodizyak olarak kullanımlarının olduğu bilinmektedir (Mirzaei ve Hasanloo, 2012; Sahebkar ve ark., 2010; Chibani ve ark., 2012; Akhgar ve ark., 2011; Duman ve Sağıroğlu, 2005; Tamemoto ve ark., 2001).

Ferula rigidula DC., Ferula brevipedicellata Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman ve Ferula hermonis Boiss.

Ferula rigidula DC., Orta ve Doğu Anadolu’da yetişen halk arasında "Siyabu ya da Suyabu" adıyla anılan, Van ve çevresinde severek tüketilen otlu peynire katılan bir bitkidir (Ağaoğlu ve ark., 2005; Elibol, 2009). Halk arasında diyabet, hiperkolestrolemide kullanımları vardır (Altundağ ve Öztürk, 2011). 800-2500 m yükseklikte kayalık, taşlık yerlerde yetişmektedir. Ülkemizde İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yayılış göstermektedir (Davis, 1972; Sağıroğlu, 2005).



Şekil 1. *Ferula* Türlerinin Doğadaki Görünüşleri a: *Ferula rigidula*; b: *Ferula brevipedicellata*; c: *Ferula hermonis* (Fotoğraflar: Doç. Dr. Mehmet Sağıroğlu)

Ferula brevipedicellata Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman bitkisi haziran ayında çiçek açmakta, temmuz-ağustos aylarında ise meyve vermektedir. 1000-1300 metre yükseklikte kalkerli kayalık alanlarda *Ostrya carpinifolia*, *Quercus robur* subsp. *pedunculiflora*, *Franixus ornus*, *Micromeria cymuligera*, *Poa bulbosa*, *Iris* sp., *Astragalus* sp., *Bromus* sp., *Helichrysum* sp. gibi bitkilerle birlikte yetişmektedir (Sağıroğlu ve Duman, 2010).

Ferula hermonis Boiss. yaygın olarak "Shilsh-el-zallouh (Saçaklı kök)", "Hashishat-al-kattira (Bereket otu)" veya "The Lebanese viagra (Lübnan viagrası)" isimleriyle bilinen, Suriye ile Lübnan arasındaki Hermon Dağı'nda yetişen çalimsı bir bitkidir. 1300-1400 m yükseklikte kayalık alanlarda yetişmektedir (Sağıroğlu, 2005). Bitkinin tohumları ve kökleri uzun zamandır Orta Doğu'da hem erkek hem de kadınlar için cinsel isteksizlik, frijidite tedavisinde afrodisyak olarak kullanılmaktadır (Al-Ja'fari ve ark., 2011; Geroushi ve ark., 2011).

Ferula hermonis'in, Türkiye'de Hatay-Yayladađ yöresinde yayılış gösterdiği bilinmektedir (Davis, 1972). Ancak yapılan bir çalışmada bu bölgede bitki bulunamamış, başka bir lokaliteden (Maraş-Çağlayancerit) toplanmıştır (Sağıroğlu, 2005).

Ferula hermonis son yıllarda afrodisyak etkisinden dolayı viagraya alternatif bitkisel bir ürün olarak dikkatleri çekmiştir. Yapılan çalışmalar etkisinin viagra ile eş değer olduğunu gösterse de kızarıklık, baş ve mide ağrısı, görme bozuklukları, idrar yolu enfeksiyonları, kardiyovasküler komplikasyonları gibi yan etkileri ilaç haline gelmesinin önüne geçmiştir. Ancak buna rağmen bitki yetiştiiği ülkelerdeki birçok aktarda satılmaya devam etmektedir (Elouzi ve ark., 2008).

Tez çalışmasında kullanılan bu üç *Ferula* türünün teşhisine yardımcı botanik özellikleri **Çizelge 1**'de verilmiştir.

Çizelge 1. *Ferula hermonis*, *Ferula brevipedicellata* ve *Ferula rigidula*'nın Makroskobik Özelliklerinin Karşılaştırılması (Sağiroğlu, 2005)

Karakterler	<i>F. hermonis</i>	<i>F. brevipedicellata</i>	<i>F. rigidula</i>
Gövde uzunlukları	65-175 cm	100-250 cm	30-130 cm
Yaprak sapları	5-10 cm	10-20 cm	1-12 cm
Yaprak sapları ve orta damarlar	Tüysüz	Skabrit tüylü	Seyrek skabrit tüylü
Son segmentler	1-4(-9) x (0,2-)0,4-0,7 mm; tüysüz	(3-)7-12 x 1-2(-2,5) mm; tüylü-tüysüz	1-5(-8) x 0,2-0,8 mm; skabrit tüylü
Kınlar	Silindirik-oblong; 4-7 x 1-2 cm	Genişçe ovat; 7-12 x 5-8 cm	Ovat-oblong; 3-12 x 1,5-3 cm
Meyve sapları	4-7 mm	0,5-6 mm	(5-)7-15 mm
Merikarplar	Elips-oblong	Eliptik	Oblogtan ovata kadar
Sırttaki kanatlar	İpliksi	İpliksi ve dalgalı	Zayıfça ipliksi
Yandaki kanatlar	0,5-0,9 mm genişliğinde	0,5-1 mm genişliğinde	1-2 mm genişliğinde

Uçucu Yağlar Hakkında Genel Bilgiler

Uçucu yağlar aromatik bitkilerde sekonder metabolitler olarak bulunan, güçlü kokularıyla karakterize, kompleks yapılu sıvılardır. Bu karışımlar genel olarak sudan daha düşük yoğunlukta olan berrak ve nadiren renkli, yağda ve organik çözücülerde çözünen karışımlardır (Başer ve Demirci, 2007; Bakkali ve ark., 2008). "Uçucu yağ" teriminin ilk kez 16. yüzyılda İsviçreli bilim adamı Paracelsus von Hohenheim tarafından kullanıldığı düşünülmektedir (Burt, 2004). Genellikle ılıman iklime sahip Akdeniz ülkelerinin ve tropikal ülkelerin çeşitli aromatik bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar, bu ülkelerdeki geleneksel farmakopelerin önemli bir kısmını oluştururlar (Bakkali ve ark., 2008). Uçucu yağlar bitkilerin çiçekleri, herbaları, tomurcukları, meyveleri, ince dalları, gövde veya dal kabukları, kökleri, lateksleri ve reçineleri gibi kısımlarından elde edilirler (Lawal ve Ogunwande, 2013; Kavooşi ve Rowshan, 2013; Prabuseenivasan ve ark., 2006; Burt, 2004; Andrade ve ark., 2014). Bitkisel uçucu yağlar dışında, hayvansal kaynaklı (misk) ya da mikroorganizmalar tarafından üretilen uçucu yağlar da vardır (Schmidt, 2010; Lawal ve Ogunwande, 2013).

Uçucu yağların bileşiminde genellikle terpenler ve terpenlerin oksijenlenmiş türevleri (aromatik, alifatik asitler, esterler ve fenolik bileşikler) bulunur (Başer ve Demirci, 2007; Kavooşi ve Rowshan, 2013). Terpenler flavonoidler, kumarinler, fenolik bileşikler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren sekonder

metabolitlerdir. Terpenlerin hidrofobik iskelet yapıları ve hidrofilik fonksiyonel grupları (oksijenlenmiş terpenler) bu fitokimyasalların mikroorganizma ve memeli hücrelerinin membranlarından geçişlerini kolaylaştırır. Böylece sitoplazmaya geçiş için çeşitli enzim, reseptör, transkripsiyon faktörleri ile etkileşirler (Shakeria ve ark., 2014).

Uçucu yağlar genellikle Orta Çağ'da ilk kez Araplar tarafından geliştirilmiş olan su veya buhar distilasyonu ile elde edilirler (Bakkali ve ark., 2008; Schmidt, 2010). Bununla birlikte günümüzde elde edileceği materyalin doğal yapısına ve elde edilecek uçucu yağın özelliklerine uygun olarak sıkma, anfloraj, süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlerle elde edilebilmektedir. Uçucu yağların kaliteleri ve miktarları çevre, genetik, iklim koşulları, bitkinin beslenme durumu vb. faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Lawal ve Ogunwande, 2013).

Doğada uçucu yağlar antibakteriyal, antiviral, antifungal, insektisit gibi etkileri sayesinde bitkilerin korunmasında ve otçul hayvanların bitkilere olan iştahını azaltarak bitkilerin varlığını sürdürmesinde önemli rol oynar. Bunun dışında polen ve tohumların dağılımı için bazı böcekleri bitkiye çekebilirler (Bakkali ve ark., 2008). Antifungal, antiinflamatuar, analjezik, antidiyabetik, antidiyareik, antimutajenik, antibakteriyal, antiviral, antioksidan, antipiretik, sitotoksik, apoptotik, insektisidal gibi biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip uçucu yağlar günümüzde ilaç, sağlık, kozmetik, tarım, gıda sektörlerinde ve aromaterapide kullanılmaktadır (Başer ve Demirci, 2007; Lawal ve Ogunwande, 2013; Pavlovic' ve ark., 2012).

Bitkiler ve uçucu yağları, insanlık tarihinin en başından beri gıda ve içeceklerde yer almıştır. Bunun yanında kötü kokuların gizlenmesi, başka insanların hoş kokularla dikkatlerinin çekilmesi, sağlık problemlerinin giderilmesi, insanların ve hayvanların yaşam kalitesinin artırılması gibi tecrübeye dayanan kullanımları, bu ürünlerin kültürel ve ekonomik açıdan önemini gözler önüne sermektedir (Andrade ve ark., 2014).

***Ferula rigidula* DC. Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

Antibakteriyal etki

Ağaoğlu ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada otlu peynire katılan otlardan Heliz (*Ferula orientalis* L.) ve Siyabu (*Ferula rigidula*)'nun da içinde bulunduğu bazı bitkilerin dietileter ekstraktları, bazı patojen bakteriler üzerindeki inhibitör etkinliği araştırılmıştır. Bitkilerin dietil eter ekstraktları *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde disk difüzyon yöntemi ile *in vitro* olarak denenmiştir. Sonuç olarak; Heliz'in *P. aeruginosa*, *E. faecalis* ve *S. aureus* üzerinde inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. En zayıf inhibitör aktivite ise Sov (*Heracleum crenatifolium* Boiss.) ve Siyabu (*Ferula rigidula*)'da gözlenmiştir.

Antioksidan etki

Çelik ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada *F. rigidula* ve diğer otlu peynir yapımında kullanılan bitkilerin metanol ile hazırlanan ekstraktlarının total antioksidan kapasiteleri CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgenme antioksidan

kapasitesi analizi), FRAP (Demir indirgenme antioksidan kapasitesi analizi), ABTS/Persulfat ve Folin-Ciocalteu yöntemleri ile tespit edilmiştir. Yöntemlerin hepsi elektron transferi esasına dayandığı için paralel sonuçlar elde edilmiştir. Yöntemlerden elde edilen sonuçlara göre *Ferula rigidula*'nın antioksidan kapasitesi (CUPRAC= 0.07±0.003 mmol TR/g; FRAP= 0.04±0.001 mmol TR/g; ABTS= 0.03 ± 0.008 mmol TR/g; Folin-Ciocalteu= 0.21 ± 0.004 mmol TR/g) diğer bitkilere göre daha az bulunmuştur.

***Ferula brevipedicellata* Peşmen ex M. Sağıroğlu & H. Duman Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

Yapılan literatür taraması sonucunda bu türün botanik özelliklerinin ele alındığı makale (Sağıroğlu ve Duman, 2010) dışında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

***Ferula hermonis* Boiss. Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

Fitokimyasal çalışmalar

Diab ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *Ferula hermonis* bitkisinin köklerinin diklorometan ile ekstresi hazırlanmış ve kompozisyonu aydınlatılmıştır. Analiz sonucunda ekstrenin yüksek oranda jeşkenadiol türevlerinden oluşan seskiterpenlerden meydana geldiği belirlenmiştir. Bu bileşikler, yüksek miktarlarda bilinen dausun aril esterler ferutin (jeşkenadiol'ün *p*-hidroksi benzoat türevi [% 52]) ve teferidin (jeşkenadiol'ün benzoat türevi [% 30]); küçük miktarlarda ise jeşkenadiol'ün diğer aril esterleri ve 2,3-epoksit jeşkenadiol, α -bisabolol'dür.

Galal ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada ise *F. hermonis*'in kurutulmuş kökleri hekzan ile ekstre edilip, kolon kromatografisi ile bileşikler izole edilmiştir. Deneyler sonucunda 14-(4'-hidroksibenzoiloksi)daus-4,8-dien ile 14-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzoiloksi)daus-4,8-dien olmak üzere iki yeni ve jeşkenadiol *p*-hidroksibenzoat, jeşkenadiol benzoat, jeşkenadiol, epoksijeşkenadiol olmak üzere bilinen dört bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin tanımlanması, NMR (Nükleer manyetik rezonans) ve KS (Kütle spektrometresi) ile gerçekleştirilmiştir.

Bir diğer çalışmada *F. hermonis*'in tohumlarından 3'ü yeni olmak üzere 17 dausen esterinin izolasyonu ve yapı tayini gerçekleştirilmiştir. Bulunan yeni esterler 4 β -hidroksi-6 α -benzoil-7-dausen-9-on; 4 β ,8 β -dihidroksi-6 α -benzoil-daus-9-en ve 4 β ,9 α -dihidroksi-6 α -benzoil-daus-7-en sırasıyla feruhermonin A-C olarak isimlendirilmiştir (Auzi ve ark., 2008).

İbraheim ve arkadaşları (2012) bir çalışmasında *F. hermonis* kökü ekstresinden izole edilen 1'i yeni 17 dausun seskiterpen esteri bildirilmiştir. İzole edilen bileşiklerin yapı tayini spektroskopik yöntemlerle ve bilinen moleküllerle karşılaştırılarak yapılmıştır. Yeni bileşiğin relatif stereokimyasının belirlenmesinde 2D NOESY (iki boyutlu nükleer Overhauser etkisi spektroskopisi), en stabil ve düşük enerji gerektiren konfigürasyonu belirlenmesinde ise moleküler modelleme kullanılmıştır.

Aoun ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *F. hermonis* kök ekstresindeki α -tokoferol YBSK (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile belirlenmiştir. α -Tokoferol varlığı YBSK-UV (Ultraviyole dedektör) ve spektrofluorometre ile doğrulanmıştır. Her iki metot sonucu elde edilen veriler *F. hermonis* kök ekstresindeki α -tokoferol miktarının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir.

Biyolojik aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal etki

Galal ve arkadaşlarının (2001) *F. hermonis* ile gerçekleştirdiği aktivite deneylerinde 14-(4'-hidroksibenzoiloksi)daus-4,8-dien ve jeşkenadiol *p*-hidroksibenzoatın *Staphylococcus aureus* patojenine karşı % 50 inhibisyon konsantrasyon ($İK_{50}$) değerleri sırasıyla 1.5 ve 3.5 $\mu\text{g/mL}$; Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı ise sırasıyla 2.0 ve 4.0 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada *F. hermonis*'e ait ekstrelerin bazı patojenlere karşı etkisi antibiyotik diskler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Gram negatif bakterilerin en duyarlı oldukları örnek *F. hermonis*'in reçine ekstresi iken, gram pozitif bakterilerin en duyarlı oldukları örnek *F. hermonis*'in kök ekstresi olmuştur. Genel olarak *F. hermonis* ekstreleri, kullanılan antibiyotiklerle kıyaslandığında güçlü bir bakterisidal olarak bulunmuştur (Al-Ja'fari ve ark., 2011).

Yapılan diğer bir çalışmada *F. hermonis*'in kök ve rizomunun *n*-hekzan, diklorometan, metanol ve su ile hazırlanan ekstrelerinin agar disk difüzyon yöntemi ile patojenik ve fırsatçı funguslara karşı aktivitesi araştırılmıştır. *n*-Hekzan ve diklorometan ekstreleri *Microsporum gypseum* ve *Tricophyton mentagrophytes* dermafıterlerinin yanı sıra *Candida lactis-condensi* mayasına karşı yüksek aktivite göstermiştir. Bu iki ekstrenin agar kaplama biyootografi metodu kullanılarak hangi bileşiklerinin aktif olduğu tahmin edilmiş ve aktivite ile yönlendirilmiş fraksiyonları hazırlanmıştır. Bunun sonucunda da dausan aril esterleri olan jeşkenadiol *p*-hidroksi benzoat (ferutinin) ve jeşkenadiol benzoat (teferidin) tanımlanmıştır. Bu iki bileşik ile yapılan minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) deneyleri ile güçlü aktiviteleri kanıtlanmıştır. Özellikle *Tricophyton mentagrophytes*, 8-256 mg/mL MİK ve MFK konsantrasyonları arasında en duyarlı mikroorganizma olarak bulunmuştur (Al-Ja'fari ve ark., 2013).

İbraheim ve arkadaşları (2012) tarafından *F. hermonis* kökü ekstresinden izole edilen dausun seskiterpen esterleri ile *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *Candida albicans* SC5314 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite çalışması yapılmıştır. Jeşkenadiol benzoat (teferidin), jeşkenadiol *p*-hidroksibenzoat (ferutinin) ve jeşkenadiol vanillat (teferin) *S. aureus*, *B. subtilis*, *Mycobacterium* suşları, *M. bovis* BCG ve *M. tuberculosis* H37Rv'e karşı önemli derecede aktif bulunmuştur. İzole edilen bileşiklerden hiçbirisi anlamlı bir antifungal aktivite göstermemiştir. Yapılan antioksidan çalışmasında da izole edilen bileşikler arasından en yüksek aktiviteye teferidin, ferutinin ve teferinin sahip olduğu görülmüştür.

Kuete ve arkadaşları (2012) Mısır'da tıbbi bitki olarak kullanılan 16 bitkinin ekstraları ile yaptıkları antibakteriyel aktivite çalışmalarını yayınlamışlardır. Broth mikrodilüsyon yöntemi ile *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* türlerine ait 12 bakteri suşu ile örneklerin MİK belirlenmiştir. MİK belirleme deneyleri sonucunda örneklerin en az bir bakteri türüne karşı etkili olduğu görülmüş, en etkili örnekler *F. hermonis* ve *Vitis vinifera* L. sırasıyla % 91.7 ve % 83.3 oranlarında aktivite göstermiştir. Çalışma sonucunda genel olarak çalışmada incelenen bitki ekstralarının kullanımlarını (özellikle *F. hermonis* ve *Vitis vinifera*- bakteriyel enfeksiyonların tedavisi) destekler yönde veriler elde edilmiştir.

Sitotoksik etki

Ferula hermonis ile yapılan bir sitotoksikite çalışmasında, bitkinin petrol eteri ve etil asetat ile hazırlanan kök ekstralarının insan mide kanseri hücre hattı (SCL-40) üzerinde bir tetrazolium boyası olan MTT ile antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Deney sonuçları petrol eteri ekstresinin diğerlerine göre daha aktif olduğunu göstermiştir. Daha önceki çalışmalarda petrol eteri ekstresinin majör olarak seskiterpenleri içerdiği bildirilmiştir. Buradaki aktiviteden de seskiterpenlerin sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Elouzi ve ark., 2008).

Kuete ve arkadaşları (2012) Mısır'da tıbbi bitki olarak kullanılan 16 bitkinin ekstraları ile yaptıkları sitotoksikite çalışmalarını yayınlamışlardır. Ayrıca bu çalışmada *F. hermonis*'ten antiproliferatif bir bileşik olan jeşkenadiol *p*-hidroksibenzoat (FH-25) izole edilmiştir. Pankreas kanseri hücre hattı MiaPaCa-2, meme kanseri hücre hattı MCF-7, lösemi hücre hattı CCRF-CEM ve ilaçlara dirençli hücre hattı CEM/ADR5000 ile resazurin yöntemi kullanılarak sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir. *F. hermonis*'in 4 hücre hattı için de İK₅₀ değerleri 20 µg/mL'nin altında bulunmuştur. FH-25'in de MCF-7 hücrelerine karşı oldukça iyi bir aktivite gösterdiği bulunmuştur (İK₅₀: 2.47 µg/mL). Çalışma sonucunda genel olarak çalışmada incelenen bitki ekstralarının kullanımlarını (jeşkenadiol *p*-hidroksibenzoat (FH-25)- kanser tedavisi) destekler yönde veriler elde edilmiştir.

Antienflamatuar etki

Seskiterpen esterleri ile yapılan bir *in vivo* çalışmada *F. hermonis*'in kök ekstresinden izole edilen ferutin, teferin ve teferidin olmak üzere 3 majör dausen esterleri ile sıçanlarda karragen ile indüklenmiş ödem modeli ile antienflamatuar aktivite çalışılmıştır. Ferutin, teferin bileşiklerinde antienflamatuar etki 100 mg/kg dozda gözlenmiş, teferidinde ise antienflamatuar etki gözlenmemiş aksine karragen enjeksiyonundan 2-3 saat sonra önemli bir proinflamatuar etki oluşturmuştur. Yapılan çalışmalar *F. hermonis*'in halk arasındaki baş ağrısı, artrit gibi ağrılı durumlarda kullanılışını destekler şekildedir (Geroushi ve ark., 2011).

Afrodizyak etki

Geleneksel olarak afrodizyak kullanımına ithafen yapılan çalışmaların birinde *F. hermonis* kök ekstraları ile sildenafil'in erkek sıçanlarda çiftleşme davranışları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *F. hermonis*'in farklı çözücülerle hazırlanan kök ekstraları oral yolla akut olarak uygulanmıştır. İncelenen parametrelerde ekstralara göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Polar çözücülerle yapılan (metanol ve su)

ekstrelerdeki pozitif etkinin daha fazla olması, biyolojik aktivitenin polar bileşiklerden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür ve *F. hermonis*'in halk arasında afrodizyak etkisi için su ile hazırlanan dekoksinyonunun kullanılmasını destekler yöndedir (Hadidi ve ark., 2003).

Bitkinin afrodizyak etkisinin incelendiği çalışmalar arasında Zanoli ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir dizi çalışmadan bahsedilebilir. Bu çalışmaların birinde seksüel açıdan potent ve impotent olan erkek sıçanlara *F. hermonis* ekstreleri oral yolla akut ve subkronik olarak uygulanmıştır. Akut uygulamada her iki grupta da olumlu etki gözlenmiş ve çiftleşme performansları artmıştır. Buna paralel olarak serum testosteron düzeyleri de yükselmiştir. Ancak bu etkiler impotens sıçanlarda daha yüksek dozda gözlenmiştir. Ekstrelerin subkronik uygulamasında (10 gün) sıçanların ejakülasyon yüzdelerinde belirgin bir azalma ve çiftleşme düzenlerinde bozulma gözlenmiştir. Bununla birlikte serum testosteron düzeyleri de kontrol gruplarına kıyasla önemli düzeyde azalmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar ışığında *F. hermonis*'in cinsel işlev bozukluklarında akut kullanımı tavsiye edilebilirken, tekrarlanan kullanımı tavsiye edilmemiştir (Zanoli ve ark., 2003).

Yine Zanoli ve arkadaşları (2005a) tarafından yapılan başka bir çalışmada *F. hermonis*'in kök ekstresinin dişi sıçanlardaki seksüel davranışlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ovariectomi uygulanmış, östradiol benzoat ve progesteron tedavisi gören dişi sıçanlar ile yapılan çalışmada ekstre oral yolla akut veya subkronik (10 gün) olarak uygulanmıştır. Akut veya subkronik uygulama sonunda beklenen cevaplarda kontrol gruplarına göre belirgin bir azalma görülmüştür. Çalışma sonunda *F. hermonis* kök ekstresinin dişilerde seksüel davranışları olumsuz etkilediği kanısına varılmıştır. Bu etkinin ekstrenin hormon tedavisi gören dişilerde bir antiöstrojenik aktivite gösterme ihtimaline bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında ise *F. hermonis*'in ekstresinden elde edilen ferutinin, teferdin ve teferin bileşikleri oral yolla akut ve subkronik olarak erkek sıçanlara uygulanmıştır. Teferdin ve ferutinin bileşikleri akut uygulandığında potent ve impotent sıçanlarda seksüel davranışları artırmış, ejakülasyon süresini kısaltmış ve testosteron düzeylerinde artışa neden olmuştur. Ancak teferdin, ferutinin subkronik uygulamalarında seksüel davranışlar olumsuz etkilenmiş ve testosteron düzeyleri azalmıştır. Teferin uygulamalarında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmamıştır (Zanoli ve ark., 2005b). Bir diğer çalışmada ise ferutinin, teferdin ve teferin bileşiklerinin dişi sıçanlarda cinsel işlev bozukluklarına etkileri incelenmiştir. Ovariectomi uygulanmış, östradiol benzoat ve progesteron tedavisi gören dişi sıçanlar ile yapılan çalışmada çeşitli seksüel davranışlar test edilmiştir. Genel olarak üç bileşiğin de seksüel motivasyonu etkilemedikleri görülmüştür. Ancak ferutinin bileşiğinin dişi sıçanların çiftleşme duyarlılıklarını önemli ölçüde azalttığı için ovariectomi uygulanmış, östradiol benzoat ve progesteron tedavisi gören dişi sıçanlarda antiöstrojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. (Zavatti ve ark., 2006).

Uçucu yağ çalışmaları

Yapılan bir çalışmada *F. hermonis*'in köklerinden elde edilen uçucu yağın GK/KS ile kompozisyonun sadece % 61'i aydınlatılmış; başta α -bisabolol (% 23) ve α -

farnesen (% 12.7) olmak üzere 7 bileşen tanımlanmıştır. Ayrıca uçucu yağın *Aspergillus niger*, *A. flavus* ve *Fusarium oxysporum*'a karşı zayıf aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Al-Ja'fari ve ark., 2011).

Hilan ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada *F. hermonis*'in uçucu yağının bileşenleri ilk defa detaylı aydınlatılmıştır. Uçucu yağlar çiçek tomurcukları, kökler ve tohumlardan elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağlarda sırasıyla % 38, % 31 ve % 51.3 oranlarında α -pinen ana bileşik olarak belirlenmiştir. Ayrıca *F. hermonis*'e ait uçucu yağların bazı patojenlere karşı etkisi antibiyotik diskler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Uçucu yağların karşılaştırılan antibiyotiklere göre çok daha güçlü antibakteriyal etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Al-Ja'fari ve arkadaşlarının (2011) yapmış oldukları bir çalışmada bitkinin rizom ve köklerinden elde edilen uçucu yağın analizi yapılmış ve biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyon çalışmaları sonucunda farklı aktif ürünler elde edilmiştir. Bu ürünler arasında olan 3,5-nonadiyn, α -bisabolol ve % 73 jeşkenadiol benzoat içeren fraksiyonlar *Microsporum gypseum* ve *Tricophyton mentagrophytes* dermafütlerine karşı en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Özellikle jeşkenadiol benzoatlı fraksiyonun MİK ve MFK değerlerinin pozitif kontrollere eş değer ya da daha iyi olduğu görülmüştür.

***Ferula* L. Türleri Üzerinde Yapılan Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları**

Yapılan çalışmalar **Çizelge 2**'de derlenmiştir.

***Ferula* L. Türleri Üzerinde Yapılan Uçucu Yağların Biyolojik Aktivite Çalışmaları**

Yapılan biyolojik aktivite çalışmaları **Çizelge 3**'te derlenmiştir.

Çizelge 2. Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları

Tür	Toplandığı yer/yıl	Kullanılan kısım	Ana bileşikler (%)	Kaynaklar
<i>Ferula glauca</i> L.	Orta İtalya: Caldarola, Pioraco, Pergola/2007	Yaprak	(<i>E</i>)-Karyofillen (24.9), karyofillen oksit (14.3), germakren D (5.7)	*Maggi ve ark., 2009b
		Çiçek	α -Pinen (11.7), mirsen (13.6), germakren D (14.2), (<i>E</i>)-karyofillen (8.2)	
		Meyve	α -Pinen (24.2), β -pinen (14.7)	
		Kök	(<i>E</i>)- β -Farnesen (10.0), elemisin (9.0), miristisin (7.4)	
<i>Ferula asa-foetida</i> L.	Orta İran: Kerman/1996	Taze zamk	(<i>E</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (58.9), (<i>Z</i>)- β -osimen (11.9), (<i>E</i>)- β -osimen (9.0), β -pinen (5.0), (<i>Z</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (3.9)	*Sefidkon ve ark., 1998
	İran: Yazd/2009	Tohum	Bis [(1-metiltiyo) propil] disülfid (19.4), (<i>Z</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (23.9), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (18.8)	*Mirzaei ve Hasanloo, 2012
	İran: Kohsorkhe-kasmar/2009	Tohum	Bis [(1-metiltiyo) propil] disülfid (11.0), (<i>Z</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (23.0), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (25.5)	
	İran: Sari ormanı/2007	Topraküstü kısım	Fenol, 2-metil-5-(1-metiletil) (18.2), α -bisabolol (10.4), siklopropa[<i>a</i>]naftalen-oktahidro-tetrametil- (6.6), arsin trietil (8.7)	Dehpour ve ark., 2009
	İran: Kerman/2002	Topraküstü kısım	(<i>E</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (40.0), germakren B (7.8), α -pinen (5.9), β -pinen (5.0), (<i>Z</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (8.7)	*Khajeh ve ark., 2005
<i>Ferula behboudiana</i> Rech. f. & Esfand	İran: Abdanan/2007	Topraküstü kısım	1-Sek-butil-2-[(<i>E</i>)-3-(metiltiyo)prop-1-enil] disülfan ve 1-sek-butil-2-[(<i>Z</i>)-3-(metiltiyo)prop-1-enil] disülfan (59.4), glubolol (12.5), α -pinen (8.8), α -bisabolol (6.1), β -pinen (3.9)	*Yousefi ve ark., 2011
<i>Ferula communis</i> L.	Fransa: Korsika/1999	Yaprak, çiçek ve çiçek sapı	Mirsen (53.5), aristolen (8.5), α -pinen (6.6), (<i>E,E</i>) farnesol (4.3), β -felandren (4.2)	*Ferrari ve ark., 2005

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 2. (Devam) Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları

<i>Ferula elaeochytris</i> Korovin	Türkiye: Konya/1998	Meyve	Nonan (27.1), α -pinen (12.7), germakren B (10.3)	Başer ve ark., 2000
<i>Ferula ferulaoides</i> Korovin	Moğolistan: Altay dağları/2001	Kök	Guayol (58.8), (<i>E</i>)-nerolidol (10.2), α -ödesmol (3.1)	Shatar, 2005
<i>Ferula flabelliloba</i> Rech. f. & Aell.	İran: Khorassan/1996	Topraküstü kısmı	α -Pinen (10.0), δ -kadinen (13.2), α -kadinol (12.0), kadina-4,1(10)dien- β -ol (10.9)	*Rustaiyan ve ark., 2001b
	İran: Binalood dağı/2007	Meyve	10- <i>epi</i> - γ -ödesmol (14.1), β -dihidroagrofuran (13.3), α -bisabolol (9.9), guayol asetat (4.3), hinesol (3.6), germakren D (3.2), fenil asetat (3.0), β -akorenol (3.0)	*Iransahi ve ark., 2008c
<i>Ferula gummosa</i> Boiss.	İran: Kashan/1999	Zamk ve Lateks	β -Pinen (58.8), δ -3-karen (12.1), α -pinen (5.7), β -mirsen (4.6)	*Ghannadi ve ark., 2002
<i>Ferula latisecta</i> Rech. f. & Aell.	İran: Khorasan- Razavi/2006	Yaprak	(<i>Z</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (35.2), α -kadinol (10.7), junisedrol (10.0), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (8.8), <i>epi</i> - α - bisabolol (5.1), δ -kadinen (3.9), germakren D-4-ol (3.6), di- <i>sek</i> - butil disülfid (2.1)	*Iransahi ve ark., 2009b
	İran: Khorasan- Razavi/2006	Kök	(<i>Z</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (50.5), seskuisineol-2-on (7.2), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (6.2), δ -kadinen (2.9)	*Iransahi ve ark., 2010
<i>Ferula lutea</i> Poiret	Cezayir: Constantine/2010	Topraküstü kısmı	2,3,6-Trimetilbenzaldehit (25.0), <i>cis</i> -krizantenol (20.8), α -pinen (10.9), timol (10.2)	*Chibani ve ark., 2012
<i>Ferula macrocolea</i> (Boiss.) Boiss.	İran: Fasham/2000	Topraküstü kısmı	β -Pinen (15.9), α -pinen (10.4), β -karyofillen (8.6)	Rustaiyan ve ark., 2005
	İran: Gardaneh, Kandvan ve Chalous/2001	Topraküstü kısmı	α -Pinen (19.2), nonan (13.2), β -pinen (13.0), limonen (5.4)	*Akhgar ve ark., 2005
<i>Ferula hirtella</i> Boiss.	İran: Moteh, Delijan/2001	Topraküstü kısmı	α -Pinen (15.4), timol (14.9), sitronelol (6.4), β -pinen (5.9)	
<i>Ferula oopoda</i> (Boiss. & Buhse) Boiss.	İran: Zarand dağı/2009	Yaprak	β -Fellandren (22.4), timol metil eter (15.3), mirsen (8.7), germakren D (8.4)	*Akhgar ve ark., 2011
		Tohum	β -Fellandren (28.2), mirsen (36.1), germakren D (5.5)	

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 2. (Devam) Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analiz Çalışmaları

<i>Ferula badghysi</i> (Korovin)	İran: Zarand dağı/2009	Yaprak	β -Fellandren (21.7), timol metil eter (13.8), mirsen (13.5), germakren D (4.7), α -yılanen (11.3)	*Akhgar ve ark., 2011
		Tohum	β -Fellandren (24.1), mirsen (32.8), germakren D (6.8)	
<i>Ferula ovina</i> (Boiss.) Boiss.	İran: Hezarmasjed dağı/2007	Meyve	α -Pinen (37.4), β -fellandren (10.8), izobornil asetat (9.2), α -fenken (8.9), mirsen (5.8), γ -elemen (4.6), β -pinen (4.1)	*Iranshahi ve ark., 2008b
		İran: Taleghan/2008	Taze topraküstü kısmı	α -Pinen (15.2), limonen (16.9), β -mirsen (7.7), <i>cis</i> - β -osimen (6.1), izosilvestren (5.1), β -pinen (4.4)
	Kurutulmuş topraküstü kısmı		α -Pinen (20.2), spatulenol (9.6), germakren D (6.3), β -karyofillen (5.1), α -terpineol (5.0), karyofillen oksit (4.4)	
<i>Ferula persica</i> Wild.	İran: Alborz dağları/2002	Topraküstü kısmı	Dill-apiol (57.3), elemisin (5.6), limonen (4.4)	*Javidnia ve ark., 2005
<i>Ferula persica</i> Wild. var. <i>persica</i>	İran: Tehran/2002	Kök	Dimetil trisülfid (18.2), miristisin (8.9), dimetil tetrasülfid (7.6)	*Iranshahi ve ark., 2006
<i>Ferula stenocarpa</i> Boiss. & Hausskn	İran: Gachsaran/1993	Topraküstü kısmı	α -Pinen (48.8), β -pinen (30.1)	*Rustaiyan ve ark., 2001a
<i>Ferula szowitsiana</i> DC.	İran: Gardaneh Ahovan/2003	Topraküstü kısmı	α -Pinen (12.6), germakren D (12.5), β -pinen (10.1), <i>epi</i> - α -kadinol (8.9)	*Habibi ve ark., 2006a
<i>Ferula latisecta</i> Rech. f. & Aell.	İran/Belirtilmemiştir	Topraküstü kısmı	(<i>Z</i>)-Osimenon (32.4), (<i>E</i>)-osimenon (20.3), <i>cis</i> -pinokarvon (11.4)	*Habibi ve ark., 2006b
<i>Ferula galbaniflua</i> Boiss. & Buhse	İran: Tahran/1996	Gövde	β -Pinen (46.4), <i>cis</i> -Krisantenil asetat (6.1), (<i>E</i>)-nerolidol (5.2)	*Rustaiyan ve ark., 2002
		Kök	β -Pinen (48.8), mirsen (3.7), α -pinen (2.6)	

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 3. Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analizleri ve Biyolojik Aktivite Sonuçları

Tür	Toplandığı yer/yıl	Kullanılan kısım	Ana bileşikler (%)	Biyolojik aktivite	Aktivite sonucu	Kaynaklar
<i>Ferula glauca</i> L.	İtalya: Pioraco/2007	Yaprak	(<i>E</i>)-Karyofillen (24.9), karyofillen oksit (14.3), germakren D (5.7)	Antimikrobiyal aktivite	Genel olarak orta derecede bir antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir.	*Maggi ve ark., 2009b
		Çiçek	α -Pinen (11.7), mirsen (13.6), germakren D (14.2)			
		Meyve	α -Pinen (24.2), β -pinen (14.7)			
		Kök	(<i>E</i>)- β -Farnesen (10.0), miristisin (7.4), elemisin (9.0)			
<i>Ferula asa-foetida</i> L.	İran: Larestan dağları/2011	Uçucu yağ zambak reçine karışımı 1 (UZR1) 15 Haziran 2011	(<i>E</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (23.9), 10- <i>epi</i> - γ -ödesmol (15.1), (<i>Z</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (8.1)	Antimikrobiyal aktivite Antimikrobiyal etkinlik sıralaması: UZR3>UZR2>UZR1 Antioksidan aktivite Antioksidan etkinlik sıralaması: UZR1>UZR2>UZR3	Kavoosi ve Rowshan, 2013a	
		Uçucu yağ zambak reçine karışımı 2 (UZR2) 30 Haziran 2011	(<i>Z</i>)-1-Propenil sek-butil disülfid (27.7), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butil disülfid (20.3), α -pinen (10.8), β -pinen (10.2)			
		Uçucu yağ zambak reçine karışımı 3 (UZR3) 15 Temmuz 2011	α -Pinen (21.3), β -pinen (47.1)			
<i>Ferula gumosa</i> Boiss.	Marketten temin edilmiştir.	Uçucu yağ zambak reçine karışımı	Sabinen (40.1), α -pinen (14.3), β -pinen (14.1), <i>p</i> -simen (8.5), α -tuyen (8.1)	Antimikrobiyal aktivite	Antibakteriyel aktivite, test edilen gram pozitif bakterilerde gram negatif bakterilere göre daha fazladır.	Abedi ve ark., 2008

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 3. (Devam) Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analizleri ve Biyolojik Aktivite Sonuçları

<i>Ferula heuffelii</i> Griseb. ex Heuffel	Sırbistan: Djerdap Gorge/2008	Toprakaltı kısmı	Elemisin (35.4), miristisin (20.6)	Antimikrobiyal aktivite	<i>Candida albicans</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> 'e karşı kayda değer aktivite gözlenmiştir.	*Pavlovic' ve ark., 2012
				Antioksidan aktivite	Önemli ölçüde antioksidan aktivite gözlenmiştir.	
<i>Ferula badrakema</i> Kos.-Pol.	İran: Tandoreh Milli Parkı/2005	Meyve	β -Pinen (45.8), α -pinen (10.9), <i>cis</i> -izolongifolanon (4.1), β -fellandren (2.7), mirsen (2.4), karvakrol metil eter (2.4)	Antimikrobiyal aktivite	Test edilen gram pozitif bakterilere ve fungusa karşı orta derecede aktif olduğu, gram negatif bakterilere karşı ise etkisiz olduğu gözlenmiştir.	*Iranshahi ve ark., 2009a
<i>Ferula latisecta</i> Rech. f. & Aell.	İran: Khorasan-Razavi/2006	Meyve	(<i>Z</i>)-1-Propenil sek-butül disülfid (65.2), (<i>E</i>)-1-propenil sek-butül disülfid (6.8), di-sec-butül disülfid (2.1)	Antimikrobiyal aktivite	<i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı orta dereceli, <i>Candida albicans</i> 'a karşı nispeten güçlü bir etkiye sahiptir.	Iranshahi ve ark., 2008a
<i>Ferula lycia</i> Boiss.	Türkiye: Antalya/2007	Topraküstü kısmı	α -Pinen (59.9), β -pinen (19.0), limonen (3.2), bornil asetat (2.10)	Antimikrobiyal aktivite	17 bakteriden 7 tanesinde aktivite gözlenmiş, ancak bunların 6 tanesinde antibiyotiklerden daha az aktivite gözlenmiştir.	Köse ve ark., 2010
				Antioksidan aktivite	Zayıf derecede antioksidan aktivite gözlenmiştir.	
<i>Ferula microcolea</i> (Boiss.) Boiss	İran: Lorestan/2009	Topraküstü kısmı	α -Pinen (27.3), β -pinen (16.4), nonanal (8.7), β -karyofillen (8.5), timol (6.7)	Antioksidan aktivite	Orta derecede antioksidan aktivite gözlenmiştir.	*Amiri, 2014
<i>Ferula orientalis</i> L.	Türkiye: Sivas/2001	Topraküstü kısmı	β -Fellandren (23.6), (<i>E</i>)- β -osimen (13.8), α -pinen (12.5), α -fellandren (11.5)	Antioksidan aktivite	Zayıf derecede antioksidan aktivite gözlenmiştir.	*Kartal ve ark., 2007

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 3. (Devam) Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analizleri ve Biyolojik Aktivite Sonuçları

<i>Ferula szowitsiana</i> DC.	İran: Khoy/2004	Gövde/Yaprak	Neril asetat (33.0), α -pinen (8.0), β -karyofillen (8.9), β -pinen (6.7)	Antimikrobiyal aktivite	Test edilen bakterilerden en duyarlı olan <i>Bacillus subtilis</i> 'tir. Diğer gram pozitif bakterilere karşı daha zayıf etkinlik gözlenmiştir. Gram negatif bakterilerde veya funguslarda ise aktivite zayıftır.	*Dehghan ve ark., 2007
		Çiçek/Meyve	Neril asetat (41.5), bisiklogermakren (9.0), α -pinen (5.5)			
	Türkiye: Erzincan/2004	Gövde	β -Ödesmol (29.5), α -ödesmol (16.6), α -pinen (6.4)	Antimikrobiyal aktivite	Antibakteriyel etkinin antifungal etkiden daha fazla olduğu gözlenmiştir. En iyi aktivite Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı elde edilmiştir.	*Özek ve ark., 2008
		Yaprak	β -Ödesmol (32.0), α -ödesmol (18.2), α -pinen (8.6)			
<i>Ferula vesceritensis</i> Coss et Dur.	Cezayir: Ghardaia/2010	Topraküstü kısmı	5,9-Tetradekadin (24.7), germakren D (24.5), farnesen (8.6), α -bisabolen (8.6)	Antibakteriyel aktivite	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> ve <i>Klebsiella pneumonia</i> 'ya karşı güçlü antibakteriyel aktivite gözlenmiştir.	Zellagui ve ark., 2012
	Cezayir: Ghardaia ve Azzazga/2010	Yaprak	Viridiflorol (13.4), δ -kadinen (10.1), farnesol (8.1)	Antioksidan aktivite	Orta derecede antioksidan aktivite gözlenmiştir.	*Benchabane ve ark., 2012
<i>Ferula asa-foetida</i> L.	İran: Darab dağları/ Belirtilmemiştir	Lateks	(<i>E</i>)-1-Propenil sek-butyl disülfid (62.7), β -osimen (21.7), β -pinen (5.0)	Antioksidan aktivite	Antioksidan aktivite gözlenmemiştir.	Kavoosi ve ark., 2012
<i>Ferula gummosa</i> Boiss.	Belirtilmemiştir	Uçucu yağ zamlı reçine karışımı	β -Pinen (62.7), α -pinen (9.5), δ -karen (7.5)	Antimikrobiyal aktivite	Zayıf antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir.	Mahboubi ve ark., 2014

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

Çizelge 3. (Devam) Bazı *Ferula* Türlerine Ait Uçucu Yağ Analizleri ve Biyolojik Aktivite Sonuçları

<i>Ferula gummosa</i> Boiss.	İran: Tahran/2003	Tohum	β -Pinen (50.1), α -pinen (18.3), 3-karen (6.7), α -tuyen(3.3), sabinen (3.1)	Antibakteriyal aktivite	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı antibakteriyal aktivite gözlenmiştir. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya karşı zayıf aktivite gözlenmiştir.	Eftekhar ve ark., 2004
<i>Ferula asa-foetida</i> L.	Hindistan/Belirtilmemiştir	İrani-Uçucu yağ zatk reçine karışımı	(Z)-1-Propenil sek-butil disülfid (14.4), (E)-1-propenil sek-butil disülfid (28.8), 1-(1-propeniltiyo) propil metil disülfid (10.1)	Antimikrobiyal aktivite	Pathani uçucu yağı iyi bir antibakteriyel aktiviteye, İrani uçucu yağı ise iyi bir antifungal aktiviteye sahip bulunmuştur.	Divya ve ark., 2014
		Pathani- Uçucu yağ zatk reçine karışımı	(E)-1-Propenil sekbutil disülfid (56), 1-(1-propeniltiyo) propil metil disülfid (16.9), 1,2-ditiyolan (5.7)			

*Analizde alev iyonlaşma dedektörü kullanılmıştır.

GEREÇLER

Bitkisel Materyaller

Çalışmalarda kullanılan *Ferula* L. türlerine ait toplanma bilgileri şöyledir:

Çizelge 4. Bitkisel Materyallere Ait Bilgiler

Kod	Tür	Toplandığı Yer	Tarih	Toplayıcı Kodu	Bitkinin Bulunduğu Herbaryum
Fh	<i>Ferula hermonis</i> Boiss.	C6 Maraş: Çağlayancerit-Maraş yolu, 1450 m	30.08.2002	MS2246	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Fb	<i>Ferula brevipedicellata</i> Peşmen ex. M.Sagiroglu & H.Duman	B9 Bitlis: Hizan-Bahçesaray yolu 19.km, 1100 m	01.09.2002	MS2252	
Fr	<i>Ferula rigidula</i> DC.	B5 Malatya: Doğanşehir-Polat köyü, 1180 m	31.08.2002	MS2249	

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

n-Hekzan (Merck, Almanya)

Dietil eter (Merck, Almanya)

RPMI 1640 besiyeri (Sigma-Aldrich, Almanya)

[3-(N-morfolino) propan sülfonik asit] (MOPS) (Sigma-Aldrich, Almanya)

1 Molar NaOH çözeltisi

Mueller Hinton Broth 2 (MHB 2) besiyeri (Sigma-Aldrich, Almanya)

Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri (Merck, Almanya)

Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri (Merck, Almanya)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Biomatik, Amerika Birleşik Devletleri)

Ampisilin (Deva, Türkiye)

Kloramfenikol (Deva, Türkiye)

Amfoterisin B (Sigma-Aldrich, Almanya)

Ketokonazol (Sigma-Aldrich, Almanya)

Resazurin (Sigma-Aldrich, Almanya)

% 85'lik steril NaCl çözeltisi

Metanol, susuz % 99.8 (Sigma-Aldrich, Almanya)

Gallik asit (Sigma-Aldrich, Almanya)

C Vitamini (Sigma-Aldrich, Almanya)
1,1-Difenil-2-2, pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Almanya)
Fetal Bovine Serum (FBS) (Wisent, Kanada)
Penisilin-Streptomisin (Wisent, Kanada)
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biomatik, Amerika Birleşik Devletleri)
Tripsin EDTA çözeltisi (10X) (Wisent, Kanada)
Trypan blue solüsyonu (Biorad, Amerika Birleşik Devletleri)
XTT Tetrazolium hidrokisit sitotoksisite kiti (Xenometrix, İsviçre)
AMES MPF™ 98/100 genotoksisite kiti (Xenometrix, İsviçre)
Glukoz-6 fosfat (Sigma-Aldrich, Almanya)
Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat sodyum tuzu (Sigma-Aldrich, Almanya)
Mikrozomal sıçan karaciğer S9 enzimi (Xenometrix, İsviçre)
Magnezyum klorür (Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum dihidrojen fosfat (Sigma-Aldrich, Almanya)
Potasyum klorür (Sigma-Aldrich, Almanya)
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Aletler
Clevenger apareyi (İldam)
GK Sistem (Gaz Kromatografisi) (Agilent 6890 N GC)
GK/KS Sistem (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi) (Agilent 5975 GC-MSD)
Hassas terazi (Ohaus, Amerika Birleşik Devletleri)
pH metre (WTW Inolab)
Otoklav (Hirayama HV-50, Japonya)
Vorteks karıştırıcı (İka Genius 3, Almanya)
İnkübatör (Incucell, Almanya)
Steril Kabin (Esco EN1822)
Densitometre (Biosan, Letonya)
ELISA okuyucu (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri)
HERAcell 150 Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific)
Steril çalışma kabini (Heal Force, Çin)
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Amerika Birleşik Devletleri)
Hücre Sayım Cihazı (Biorad, Amerika Birleşik Devletleri)
Su banyosu (Wise Clean, Almanya)

Ters mikroskop (Leica, Almanya)

Çalkalamalı inkübatör (Lab companion, Amerika Birleşik Devletleri)

YÖNTEMLER

Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Oda sıcaklığında bitkilerin gölgede kurutulmuş meyvelerinin uçucu yağları, Clevenger apareyi kullanılarak 3 saat su distilasyonu işlemi sonucunda elde edilmiştir.

Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Şartları

Uçucu yağların kompozisyonları GK ve GK/KS sistemlerinin eş zamanlı analizleri ile aydınlatılmıştır. GK analizi Agilent 6890N GC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizde Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm) ve taşıyıcı gaz olarak Helyum (0,8 ml/dak) kullanılmıştır. GK fırın sıcaklığı 10 dk 60°C'de 4°C/dk artışla 220°C'ye arttırılıp 10 dk tutulmuştur ve sonra 1°C/dk artışla 240°C'ye çıkarılmıştır. FID dedektör sıcaklığı ise 300°C olarak ayarlanmıştır. Bileşiklerin relatif oranları FID kromatogramdan bilgisayar yardımıyla hesaplanmıştır. GK kolonda ayrılan uçucu bileşikler daha sonra dedektör görevi gören kütle spektrometrisinde her birinin tek tek kütle spektrumları alınarak tanımlanmıştır.

GK/KS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşenlerin ayrımı için Innowax FSC kolon (60 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 µm), taşıyıcı gaz olarak Helyum (0,8 ml/dak) kullanılmıştır. GK fırın sıcaklığı 10 dk 60°C'de 4°C/dk artışla 220°C'ye arttırılıp 10 dk tutulmuştur ve sonra 1°C/dk artışla 240°C'ye çıkarılmıştır. Split oranı 40:1 olarak uygulanmıştır. Kütle spektrumları 70 eV enerjisiyle alınmıştır. Kütle değerleri m/z 35 ile 450 arasında kaydedilmiştir. *n*-Alkanlar referans alınarak maddelerin kolondaki tutunma indeksleri (RRI) hesaplanmıştır.

Bileşenlerin analizleri için "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi", Wiley ve MassFinder 3.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989; Koenig ve ark., 2004).

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Mikroorganizmaların canlandırılması

-20°C'de 1.5 ml % 15'lik steril gliserol çözeltisi içinde bulunan bakteriler oda sıcaklığında eritilerek Mueller Hinton Agar (MHA) katı besiyerine ekilip stok petriyerler hazırlanmıştır. Mayalar ve bakterilerin bir kısmı ise 4°C'de saklanan katı besiyerindeki stoklarından alınmıştır.

Deney öncesinde bakteriler stok petriyerlerden MHA, mayalar ise Potato Dextrose Agar (PDA) katı besiyerine ekilmiştir. 35-37°C'deki inkübatörde 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında bakterilerin Mueller Hinton Broth 2 (MHB 2) sıvı besiyerine geçişi yapılmış ve yine 35-37°C'deki inkübatörde 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Kodu	Adı	Kaynak
B 1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008
B 2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
B 3	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
B 4	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711
B 5	<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B-4378
B 6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145
F 1	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
F 2	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 1369

Çizelge 5. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar

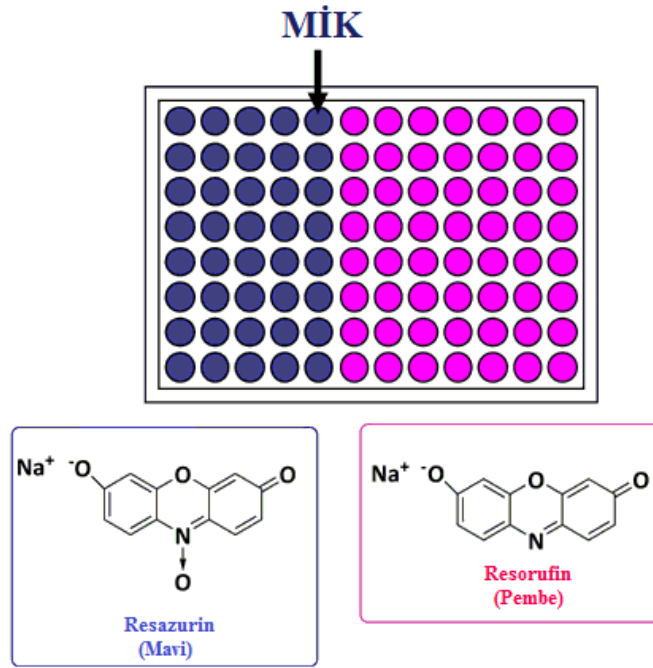
Mikrodilüsyon yöntemi ile antibakteriyel ve antifungal etkinin belirlenmesi

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI veya eski adıyla NCCLS) tarafından yayınlanan aerobik mikroorganizmalar için kullanılan mikrodilüsyon yöntemi (M-100-S16) ve mayalar için kullanılan mikrodilüsyon yöntemi (M-27-A2) protokollerinde bazı değişiklikler yapılmak suretiyle değerlendirilmiştir.

Yöntem kuyucuklara belirli miktarlarda ekilen mikroorganizmaların, madde ile inkübasyonunun ardından canlılıklarının tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu amaçla canlı hücrelerdeki mitokondriyal aktivite ile renk değişimi gözlenen bir tetrazolyum tuzu olan resazurin kullanılabilir. Resazurin (mavi renk), canlılık görülen kuyucuklarda pembe renk almaktadır.

Bakteriler için ampisilin ve kloramfenikol, mayalar için ketokonazol ve amfoterisin B standart madde olarak kullanılmıştır. Ketokonazol ve amfoterisin B 0.0313-16 µg/mL (çözücü: dimetilsülfoksit (DMSO)), ampisilin ve kloramfenikol 0.125-64 µg/mL (çözücüler sırasıyla su ve DMSO), uçucu yağlar 4.882-2500 µg/mL (çözücü: DMSO) konsantrasyonlarında uygulanmıştır.

18-24 saatlik inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland No: 0.5 (bakteriler için yaklaşık 10^8 cfu/mL, maya kültürü için 10^6 cfu/mL) tüpüne göre bulanıklık ayarı densitometre kullanılarak yapılmıştır.



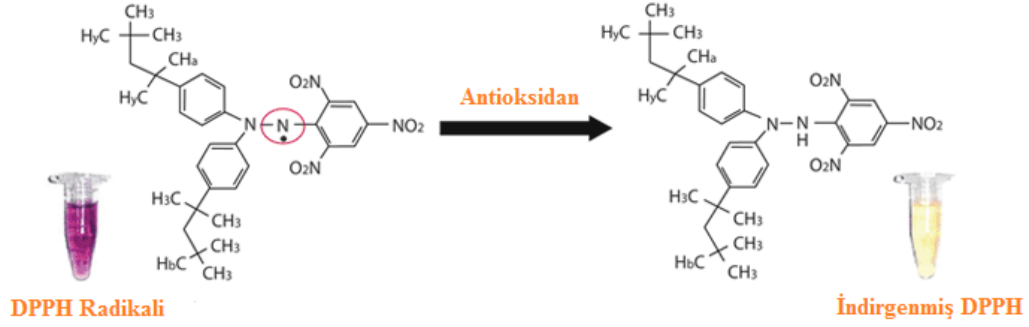
Şekil 2. Resazurin'in MİK Belirlenmesinde Kullanılması (Muthu Tamizh ve ark., 2012)

96 "U" tipi kuyucuklara sahip mikrolakalarda yapılan deneylerde bakteriler için MHB 2, mayalar için RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Her mikroorganizma için bir plaka çalışılmıştır. Plakalara 100 µL besiyeri konulmuş ve ilk kuyucuk üzerine 100 µL numune ilave edilip otomatik pipetle seyreltme yapılmıştır. Üzerlerine 100 µL Mc Farland No: 0.5 ayarı yapılmış ve bakteriler için 1:100, mayalar için 1:1000 seyreltme yapılmış mikroorganizmalar ilave edilmiştir. Bu işlemlerden sonra mikrolakalar kapatılarak 35-37°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üremenin varlığının belirlenebilmesi için plaklar üzerine 20 µL 0.1 mg/mL konsantrasyonunda tetrazolyum klorür (TTC) tuzunun (Resazurin: 7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksit) distile sudaki çözeltisi eklenmiştir. Renklenme için 35-37°C'de 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda renklenmeyen alanlar (mavi renk) üremenin olmadığı konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Deneyler pozitif ve negatif kontroller de dikkate alınarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Amsterdam, 1996; CLSI M7-A7; CLSI M27-A2).

Antioksidan aktivite çalışması

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]), stabil serbest radikal içeren koyu renkli bir kimyasaldır. Antioksidan aktivite belirlenmesinde kullanılır. Bu koyu renkli molekül ortamda antioksidan varlığında azalarak rengini kaybeder. Renk şiddeti spektrofotometre ile ölçülerek antioksidan aktivite değerlendirilir (Garcia ve ark., 2012).



Şekil 3. DPPH• Radikalini Süpürücü Etki Tayininin Mekanizması (http-1)

Deneyler 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak galik asit ve askorbik asit kullanılmıştır. Uçucu yağların ve pozitif kontrollerin metanol ile 1 mg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Plakalara 100 µL metanol konulmuş ve ilk kuyucuk üzerine 100 µL numune ilave edilip otomatik pipetle seyreltme yapılmıştır. Sadece DPPH• ve metanol içeren kuyucuklar blank olarak kullanılmıştır. Sonrasında kuyucuklara metanol ile hazırlanmış 80 µg/mL DPPH• çözeltisinden 100 µL ilave edilip 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir (Kumarasamy ver ark., 2007). Süre sonunda absorbands değerleri 517 nm’de okunmuştur. % 50 inhibisyon konsantrasyon değeri (İK₅₀) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$İK_{50} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : Kontrol absorbands

A₁ : Numune absorbands

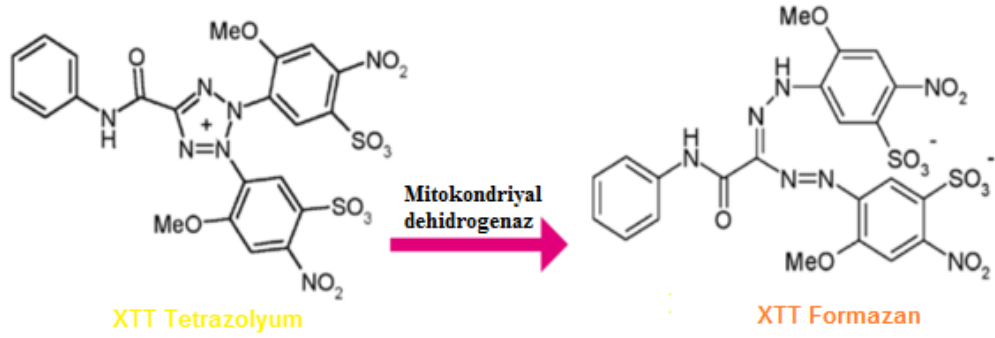
Deneyler en az 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

In vitro sitotoksosite ve genotoksosite çalışmaları

XTT sitotoksosite testi

Canlı hücrelerin bozunmamış mitokondriyal solunum zincirleri ve membran yapıları vardır. Toksik ajanlar canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla tespit edilebilirler.

Süksinat dehidrogenaz, sadece canlı hücrelerde aktif ve mitokondriyal solunumda görevli bir enzimdir. Bu enzim bir tetrazolyum tuzu olan XTT’den [2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum] formazan kristallerinin oluşumuna neden olur. Sarı renkte olan XTT, bu indirgenme reaksiyonu ile turuncu renk çözünür formdaki formazana dönüşür. Enzim aktivitesi 480 nm ya da 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm ile tespit edilir (Wang ve ark., 2011).



Şekil 4. XTT Sitotoksosite Testinin Prensipli (http-2)

Deneylerde NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™, fare embroyenik fibroblast hücreleri) hücre hattı kullanılmıştır.

NIH3T3 hücrelerinin çoğaltılması

Hücre kültürü çalışmalarında steril malzemeler kullanılmıştır. Çalışmalar steril kabinde sürdürülmüştür. Hücre hatları % 5 CO₂, % 95 nem ve 37°C'deki inkübatörlerde yaşatılmıştır. Kullanılan tüm çözeltilerin 37°C'de olması sağlanmıştır.

ATCC (American Type Culture Collection)'den temin edilen -85°C'deki hücre hattı besiyeri [NIH3T3 hücre dizisi için kullanılan besiyeri % 89 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), % 10 bovin calf serum ve % 1 penisilin-streptomisin içerir] ile yavaş yavaş eritilerek santrifüj tüpüne alınmıştır. 4°C'de 1200 rpm devir hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken hücrelerin üzerinde kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler yeni besiyeri ilavesi ile hücre kültür şişesine (flask) alınmış ve inkübasyona bırakılmıştır.

Hücreler kültür şişesindeki alanı kapladığında bir kısmı başka bir kültür şişesine alınarak çoğaltılmıştır. İnkübatörden alınan kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltilisine geçmesini sağlamak için hafifçe çalkalanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Kültür şişesine 5 mL fosfat tamponu (PBS) ilave edilerek hücreler yıkanmış, yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sonrasında kültür şişesine tripsin EDTA çözeltisi (1X) (75 cm²'lik kültür şişelerine 3-5 mL, 25 cm²'lik 1-3 mL) ilave edilmiş ve hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin üzerine 20-25 mL besiyeri ilave edilerek hücreler süspanse edilmiş ve 1:2, 1:3 bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır. Kültür şişeleri inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır.

NIH3T3 hücrelerine XTT sitotoksosite testinin uygulanması

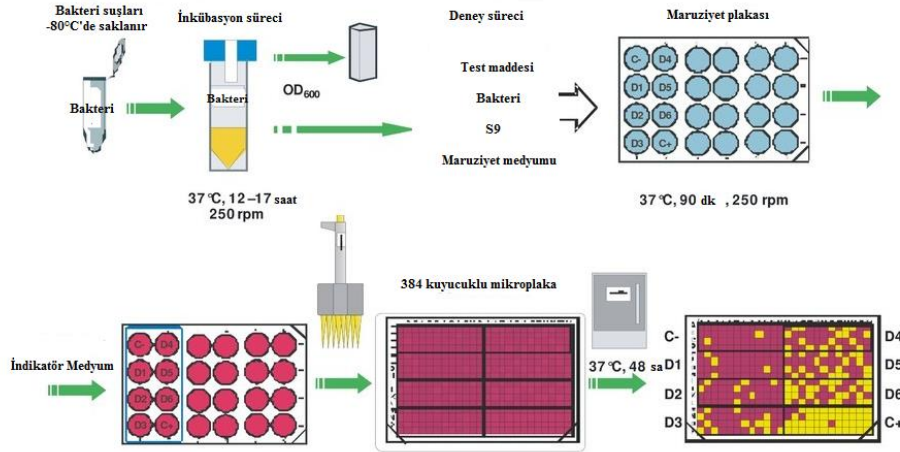
İnkübatörden alınan kültür şişesi, ölü hücrelerin besiyeri çözeltilisine geçmesi sağlamak için hafifçe çalkalanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır. Kültür şişesine tripsin-EDTA çözeltisi (1X) (75 cm² lik kültür şişelerine 3-5 mL, 25 cm²'lik 1-3 mL) konularak hafifçe çalkalandıktan sonra inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. İnkübatörden alınan kültür şişelerinin içine besiyeri ilave edilerek (tripsin-EDTA çözeltisinin en az iki katı kadar besiyeri ilave edilir) pipet yardımıyla santrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpü içindeki hücre süspansiyonu çalkalandıktan sonra 10 µL alınarak, 10 µL Trypan blue

solüsyonu ile karıştırılıp sayımı gerçekleştirilmiştir ve konsantrasyon 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücre süspansiyonu küvetlere alınmış ve $100 \mu\text{L}$ /kuyucuk olacak şekilde hücre kültür plakasına dağıtılarak (1×10^4 hücre/ $100 \mu\text{L}$) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Test maddesinin $9.77-1250 \mu\text{g/mL}$ arasında 8 seri konsantrasyonu negatif ve pozitif kontroller ile birlikte plakalara uygulanmıştır. 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücre kültürlerinin üst kısmı ters çevrilerek atılmıştır. Hücreler fosfat tamponu ile yıkanmış ve yıkama çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre kültür plakasına $200 \mu\text{L}$ /kuyucuk olacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. XTT 1 ve XTT 2 çözeltileri 1:100 oranında karıştırılmıştır. Hücre kültür plakasına $50 \mu\text{L}$ /kuyucuk olacak şekilde bu çözelti karışımından ilave edilmiştir. 3 saat inkübasyona bırakılmış, 3 saatlik inkübasyon süresi sonunda plakalar 5 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra ELISA'da 480 ve 690 nm'de OD (Optical density: optik yoğunluk) değerleri okunmuştur. Test maddelerinin her bir konsantrasyonu için % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Non-linear regresyon analizi ile maddelerin inhibitör konsantrasyon 50 (İK_{50}) değerleri hesaplanmış ve maddelerin sitotoksik özellikleri yorumlanmıştır (Altıntop ve ark., 2012).

AMES MPF™ 98/100 genotoksisite testi

AMES Mikroplaka Testi



Şekil 5. Ames MPF™ 98/100 Testinin Uygulanışı (http-3)

Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 suşlarını içeren vialler (-85°C) 5 dak. oda sıcaklığında tutulmuştur. Viallere $200 \mu\text{L}$ growth medyum (GM) ilave edilmiş ve homojen dağılım için pipetleme yapılmıştır. $50 \mu\text{L}$ 'lik kültür tüpüne $50 \mu\text{L}$ bakteri süspansiyonu ve 10 mL GM eklenmiştir. 12-16 saat 37°C , 250 rpm ' de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda süspansiyonun OD_{600} değeri ölçülmüştür. OD_{600} değeri $\geq 2,0$ olma şartı sağlandığı için deney prosedürüne devam edilmiştir. Test maddesine ait belirlenen 6 farklı konsantrasyonda (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156

mg/mL) 10 µL dilüsyon plakası hazırlanmıştır. Her iki suş için S9 enzim fraksiyonunu içeren ve içermeyen maruziyet plakaları (24 kuyucuklu) hazırlanmıştır. S9 enzim fraksiyonunu içermeyen plakalara prosedüründe belirtilen miktarlarda maruziyet medyumunu, bakteri ve test maddesi; S9 enzim fraksiyonunu içeren plaklara ise bunlara ek olarak S9 enzim fraksiyonunu eklemiş ve 37°C, 250 rpm hızda çalkalanarak 90 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bakteri suşlarına özel mor indikatör medyumun 2.8 mL'si her bir kuyucuğa eklenmiştir. Her kuyucukta 50 µL olacak şekilde içerikler, belirlenen deney tasarımına göre 384'lük plakalara aktarılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda plakalardaki bakteriyal metabolizma pH'ı değiştirerek mor rengi sarıya dönüştürür. Deney sonunda oluşan sarı kuyucukların sayısı belirlenmiştir. Veri analiz programında istatistiksel analiz yapılarak test maddelerinin genotoksik özellikleri yorumlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Uçucu Yağların Verimleri

Bitkilerin dövülmüş meyvelerinden, Clevenger apareyi kullanılarak gerçekleştirilen 3 saatlik su distilasyonu ardından elde edilen uçucu yağlara ait verimleri şöyledir:

F. hermonis uçucu yağı verimi: % 1.75

F. brevipedicellata uçucu yağı verimi: % 1.87

F. rigidula uçucu yağı verimi: % 2.09

Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analiz Sonuçları

Uçucu yağların analizleri eş zamanlı olarak GK ve GK/KS ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre *Ferula brevipedicellata* uçucu yağının 23 bileşiğe karşılık gelen % 93.7'si, *Ferula hermonis* uçucu yağının 15 bileşiğe karşılık gelen % 94.6'sı, *Ferula rigidula* uçucu yağının ise 10 bileşiğe karşılık gelen % 98'i aydınlatılmıştır. *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının ana bileşikleri α -pinen (% 68.9 ve %7 3.0, sırasıyla), β -pinen (% 5.3 ve % 4.0, sırasıyla) ve naftalen (% 4.3 ve % 8.5, sırasıyla); *F. hermonis* uçucu yağının ana bileşikleri ise α -pinen (% 64.1), naftalen (% 8.3) ve *trans*-verbenol (% 4.8) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağların kimyasal bileşimleri Çizelge 6-8'de verilmiştir.

Çizelge 6. *Ferula hermonis* Uçucu Yağının (Fh) Kimyasal Bileşimi

No	RRI	Bileşik	%
1	1000	Dekan	0.5
2	1032	α -Pinen	64.1
3	1076	Kamfen	0.9
4	1100	Undekan	1.0
5	1118	β -Pinen	2.2
6	1586	Pinokarvon	1.3
7	1648	Mirtenal	0.5
8	1670	<i>trans</i> -Pinokarveol	1.3
9	1683	<i>trans</i> -Verbenol	4.8
10	1725	Verbenon	3.9
11	1763	Naftalen	8.3
12	1804	Mirtenol	0.8
13	1845	<i>trans</i> -Karveol	1.9
14	2008	Karyofillen oksit	1.4
15	2144	Spatulenol	1.7
Toplam			94.6

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID (Alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır.

Çizelge 7. *Ferula brevipedicellata* Uçucu Yağının (Fb) Kimyasal Bileşimi

No	RRI	Bileşik	%
1	1000	Dekan	e
2	1032	α -Pinen	68.9
3	1076	Kamfen	0.3
4	1100	Undekan	0.4
5	1118	β -Pinen	5.3
6	1132	Sabinen	0.2
7	1135	Tuya-2,4(10)-dien	0.4
8	1174	Mirsen	0.3
9	1280	<i>p</i> -Simen	0.6
10	1481	Fenkilasetat	0.6
11	1586	Pinokarvon	1.3
12	1611	Terpinen-4-ol	0.2
13	1645	<i>cis</i> -Verbenil asetat	0.2
14	1648	Mirtenal	0.9
15	1670	<i>trans</i> -Pinokarveol	1.7
16	1683	<i>trans</i> -Verbenol	2.9
17	1690	Kripton	0.5
18	1704	Mirtenil asetat	0.2
19	1725	Verbenon	2.9
20	1763	Naftalen	4.3
21	1804	Mirtenol	0.7
22	1845	<i>trans</i> -Karveol	0.4
23	1864	<i>p</i> -Simen-8-ol	0.5
Toplam			93.7

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID (Alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser miktar (< % 0.1).

Çizelge 8. *Ferula rigidula* Uçucu Yağının (Fr) Kimyasal Bileşimi

No	RRI	Bileşik	%
1	1032	α -Pinen	73.0
2	1076	Kamfen	2.8
3	1100	Undekan	1.2
4	1118	β -Pinen	4.0
5	1203	Limonen	0.8
6	1586	Pinokarvon	0.7
7	1683	<i>trans</i> -Verbenol	2.0
8	1725	Verbenon	1.6
9	1763	Naftalen	8.5
10	2008	Karyofillen oksit	1.9
Toplam			96.5

RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; % FID (Alev iyonlaşma dedektörü) verilerine göre hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları kapsamında uçucu yağların antibakteriyal ve antifungal aktiviteler araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bitkilerin ve genel olarak Apiaceae familyasına ait bitkilerin daha çok gastrointestinal sistem ile ilgili problemlerin tedavisinde kullanılması sebebiyle antimikrobiyal aktivite çalışmalarında gıda kaynaklı üç gram pozitif (+) bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*), gıda kaynaklı üç gram negatif (-) bakteri (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*) kullanılmıştır (http-4; Bottone, 2010; Lowley, R. ve ark., 2008). Ayrıca en sık rastlanan kandidiyazis patojenleri olan iki maya (*Candida albicans* ve *Candida tropicalis*) ile de uçucu yağların minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir (Kothavade ve ark., 2010). Tüm antimikrobiyal aktivite çalışmaları en az 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları **Çizelge 9**'da verilmiştir.

Çizelge 9. Uçucu Yağların ve Standart Maddelerin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)

Mikro-organizmalar	MİK Değerleri (µg/mL)						
	Uçucu Yağlar			Standart Maddeler			
	Fh	Fb	Fr	Std1	Std2	Std3	Std4
B1	1250	1250	1250	16	16	-	-
B2	625	625	1250	0.25	16	-	-
B3	625	312.5	1250	0.25	16	-	-
B4	625	312.5	1250	0.25	16	-	-
B5	156.25	312.5	625	0.25	16	-	-
B6	625	625	625	> 64	> 64	-	-
F1	156.25	312.5	312.5	-	-	< 0.031	0.5
F2	312.5	312.5	312.5	-	-	< 0.031	1

B1: *E. coli*, B2: *S. aureus*, B3: *S. typhimurium*, B4: *B. cereus*, B5: *B. subtilis*, B6: *P. aeruginosa*, F1: *C. albicans* F2: *C. tropicalis*; Fh: *F. hermonis*, Fb: *F. brevipedicellata*, Fr: *F. rigidula*; Std1: Ampisilin, Std2: Kloramfenikol, Std3: Ketakonazol, Std4: Amfoterisin B, - : Çalışılmadı

Deney sonuçlarına göre 4.882-2500 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilen uçucu yağlar, standart maddelere göre daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Fh uçucu yağının en etkili olduğu mikroorganizmalar B5 (156.25 µg/mL) ve F1 (156.25 µg/mL)'tir. Fb uçucu yağının en etkili olduğu mikroorganizmalar ise 312.5 µg/mL MİK değeri ile B3, B4, B5, F1 ve F2 olmuştur. Fr uçucu yağı ise en yüksek aktivitesini 312.5 µg/mL'de F1 ve F2 mayalarına karşı göstermiştir.

Deney sonuçlarına göre uçucu yağlar, test edilen mikroorganizmalara karşı nispeten benzer antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Uçucu yağların birbirlerine göre daha yüksek aktivite gösterdikleri mikroorganizmalara bakıldığında;

- Fh, Fb'ye göre B5 ve F1,
- Fh, Fr'ye göre B2, B3, B4, B5 ve F1,
- Fb, Fh'ye göre B3 ve B4,
- Fb, Fr'ye göre B2, B3, B4 ve B5 mikroorganizmalarında daha yüksek aktivite göstermiştir.

Fh, Fb ve Fr uçucu yağları ile elde edilen MİK değerlerine bakıldığında mayalara karşı görülen aktivitenin bakterilere karşı görülene göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Pavlovic' ve arkadaşları (2012), farklı bir *Ferula* türü ile yaptıkları çalışmada bu çalışma sonuçlarına paralel olarak uçucu yağın antifungal aktivitesinin antibakteriyel aktiviteye oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında deney sonuçlarına göre *F. hermonis*, *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağları mikroorganizmalar arasında *B. subtilis*'e karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmaları sebebiyle bu bakterinin uçucu yağlara en duyarlı bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bazı *Ferula* türlerinin uçucu yağları ile gerçekleştirilmiş farklı çalışmalarda en duyarlı bakterinin *B. subtilis* olduğu tespit edilmiştir (Maggi ve ark., 2009; Kavooosi ve Rowshan, 2013; Dehghan ve ark., 2007). Deney sonuçlarına göre, *E. coli*'ye karşı uçucu yağların en düşük antimikrobiyal aktiviteye (MİK: 1250 µg/mL) sahip olması sebebiyle bu bakterinin mikroorganizmalar arasında en dirençli bakteri olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlara farklı *Ferula* türlerine ait uçucu yağ çalışmalarda da rastlanmıştır (Kavooosi ve Rowshan, 2013; Iranshahi ve ark., 2009; Iranshahi ve ark., 2008).

Ferula hermonis, *F. brevipedicellata* ve *F. rigidula* uçucu yağlarının ana bileşiği olan α -pinen, literatürdeki bazı çalışmalarda çeşitli uçucu yağların ana bileşiği olması nedeniyle saf bileşik olarak antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirilmiştir. Iranshahi ve arkadaşlarının (2009a) çalışmasında α -pinen, incelenen mikroorganizmalar üzerinde test edilen *Ferula* türüne ait uçucu yağ ile benzer aktivite göstermiş; *B. cereus* ve *E. coli*'ye karşı ise uçucu yağlardan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Gonçalves ve arkadaşlarının (2012) *Seseli* türleri ile yaptığı bir antifungal aktivite çalışmasında, ana bileşiklerden olan α -pinen'in test edilen uçucu yağlara göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Cosentino ve arkadaşlarının (1999) antimikrobiyal aktivite çalışmasında uçucu yağlarla birlikte incelenen α -pinen'in aktivitesi uçucu yağlara göre daha düşük bulunmuştur. α -Pinen'in de içinde bulunduğu bir dizi uçucu yağ bileşeni ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında α -pinen, diğer bileşenlere göre düşük aktivite gösteren bir bileşik olarak saptanmıştır (Dorman ve Deans, 2000). Elde edilen verilerdeki farklılıkların uçucu yağlardaki bileşenlerin ve oranlarının farklılığı, bileşenler arasındaki muhtemel sinerjik, agonist ya da antagonist etkileşimlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Antioksidan Aktivite Sonuçları

Antioksidan aktivite çalışması olarak DPPH• radikali ile serbest radikal süpürücü aktivite tayini yapılmıştır. Güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen

askorbik asit ve gallik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Uçucu yağların ve pozitif kontrollerin 0.98 µg/mL-0.5 mg/mL konsantrasyonlarında aktiviteleri belirlenmiştir. Deneyle sonuçunda, konsantrasyona karşı % inhibisyon ölçülerek inhibitör konsantrasyon 50 (İK₅₀) değerleri, eğrilerin doğrusal regresyon denkleminde göre hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm antioksidan aktivite çalışmaları en az 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen İK₅₀ değerleri **Çizelge 10**'da verilmiştir.

Çizelge 10. DPPH• Radikal Süpürücü Etki Sonuçları

Test maddeleri	İK ₅₀ (mg/mL)
Fh	> 0.5
Fb	> 0.5
Fr	> 0.5
Askorbik asit	0.007
Gallik asit	0.001

Fh: *F. hermonis*, Fb: *F. brevipedicellata*, Fr: *F. rigidula*

Deneyle sonuçlarına göre Fh, Fb ve Fr uçucu yağlarının pozitif kontroller ile karşılaştırıldığında radikal süpürücü aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

Literatürde farklı *Ferula* türlerine uçucu yağların antioksidan aktivite çalışmaları mevcuttur. Kavooşi ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında çeşitli antioksidan aktivite belirleme yöntemleri kullanılmış ve uygulanan yöntemler ile benzer sonuçlar elde edilmiş; içeriğinde ana bileşik olarak α -pinen ve β -pinen içeren uçucu yağ zambak reçinesinin, karışımlar arasında en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Yüksek miktarlarda α -pinen (% 59.9) ve β -pinen (% 19.0) içeren *Ferula lycia*'nın topraküstü kısmından elde edilen uçucu yağ ile yapılan DPPH radikal süpürücü etki çalışmasında, uçucu yağın antioksidan aktivitesi zayıf bulunmuştur (Köse ve ark., 2010).

Ana bileşikler arasında α -pinen ve β -pinen'in de bulunduğu *Ferula microcolea* uçucu yağının DPPH radikal süpürücü etkisinin araştırıldığı çalışmada, uçucu yağın aktivitesinin orta düzeyde olduğu belirtilmiştir (Amiri, 2014).

Emami ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında α -pinen ve β -pinen'in de saf bileşik olarak DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesine bakılmıştır. 0.1-4 µL/mL konsantrasyonlarda α -pinen ve β -pinen çok zayıf aktivite göstermiş ya da aktivite göstermemiştir. Aynı çalışmada α -pinen açısından zengin uçucu yağların da antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu belirlenmiştir (Emami ve ark., 2011). Benzer şekilde başka bir çalışmada yine saf bileşik olarak antioksidan aktivitesi incelenen α -pinen'in kayda değer bir etkinlik göstermediği bildirilmiştir (Kartal ve ark., 2007).

Fh, Fb ve Fr uçucu yağları ile elde edilen antioksidan aktivite sonuçları benzer şekilde ana bileşik olarak α -pinen ve β -pinen içeren farklı uçucu yağlar ile yapılmış önceki çalışmalar ile paralellik göstermekle birlikte Fh, Fb ve Fr uçucu yağlarının antioksidan aktivite göstermediği saptanmıştır.

***In Vitro* Sitotoksosite Testi Sonuçları**

XTT sitotoksosite testi sonuçları

Çalışmada antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri araştırılan uçucu yağların sağlıklı bir hücre hattı ile sitotoksitesinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde de gerek sitotoksitenin belirlenmesi gerekse antiproliferatif aktivitenin selektivitesinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan NIH3T3 (ATCC® CRL-1658™, fare embriyonik fibroblast hücreleri) hücre hattı kullanılmıştır (McKim Jr., 2010; Hsin ve ark., 2008; Altıntop ve ark., 2012). Uygulanacak dozlar, uçucu yağların antimikrobiyal açıdan aktivite gösterdiği dozlar olacak şekilde belirlenmiştir. 9.77-1250 µg/mL konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Deney sonuçlarına göre uçucu yağların NIH3T3 hücre hattına karşı elde edilen inhibitör konsantrasyon 50 (İK₅₀) değerleri **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Çizelge 11. Uçucu Yağların NIH3T3 Hücre Hattına Karşı İK₅₀ Değerleri

Uçucu yağlar	İK ₅₀ (µg/mL)
Fh	39.06
Fb	115.63
Fr	483.20

Fh: *F. hermonis*, Fb: *F. brevipedicellata*, Fr: *F. rigidula*

İlaç geliştirme sürecinde, ilaç adayının aktivitesinin yanında sitotoksitesi de oldukça önemlidir. Sağlıklı hücre hattına karşı elde edilen ve sitotoksiteyi gösteren dozun (İK₅₀), ilaç adayının biyolojik olarak aktif olduğu dozlara göre sayısal olarak daha büyük olması gerekir. Bu nedenle yukarıdaki İK₅₀ değerleri uçucu yağların antimikrobiyal aktivite gösterdikleri dozlar göz önüne alınarak “değerlendirildiğinde, sadece Fr uçucu yağının *Candida albicans* ve *Candida tropicalis*'e karşı etkili olduğu dozdan (312.5 µg/mL) daha yüksek dozda (483.20 µg/mL) İK₅₀ değerine sahip olduğu görülmüştür. Diğer uçucu yağların ise antimikrobiyal aktivite gösterdiği dozlardan daha düşük dozda sitotoksiteye neden olduğu görülmüştür.

Literatürde *Ferula* cinsi ile yapılan sitotoksosite çalışmaları, genellikle ekstrelerden elde edilen izole bileşiklerin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı etkisinin belirlenmesi şeklindedir (Alkhatib ve ark., 2008; Rassouli ve ark., 2011a; Valiahdi ve ark., 2013; Barthomeuf ve ark., 2008; Rassouli ve ark., 2011b; Dastan ve ark., 2014; Dall'Acqua ve ark., 2011; Ben Salem ve ark., 2013; Kuete ve ark., 2012). Bunun yanında *Ferula* ekstrelerinin antikanser aktivite çalışmaları ve *in vivo* antikanser çalışması da mevcuttur (Gharaei ve ark., 2013; Kuete ve ark., 2012; Elouzi ve ark., 2008; Saleem ve ark., 2001).

İlk kez bu çalışma halk arasında kullanımı olan Fh, Fb ve Fr uçucu yağlarının sağlıklı hücre hattında sitotoksosite değerlendirmesi yapılmıştır. Ayrıca antimikrobiyal aktivitesi gözlenen tüm uçucu yağlar arasında Fr'nin İK₅₀ değerinden daha düşük dozlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği *Candida*

albicans ve *Candida tropicalis* mikroorganizmalarına karşı bu amaçla kullanabileceği düşünülmektedir.

AMES MPF™ 98/100 genotoksisite testi sonuçları

İlaç adayı bir bileşiğin geliştirilme süreci, etkinliğinin ve güvenilirliğinin belirlenmesini kapsamaktadır. Güvenilirlik değerlendirmesi, hedef organ toksisitesini ve genetik materyaldeki hasarı tespit etmek (genotoksisite) yoluyla gerçekleştirilmektedir (Krishna ve ark.; 1998). İlaç geliştirme sürecinde yüksek verimlilikle çok küçük miktarlarda bileşiklerin analizlerine olanak veren *in vitro* genotoksisite testleri, erken dönemlerde bileşiklerin toksisitelerinin belirlenmesini sağlayarak sürecin planlanmasına önemli katkılar sağlamaktadır (Mondal ve ark.; 2010).

Aktivite ve sitotoksisite çalışmalarına göre incelenen uçucu yağlar arasında antimikrobiyal aktivite gösterdiği bazı dozlarda sitotoksisite göstermeyen *F. rigidula* uçucu yağı, genotoksisitesinin araştırılması amacıyla seçilmiştir. Bu amaçla Ames MPF™ 98/100 testi kullanılmıştır. Ames MPF™ 98/100 testi, suda çözünürlüğü zayıf kimyasalların mutajenite taramasında kullanılması açısından oldukça uygundur. Konvansiyonel Ames testine göre birçok avantaja sahiptir. Test edilecek maddeye ait 6 konsantrasyonun aynı plakada test edilmesine olanak sağlar. Kullanılan tüm madde malzemenin standardize olması ve sonuçların daha pratik belirlenebilmesi testin güvenilirliğini arttırmaktadır. Konvansiyonel yöntemle göre daha kısa sürede, daha az sarfiyatla, daha güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Kamber ve ark., 2009).

Salmonella typhimurium'un histidin (His) operonunda oluşturulan nokta mutasyonuna bağlı olarak bakteri histidin üretmez. Bu durum bakterilerin histidin desteği olmadan çoğalamamasına neden olur. Mutajenik bir olay meydana geldiğinde histidin geninde nokta/çerçeve kayması mutasyonu meydana gelmesi bir geri dönüşe neden olabilir. Bunun sonucunda bakteri histidin olmadan da çoğalabilir. Bir kimyasalın mutajenik olma potansiyeli bu geri dönüşü yapıp yapmadığı tespit edilerek değerlendirilebilir. Histidin içermeyen besiyerinin kullanılması sadece mutasyona uğrayan bakterilerin hayatta kalıp çoğalmalarına olanak sağlar (Mortelmans ve Zeiger, 2000).

Salmonella typhimurium TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonuna neden olan mutajenlerin tespit edilmesi, TA100 suşu ise nokta mutasyonlarına neden olan mutajenlerin tespit edilmesi için kullanılır (Flückiger-Isler ve ark., 2004).

S9 karaciğer mikrozom enzim fraksiyonları ise memeli metabolizmasının taklit edilmesi için kullanılır. Bu aşama kimyasalın biyotransformasyonu ile oluşan metabolitlerin mutajenitesinin değerlendirilmesi açısından önemlidir (Chandrasekaran ve ark., 2010).

Uçucu yağların mutajenitesinin değerlendirilmesi için *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 bakteri suşları ile S9 enzim fraksiyonu varlığında ve yokluğunda çalışılmıştır. Testin sonunda, dozlara göre pozitif (sarı) kuyucukların sayısının ortalamaları üçerli tekrarlardan hesaplanmış ve zemin çizgisinin (Zemin çizgisi (Baseline) = Negatif kontrollerin ortalaması + 1 Standart sapma) kaç katı oldukları uçucu yağın her bir dozu için ayrı ayrı belirlenmiştir. Zemin çizgisi 1'in altında ise

1'e ayarlanmıştır. Deney sonuçları istatistiki anlamlılık açısından Student t-testi kullanılarak ($p < 0.05$) değerlendirilmiştir. Yüksek ve düşük çoğalma hızlarına bağlı olarak kültürlerin değerlendirme kriterleri önceki çalışmalara göre belirlenmiştir (Flückiger-Isler ve ark., 2012).

Bu kriterler;

Zemin çizgisi ≤ 3 ise; zemin çizgisinin 2-3 katı olan belirgin artışlar zayıf mutajenite; 3 kattan büyük artışlar mutajen olarak sınıflandırılmıştır. Bu durumda, en az 2 ardışık dozun t-testine ($p < 0,05$) göre istatistiksel olarak anlamlılık taşıması veya en yüksek non-toksik konsantrasyonun anlamlı bir artışa sahip olması gerekmektedir.

Zemin çizgisi > 3 ise; zemin çizgisinin 1.5-2.5 katı anlamlı artışlar zayıf mutajen; 2.5 kattan büyük anlamlı artışlar ise mutajen olarak sınıflandırılmıştır. Bu durumda, en az 2 ardışık dozun t-testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak anlamlılık taşıması veya en yüksek non-toksik konsantrasyonun anlamlı bir artışa sahip olması gerekmektedir.

Bir test maddesinin muğlak olarak değerlendirilmesi için istatistiki anlamlı ($p < 0.05$) artışlar ile doz-cevap eğilimi göstermesi fakat aynı zamanda zemin çizgisinden belirtilen katlarında artış göstermemesi söz konusu olmalıdır ya da zemin çizgisinin belirlenen katı artış gösterip istatistiksel olarak anlamlılığa ($p < 0.05$) sahip olmaması gerekmektedir. Tüm sayılan kriterlerin hiç birine sahip olmayan test maddeleri ise negatif olarak kabul edilmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler **Çizelge 12**'deki gibidir.

Çizelge 12. Ames MPF™ 98/100 Testi Sonuçları

Bileşik	Konsantrasyon (mg/mL)	Mutajenite							
		Taban Çizgisi		TA 98		Taban Çizgisi		TA 100	
		S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-
Fr	0.16	1.24	4.00	0,67	4,00	4.41	1.00	2,33	0,33
	0.31			1,33	4,33			2,33	1,00
	0.63			1,00	4,67			0,67	0,00
	1.25			1,00	4,67			0,67	1,33
	2.5			1,00	0,00			1,33	1,00
	5			2,00	0,00			0,33	0,67

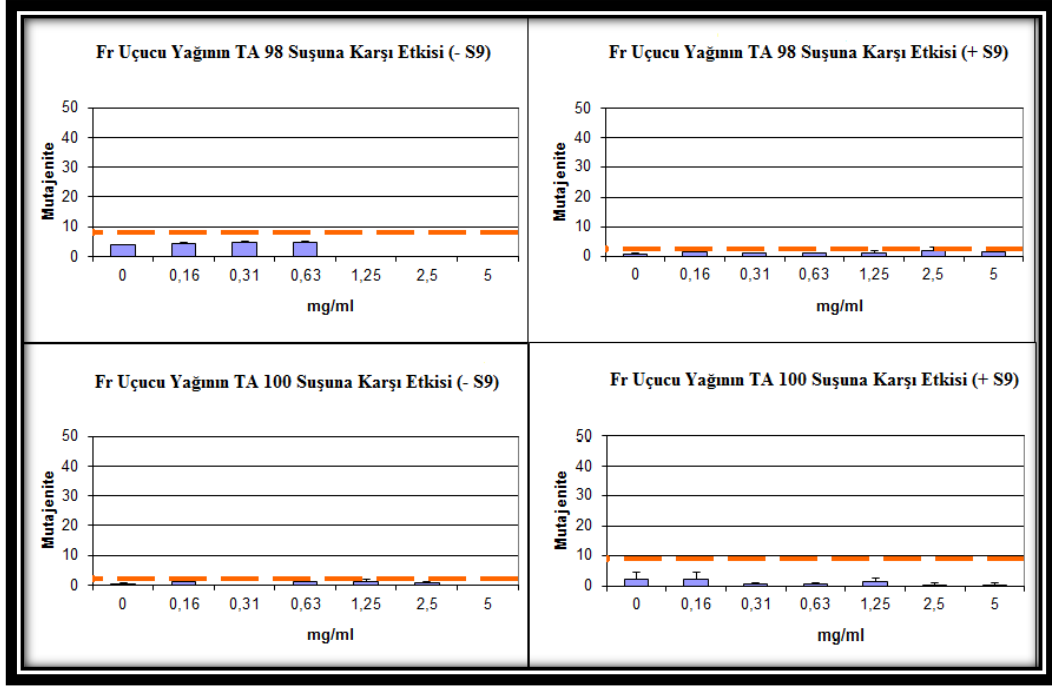
Fr: *Ferula rigidula* uçucu yağı

Fr uçucu yağı daha önceden belirlenmiş test kriterlerine göre *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarına karşı S9 enzim fraksiyonu varlığında ve yokluğunda zemin çizgisine göre anlamlı artışlar içermemesi sebebiyle mutajenite açısından negatif olarak değerlendirilmektedir.

Uçucu yağların ana bileşiklerinden olan α -pinen'in enantiyomerlerinin *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA1535 suşları ile S9 enzim fraksiyonu

varlığında ve yokluğunda yapılan mutajenite değerlendirmesinde, (+)- α -pinen'in 1000 $\mu\text{g/plaka}$ konsantrasyonuna kadar, (-)- α -pinen'in ise 4000 $\mu\text{g/plaka}$ konsantrasyonuna kadar mutajenik bir etki göstermediği belirtilmiştir (Gomes-Carneiro ve ark., 2005).

Yine ana bileşiklerden β -pinen'in *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları ile yapılan mutajenite çalışmalarında test edilen dozlarda mutajenik olmadığı belirlenmiştir (http-5).



Şekil 6. Fr Uçucu Yağının AMES MPF™ 98/100 Test Sonuçlarına ait Grafikler

İlk kez bu çalışmada *F. rigidula* bitkisinin uçucu yağının mutajenik olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre bu uçucu yağ mutajenik potansiyele sahip olmadığından güvenilirlik değerlendirmesi sonucunda çalışılan dozlarda tespit edilen antimikrobiyal özelliği ile etkin ve güvenli bir şekilde kullanılabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında analizleri GK ve GK/KS ile gerçekleştirilen *Ferula brevipedicellata* ve *Ferula rigidula* uçucu yağlarının ana bileşikleri α -pinen (% 68.9 ve % 73.0, sırasıyla), β -pinen (% 5.3 ve % 4.0, sırasıyla) ve naftalen (% 4.3 ve % 8.5, sırasıyla); *Ferula hermonis* uçucu yağının ana bileşikleri ise α -pinen (% 64.1), naftalen (% 8.3) ve *trans*-verbenol (% 4.8) olarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi için yapılan deneyler sonucunda uçucu yağların çeşitli patojenlere karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Test edilen mayalara karşı bakterilere göre daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Mikroorganizmalar arasında en dirençli mikroorganizmanın *Escherichia coli* (Tüm uçucu yağlar için: 1250 $\mu\text{g/mL}$), en duyarlı mikroorganizmanın ise *Bacillus subtilis* (*Ferula hermonis* uçucu yağı: 156.25 $\mu\text{g/mL}$, *Ferula brevipedicellata* uçucu yağı: 312.5 $\mu\text{g/mL}$, *Ferula rigidula* uçucu yağı: 625 $\mu\text{g/mL}$) olduğu görülmüştür.

Antioksidan aktivite değerlendirilmesi adına yapılan DPPH[•] radikal süpürücü testi sonucunda uçucu yağların 0.5 mg/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda radikal süpürücü etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Sağlıklı hücre hattı olan NIH3T3 ile yapılan sitotoksikite deneylerinde, uçucu yağların genel olarak antimikrobiyal aktivite gösterdikleri dozlardan daha düşük dozlarda İK₅₀ değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Sadece *Ferula rigidula* uçucu yağının *Candida albicans* ve *Candida tropicalis*'e karşı etkili olduğu dozdan (312.5 $\mu\text{g/mL}$) daha yüksek dozda (483.20 $\mu\text{g/mL}$) İK₅₀ değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Genotoksitesinin değerlendirilmesi uygun görülen *Ferula rigidula* uçucu yağının, 0.16-5 mg/mL konsantrasyonlarda *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarına karşı S9 enzim fraksiyonu varlığında ve yokluğunda yapılan testler sonucunda mutajenik olmadığına karar verilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda antifungal aktivite gösterdiği dozlarda sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik olmayan ve mutajenik olarak değerlendirilmeyen *Ferula rigidula* uçucu yağı, ilaç geliştirme sürecinin ileri aşamalarına geçebilme potansiyeli açısından test edilen diğer *Ferula* türlerine ait uçucu yağlara göre öne çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Abedi, D., Jalali, M., Asghari, G., Sadeghi, N., Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gumosa* Boiss. essential oil using Alamar Blue™, RPS, 3 (1), 41-45 (2008).

Agaoğlu, S., Dostbil, N., Alemdar, S., The Antibacterial efficiency of some herbs used in herby cheese, YYÜ. Vet. Fak. Derg., 16 (2), 39-41 (2005).

Akhgar, M. R., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Bigdeli, M., Essential oils of *Ferula microcolea* (Boiss.) Boiss. and *Ferula hirtella* Boiss. from Iran, J. Essent. Oil Res., 17, 237-238 (2005).

Akhgar, M.R., Moradalizadeh, M., Faghihi-Zarandi, A., Rajaei, P., Chemical Composition of the essential oils of *Ferula oopoda* (Boiss. & Buhse) Boiss. and *Ferula badghysi* (Korovin.) from Iran, Jeobp, 14 (3), 297-301 (2011).

Al-Ja'fari, A., Vila, R., Freixa, B., Costa, J., Cañigüeral S., Antifungal compounds from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*, Phytother. Res., 27, 911-915 (2013).

Al-Ja'fari, A., Vila, R., Freixa, B., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., Cañigüeral, S., Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*, Phytochemistry, 72, 1406-1413 (2011).

Alkhatib, R., Hennebelle, T., Joha, S., Idziorek, T., Preudhomme, C., Quesnel, B., Sahpaz, S., Bailleul, F., Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines, Phytochemistry, 69, 2979-2983 (2008).

Altıntop, M. D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., İlgin, S., Atlı, Ö., İşcan, G., Kaplancıklı, Z. A., Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents, Eur. J. Med. Chem., 58, 299-307 (2012).

Altundağ, E., Öztürk, M., Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey, Procedia Soc. Behav. Sci., 19, 756-777 (2011).

Amiri, H., Chemical composition and antioxidant activity of essential oil and methanolic extracts of *Ferula microcolea* (Boiss.) Boiss (Apiaceae), Int. J. Food Prop., 17, 722-730 (2014).

Amsterdam, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In Antibiotics in Laboratory Medicine, Fourth Edition, V. Lorian (ed.), pp. 52-111, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1996.

Andrade, B. F., Barbosa, L. N., Probst, I. S., Júnior, A. F., Antimicrobial activity of essential oils, J. Essent. Oil Res., 26 (1), 34-40 (2014).

Aoun, E., Rima, J., Chidia, G., Hanna, K., High-performance liquid chromatographic and spectrofluorometric determination of α -tocopherol in a natural plant: *Ferula hermonis* (Zaloooh root), J. Food. Comp. Anal., 18, 607-615 (2005).

- Auzi, A. A., Gray, A. I., Salem, M. M., Badwanb, A. A., Sarker, S. D., Feruhermonins A-C: three daucane esters from the seeds of *Ferula hermonis* (Apiaceae), *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10 (8), 701–707 (2008).
- Azarnivand, H., Alikhah-Asl, M., Jafari, M., Arzani, H., Amin, G., Mousavi, S. S., Comparison of essential oils from *Ferula ovina* (Boiss.) Aerial Parts in Fresh and Dry Stages, *Jeobp*, 14 (2), 250-254 (2011).
- Bakkali F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils-A review, *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446–475 (2008).
- Barthomeufa, C., Lima, S., Iranshahi, M., Chollet, P., Umbelliprenin from *Ferula szowitziana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis, *Phytomedicine*, 15, 103-111 (2008).
- Başer, K. H. C., Özek, T., Demirci, B., Kürkçüoğlu, M., Aytaç, Z., Duman, H., Composition of the essential oils of *Zosima absinthifolia* (Vent.) Link and *Ferula elaeochytris* Korovin from Turkey, *Flavour Fragr. J.*, 15, 371-372 (2000).
- Başer, K.H.C. ve Demirci, F., Chemistry of Essential Oils, In: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, R.G. Berger (Ed.), Springer, Berlin, 43-86 (2007).
- Ben Salem, S., Jabrane, A., Harzallah-Skhiri, F., Ben Jannet, H., New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the Tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 4248-4252 (2013).
- Benchabane, O., Hazzit, M., Baaliouamer, A., Mouhouche, F., Analysis and antioxidant activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf., *Jeobp*, 15 (5), 774-781 (2012).
- Bottone, E. J., *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.*, 23 (2), 382-398 (2010).
- Burt, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223-253 (2004).
- Chandrasekaran, C. V., Sundarajan, K., David, K., Agarwal, A., *In vitro* efficacy and safety of poly-herbal formulations, *Toxicol. In Vitro*. 24 (3), 885-897 (2010).
- Chibani, S., Bensouici, C., Kabouche, A., Aburjai, T., Touzani, R., Kabouche, Z., Analysis of the essential oil of aerial parts of *Ferula lutea* Poiret from Algeria, *Jeobp*, 5 (4), 682-685 (2012).
- Clinical and Laboratory Standarts Institutute (CLSI) (Formerly, NCCLS) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI M7-A7, Clinical and Laboratory Standarts Institutute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvani, USA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Formerly, NCCLS) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast Approved Standard, M27-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne, Pennsylvania, USA, 2002.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., Palmas F., *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils, *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 130-135 (1999).

Çelik, S. E., Özyürek, M., Altun, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Berker, I. K., Özgökçe, F., Apak, R., Antioxidant capacities of herbal plants used in the manufacture of Van herby cheese: 'Otlu Peynir', *Int. J. Food Prop.*, 11, 747-761 (2008).

Dall'Acqua, S., Linardi, M. A., Maggi, F., Marcello Nicoletti, M., Petitto, V., Innocenti, G., Basso, G., Viola, G., Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 5876-5885 (2011).

Dastana, D., Salehia, P., Ghanatib, F., Goharic, A. R., Maroofid, H., Alnajjar, N., Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpenecoumarins from *Ferula pseudalliacea*, *Ind. Crop. Prod.*, 55, 43-48 (2014).

Davis, P.H., *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburg University Press, Robert Cunningham and Sons Ltd., , Edinburg, UK, 4.cilt, 265, 446-451 (1972).

Dehghan, G., Solaimanian, R., Shahverdi, A. R., Amin, G., Abdollahi, M., Shafiee, A., Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Ferula szovitsiana* D.C., *Flavour Fragr. J.*, 22, 224-227 (2007).

Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S., Mohammad N. S., Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, *Grasas Aceites*, 60 (4), 405-412 (2009).

Diab, Y., Dolmazon, R., Bessiere, J. M., Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss. (zallooh root), *Flavour Fragr. J.*, 16, 120-122 (2001).

Divya, K., Ramalakshmi, K., Murthy, P. S., Jagan Mohan Rao L., Volatile oils from *Ferula asafoetida* varieties and their antimicrobial activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, 59, 774-779 (2014).

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316 (2000).

Duman, H., Sağiroğlu, M., A new species of *Ferula* (Apiaceae) from South Anatolia, Turkey, *Bot. J. Linn. Soc.*, 147, 357-361 (2005).

Eftekhari, F., Yousefzadi, M., Borhani, K., Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed, *Fitoterapia*, 75, 758-759 (2004).

- Elibol, Z., Türkiye'deki Bazı *Ferula* L. (Apiaceae) Türlerinin Moleküler Teknikler Kullanarak Taksonomik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, Türkiye (2009).
- Elouzi, A. A., Auzi, A. A., El-Hammadi, M., Gray, A. I., Cytotoxicity Study of *Ferula hermonis* Boiss., Bull. Pharm. Sci., Assiut University, 31 (2), 313-317 (2008).
- Emami, S. A., Abedindo, B. F., Hassanzadeh-Khayyat, M., Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpos* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae), Iran. J. Pharm. Res., 10 (4), 799-810 (2011).
- Ferrari, B., Tomi, F., Casanova J., Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica, Flavour Fragr. J., 20, 180-185 (2005).
- Flückiger-Isler, S., Baumeister, M., Braun, K., Gervais, V., Hasler-Nguyen, N., Reimann, R., Van Gompel, J., Wunderlich, H.G., Engelhardt, G., Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds, Mutat. Res-Gen. Tox. En., 558 (1-2), 181-197 (2004).
- Flückiger-Isler, S., Kamber, M., Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds, Mutat. Res., 747 (1), 36-45 (2012).
- Galal, A. M., Abourashed, E. A., Ross, S. A., ElSohly, M. A., Al-Said, M. S., El-Feraly F. S., Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*, J. Nat. Prod., 64, 399-400 (2001).
- Garcia, E. J., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M., Reis, A., Loguercio, A. D., Grande, R. H. M., Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth, Braz. Dent. J., 23 (1), 22-27 (2012).
- Geroushi, A., Auzi, A. A., Elhwuegi, A. S., Elzawam, F., Elsherif, A., Nahar, L., Sarker, S. D., Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*, Phytother. Res., 25, 774-777 (2011).
- Ghannadi, A., Amree, S., Volatile oil constituents of *Ferula gummosa* Boiss. from Kashan, Iran, J. Essent. Oil Res., 14, 420-421 (2002).
- Gharaei, R., Akrami, H., Heidari, S., Asadi, M. H., Jalili, A., The suppression effect of *Ferula gummosa* Boiss. extracts on cell proliferation through apoptosis induction in gastric cancer cell line, Eur. J. Integr. Med., 5, 241-247 (2013).
- Gomes-Carneiro, M. R., Viana, M.E.S., Felzenszwalb, I., Paumgarten, F.J.R., Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alpha-pinene in the *Salmonella*/microsome assay, Food Chem. Toxicol., 43 (2), 247-252 (2005).
- Gonçalves, M. J., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Canhoto, J., Salgueiro, L., Composition, antifungal activity and cytotoxicity of

the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal, Ind. Crop. Prod., 39, 204-209 (2012).

Habibi, Z., Aghaie, H. R., Ghahremanzadeh, R., Masoudi, S., Rustaiyan, A., Composition of the essential oils of *Ferula szowitsiana* DC., *Artemisia squamata* L. and *Rhabdosciadium petiolare* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. three umbelliferae herbs growing wild in Iran, J. Essent. Oil Res., 18, 503-505 (2006a).

Habibi, Z., Salehi, P., Yousefi, M., Hejazi, Y., Laleh, A., Mozaffarian, V., Masoudi, S., Rustaiyan, A., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ferula latisecta* and *Mozaffariania insignis* from Iran, Chem. of Nat. Compd., 42 (6), 689-692 (2006b).

Hadidi, K.A., Aburjai, T., Battah, A.K., A comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behaviour of male rats, Fitoterapia, 74 242-246 (2003).

Hilan, C., Sfeir, R., El Hage, R., Jawich, D., Frem, M. E., Jawhar, K., Evaluation of The Antibacterial Activities of *Ferula hermonis* (Boiss.), Lebanese Science Journal, 8 (2), 135-151 (2007).

Hsin, Y-H., Chen, C-F., Huang, S., Shih, T-S, Lai, P-S, Chueh P. J., The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells, Toxicol. Lett., 179, 130-139 (2008).

http-1 DPPH Assay,

http://www.damocos.co.kr/damo/language/english/lab_paper3.php
(18.12.2014).

http-2 AppliCations No. 12 Cell Proliferation Assay XTT,

<https://www.applichem.com/en/literature/applications/no-12-cell-proliferation-assay-xtt/> (18.12.2014).

http-3 Ames II and Ames MPF Assays,

<http://www.hjs-consulting.com/product-information/ames-kits/> (18.12.2014).

http-4 *Staphylococcus aureus*,

<http://www.foodsafety.unl.edu/pathogens/staph.html> (13.03.2014)

http-5 The Flavor And Fragrance High Production Volume Consortia The Terpene Consortium Revised Test Plan For Bicyclic Terpene Hydrocarbons

<http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/bictrphy/c13610rt.pdf>
(18.12.2014)

Ibraheim, Z. Z., Abdel-Mageed, W. M., Dai, H., Guo, H., Zhang, L., Jaspars, M., Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss., Phytother. Res., 26, 579-586 (2012).

- Iranshahi, M., Amin, G., Sourmaghi, M. S., Shafiee, A., Hadjiakhoondi, A., Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. var. *persica*, *Flavour Fragr. J.*, 21, 260-261 (2006).
- Iranshahi, M., Asili, J., Sahebkar, A., Bazzaz, B. S. F., Sharifi, S., Identification of essential oil components of *Ferula badrakema* fruits by GC-MS and ¹³C-NMR methods and evaluation of its antimicrobial activity, *Jeobp*, 12(1), 7-15 (2009a).
- Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayat, M., Bazzaz, B. S. F., Sabeti, Z., Enayati, F., High content of polysulphides in the volatile oil of *Ferula latisecta* Rech. F. et Aell. fruits and antimicrobial activity of the oil, *J. Essent. Oil Res.*, 20, 183-185 (2008a).
- Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayyat, M., Chemical composition of the volatile oil from *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. - Rech. Fruits, *Jeobp*, 11(4), 350-355 (2008b).
- Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayyat, M., Sahebkar, A., Famili, A., Chemical composition of the fruit oil of *Ferula flabelliloba*, *Jeobp*, 11(2), 143-147 (2008c).
- Iranshahi, M., Sahebkar, A., Hosseini, S. T., Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* *in vitro* and *in vivo*, *Phytomedicine*, 17, 269-273 (2010).
- Iranshahi, M., Yazdi, M. C., Hassanzadeh-Khayyat, M., Sahebkar, A., Sulfur containing compounds in the volatile oil of *Ferula latisecta* Rech. f. & Aell. Leaves, *Jeobp*, 12 (1), 64-68 (2009b).
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., Edraki, N., Chemical composition of *Ferula persica* Wild. essential oil from Iran, *Flavour Fragr. J.*, 20, 605-606 (2005).
- Kamber, M., Flückiger-Isler, S., Engelhardt, G., Jaeckh, R., Zeiger, E., Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity, *Mutagenesis*, 24 (4), 359-366 (2009).
- Kartal, N., Sökmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure, *Food Chem.*, 100, 584-589 (2007).
- Kavoosi, G., Purfard, A. M., Aram, F., Radical scavenging properties of essential oils from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2 (3), 1351-1356 (2012).
- Kavoosi, G., Rowshan, V., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time, *Food Chem.*, 138, 2180-2187 (2013).
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., Pirmoradei, M. R., Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by

supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, *Food Chem.*, 91, 639–644 (2005).

Koenig, W.A., Joulain, D., Hochmuth, D.H., *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*, MassFinder 3, D. H. Hochmuth (ed.), Hamburg, Germany, 2004.

Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., Panthaki, M. H., *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole, *J. Med. Microbiol.*, 59, 873-880 (2010).

Korovin, EP., *Ferula* L. In: (Ed.): B.K. Schisckin, *Flora of the USSR*, XVII (Umbelliflorae), Akademii Nauk SSSR, Moscow, Leningrad, 44-3101 (1951).

Krishna, G., Urda, G., Theiss, J., Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32, 115-120 (1998).

Kuete, V., Wiench, B., Hegazy, M. E. F., Mohamed, T. A., Fankam, A. G., Shahat, A. A., Efferth, T., Antibacterial activity and cytotoxicity of selected egyptian medicinal plants, *Planta Med.*, 78, 193-199 (2012).

Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L. ve Sarker, S. D., Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity, *Phytother. Res.*, 21 (7), 615-621, (2007).

Lawal, A. O., Ogunwande, A. I., *Essential oils from the medicinal plants of Africa*, *Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*, V. Kuete, Elsevier, London, 203-224 (2013).

Lowley, R., Curtis, L., Davis, J., *The Food Safety Hazard Guidebook*, RSC Publishing, Cambridge, 16-20; 58-65, 2008.

Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, F., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy), *Fitoterapia*, 80, 68-72 (2009).

Maggi, F., Lucarini, D., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, F., Vittori, S., Chemical analysis of the essential oil of *Ferula glauca* L. (Apiaceae) growing in Marche (Central Italy), *Biochem. Syst. Ecol.*, 37, 432–441 (2009).

Mahboubi, M., Kazempour, N., Mahboubi, A., The efficacy of essential oils as natural preservatives in vegetable oil, *Journal of Dietary Supplements*, 11 (4), 334–346 (2014).

McKim Jr., J. M., Building a tiered approach to *in vitro* predictive toxicity screening: a focus on assays with *in vivo* relevance, *Comb. Chem. High T. Scr.*, 13, 188-206, (2010).

McLafferty, F.W., Stauffer, D.B., *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, J Wiley and Sons, New York, 1989.

- Mirzaei, H. H., Hasanloo, T., Chemical compositions of the essential oils of *Ferula assa-foetida* seeds from two Iranian ecotypes, *Jeobp*, 15(1), 84-88 (2012).
- Mondal, M. S., Gabriels, J., McGinnis, C., Magnifico, M., Marsilje, T. H., Urban, L., Collis, A., Bojanic, D., Biller, S. A., High-content micronucleus assay in genotoxicity profiling: initial-stage development and some applications in the investigative/lead-finding studies in drug discovery, *Toxicol. Sci.*, 118 (1), 71-85 (2010).
- Mortelmans, K., Zeiger, E., The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.*, 455, 29-60 (2000).
- Muthu Tamizh, M., Kesavan, D., Sivakumar, P. M., Mereiter, K., Deepa, M., Kirchner, K., Doble, M., Karvembu, R., Antibacterial activities of 4-substituted-2-[(E)-{(1S,2R)/(1R,2S)-1-Hydroxy-1-Phenylpropan-2-Ylimino}Methyl]Phenol, *Chem. Biol. Drug Des.*, 79, 177-185 (2012).
- Odabaş Köse, E., Aktaş, O., Deniz, I. G., Sarıkürkçü, C., Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of endemic *Ferula lycia* Boiss., *J. Med. Plants Res.*, 4 (17), 1698-1703 (2010).
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, M. R., Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens, *Food Chem.*, 120, 765-770 (2010).
- Özek, G., Özek, T., İşcan, G., Başer, K. H. C., Duran, A., Hamzaoğlu, E., Composition and antimicrobial activity of the oils of *Ferula szowitsiana* DC. from Turkey, *J. Essent. Oil Res.*, 20 (2), 186-190 (2006).
- Pavlovic', I., Petrovic', S., Radenkovic', M., Milenkovic', M., Couladis, M., Brankovic', S., Pavlovic' Drobac, M., Niketic', M., Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae) essential oil, *Food Chem.*, 130, 310-315 (2012).
- Pimenov, M. G., Leonov, M. V., The Asian Umbelliferae biodiversity database (asium) with particular reference to South-West Asian Taxa, *Turk. J. Bot.*, 28, 139-145 (2004).
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils, *BMC Complem. Altern. M.*, 6, 39-47 (2006).
- Rassouli, F. B., Matin, M. M., Iranshahi, M., Bahrami, A. R., Behravan, J., Mollazadeh, S., Neshati, V., Kalalinia, F., Investigating the enhancement of cisplatin cytotoxicity on 5637 cells by combination with mogoltacin, *Toxicol. In Vitro*, 25, 469-474 (2011a).
- Rassouli, F. B., Matin, M. M., Iranshahi, M., Bahrami, A. R., Investigating the cytotoxic and apoptosis inducing effects of monoterpenoid stylosin *in vitro*, *Fitoterapia*, 82, 742-749 (2011b).

- Rustaiyan, A., Assadian, F., Monfared, A., Masoudi, S., Yari, M., Composition of the volatile oil of *Ferula stenocarpa* Boiss. & Hausskn, J. Essent. Oil Res., 13, 181-182 (2001a).
- Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S., Ameri, N., Essential oils of the stem and root of *Ferula galbaniflua* Boiss. et Buhse. from Iran, J. Essent. Oil Res., 14, 286-287 (2002).
- Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S., The Essential oil of *Ferula flabelliloba* Rech. F. et Aell., J. Essent. Oil Res., 13, 403-404 (2001b).
- Rustaiyan, A., Nadimi, M., Mazloomifar, H., Massudi, S., Composition of the Essential Oil of *Ferula macrocolea* (Boiss.) Boiss. from Iran, J. Essent. Oil Res., 17, 55-56 (2005).
- Sağiroğlu, M., Duman, H., *Ferula brevipedicellata* and *F. duranii* (Apiaceae), two new species from Anatolia, Turkey, Ann. Bot. Fennici, 47, 293-300 (2010).
- Sağiroğlu, M., Türkiye *Ferula* L. (Umbelliferae) Cinsi'nin Revizyonu, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2005.
- Sahebkar, A., Hassanzadeh-Khayyat, M., Iranshahi, M., Qualitative analysis of the hydro-distilled essential oil of *Ferula latisecta* Rech. f. and Aell. roots from Iran, Jeobp, 13 (3), 340-346 (2010).
- Sahebkar, A., Iranshahi, M., Volatile constituents of the genus *Ferula* (Apiaceae): a review, Jeobp, 14 (5), 504-531 (2011).
- Saleem, M., Alam, A., Sultana, S., *Asafoetida* inhibits early events of carcinogenesis A chemopreventive study, Life Sciences, 68, 1913-1921 (2001).
- Sang-Bok L., Søren, K. R., Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family, Euphytica, 114, 87-91 (2000).
- Schmidt, E., Production of Essential Oils, Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications, K.H.C. Başer and G. Buchbauer (Eds.), CRC Press, Boca Raton, London, New York 83-118 (2010)
- Sefidkon, F., Askari, F., Mirza, M., Essential oil composition of *Ferula assafoetida* L. from Iran, J. Essent. Oil Res., 10, 687-689 (1998).
- Shakeria, A., Khakdanb, F., Soheilic, V., Sahebkar, A., Rassamf, G., Asilia, J., Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*, Ind. Crop. Prod., 58, 315-321 (2014).
- Shatar, S., Essential oil of *Ferula ferulaoides* from Western Mongolia, Chem. Nat. Compd., 41 (5), 607-608 (2005).
- Suboh, S. M., Bilto, Y. Y., Aburjai, T. A., Protective Effects of Selected Medicinal Plants against Protein Degradation, Lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes, Phytother. Res., 18, 280-284 (2004).

- Tabanca, N., Demirci, B., Başer, K. H. C., Minesovics, E., Khan, S. I., Jacob, M. R., Wedge, D. E., Characterization of volatile constituents of *Scaligeria tripartita* and studies on the antifungal activity against phytopathogenic fungi, *J. Chromatogr. B*, 850, 221-229 (2007).
- Tamemoto, K., Takaishi, Y., Chen, B., Kawazoe, K., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatovd, O. K., Ashurmetovd, O., Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*, *Phytochemistry*, 58, 763-767 (2001).
- Tavares, A. C., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Canhoto, J., Salgueiro, L. R., Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity, *J. Ethnopharmacol.*, 119, 129-134 (2008).
- Valiahdi, S. M., Iranshahi, M., Sahebkar, A., Cytotoxic activities of phytochemicals from *Ferula* species, *DARU J. Pharm. Sci.*, 21, 39-45 (2013).
- Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J. K., Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂, *Toxicol. In Vitro*, 25(8), 2147-2151 (2011).
- Yousefi, M., Mohammadi, M., Habibi Z., Disulphides in the volatile oil of *Ferula behboudiana* Rech. f. & Esfand, *Nat. Prod. Res.*, 25(17), 1629-1634 (2011).
- Zanoli, P., Zavatti, M., Rivasi, M., Baraldi, M., *Ferula hermonis* impairs sexual behavior in hormone-primed female rats, *Physiology & Behavior*, 86, 69-74 (2005a).
- Zanoli, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C., Vezzalini, F., Baraldi, M., Opposite effect of acute and subchronic treatments with *Ferula hermonis* on copulatory behavior of male rats, *Int. J. Impot. Res.*, 15, 450-455 (2003).
- Zanoli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., Vezzalini, F., Baraldi, M., Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior, *Int. J. Impot. Res.*, 17, 513-518 (2005b).
- Zavatti, M., Montanari, C., Zanoli, P., Role of ferutinin in the impairment of female sexual function induced by *Ferula hermonis*, *Physiology & Behavior*, 89, 656-661 (2006).
- Zellagui, A., Gherraf1, N., Rhouati, S., Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss et Dur. leaves, endemic in Algeria, *Org. Med. Chem. Lett.*, 2, 31-34 (2012).