

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

**BAZI AROMATİK BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİMİKROBİYAL,  
ANTIÖKSİDAN VE DNA KORUYUCU AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Pelin KARAMAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Doç. Dr. Bektaş TEPE**

**2011**

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Bektaş TEPE (Danışman) .....

Üye :Doç. Dr. H. Aşkın AKPULAT .....

Üye :Yrd. Doç. Dr. Serdal ARSLAN .....

### ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen Öğretim Üyeleri'ne ait olduğunu onaylarım.

..../...../2011

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24/09/2008 tarihli ve 9 sayılı toplantısında kabul edilen C.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü "Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>TEŞEKKÜR</b>	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	ix
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xi
<b>KISALTMALAR</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler	1
1.2. Türkiye'deki Tıbbi ve Aromatik Bitkiler	2
1.3. Bitkisel Sekonder Metabolitler	3
1.4. Serbest Radikaller	5
1.4.1. Serbest Radikal Zincir Reaksiyonları	7
1.5. Antioksidanlar	8
1.6. Antimikrobiyal Ajanlar	10
1.6.1. Antimikrobiyal Ajanların Etki Mekanizmaları	12
1.6.2. Antimikrobiyal Ajan Dirençliliği	13
1.6.3. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi	15
1.6.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler	15
1.7. UV Kaynaklı DNA Hasarı	17
1.7.1. Bitki Özütlerinin DNA Koruyucu Etkisi	19
1.8. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Bitkiler	20
1.8.1. <i>Stachys iberica</i> ssp. <i>stenostachya</i> (Boiss.) Rech.fil	20
1.8.2. <i>Allium sivasicum</i> Özhatay & Kollmann	20
1.8.3. <i>Foeniculum vulgare</i> Miller	21
1.8.4. <i>Origanum laevigatum</i> Boiss.	22

1.8.5. <i>Teucrium polium</i> L.	23
1.8.6. <i>Salvia hypargeia</i> Fisch & Mey.	24
1.9. Amaç	25
<b>2. MATERYAL ve METOD</b>	26
2.1. Bitkilerin Toplanması ve Adlandırılması	26
2.2. Bitkilerin Kurutulması ve Özütleme İşlemi	26
2.3. Antioksidan Aktivite	27
2.3.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi	27
2.3.2. $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Renk Açılım Yöntemi	28
2.3.3. Metal-Şelatlama Kapasitesi	29
2.3.4. Fosfomolibdenyum Metodu	29
2.3.5. İndirgeme Gücü Kapasitesi	29
2.3.6. Fenolik Bileşik Miktarı	30
2.3.7. Flavonoid Bileşik Miktarı	30
2.4. Antimikrobiyal Aktivite	31
2.4.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	31
2.4.2. Agar Kuyucuk Metodu	31
2.4.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Metodu	32
2.5. DNA Koruyucu Aktivite	32
<b>3. BULGULAR</b>	34
3.1. Antioksidan Aktivite	34
3.1.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi	34
3.1.2. $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Renk Açılım Yöntemi	35
3.1.3. Metal-Şelatlama Kapasitesi	36
3.1.4. Fosfomolibdenyum Metodu	37
3.1.5. İndirgeme Gücü Kapasitesi	39
3.1.6. Fenolik Bileşik Miktarı	40
3.1.7. Flavonoid Bileşik Miktarı	41

3.2. Antimikrobiyal Aktivite	43
3.2.2. Agar Kuyucuk Metodu	43
3.2.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Metodu	50
3.3. DNA Koruyucu Aktivite	52
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>58</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>65</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>77</b>

**ÖZET**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI AROMATİK BİTKİ TÜRLERİNİN ANTIOKSİDAN,  
ANTİMİKROBİYAL VE DNA KORUYUCU AKTİVİTELERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Pelin KARAMAN**

**Cumhuriyet Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman**

**Doç. Dr. Bektaş Tepe**

Bu çalışma, *Stachys iberica*, *Allium sivasicum*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum laevigatum*, *Teucrium polium* ve *Salvia hypargeia* bitkilerinden elde edilen su özütlerinin *in vitro* antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında özütlerin antioksidan aktivitelerinin tespiti için,  $\beta$ -karoten-linoleik asit, fosfomolibdenyum, DPPH serbest radikal giderimi, indirgenme gücü ve şelatlama kapasitesi yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca özütlerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarları da belirlenmiştir. *O. laevigatum* özütü, DPPH ve fosfomolibdenyum metodlarına göre en yüksek aktiviteyi sergilemiştir.  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım testinde ise tüm bitki özütlerinin antioksidan aktivite değerlerinin sentetik antioksidanlar BHT ve BHA ile karşılaştırılabilecek kadar yüksek olduğu görülmüştür. Metal şelatlama yönteminde *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* özütleri kayda değer bir aktivite göstermezken, en yüksek aktiviteyi *F. vulgare* su özütü sergilemiştir. İndirgeme gücü testinde ise en yüksek aktivite *A. sivasicum* su özütünden elde

edilmiştir. *O. laevigatum*'un toplam fenolik bileşik miktarı yüksek bulunmuştur. Diğer yandan, *A. sivasicum*, flavonoidler açısından en zengin bitki olarak tespit edilmiştir. Özütle rin antimikrobiyal aktivite testlerinin sonucunda test mikroorganizmalarına karşı orta derecede aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bitki özütle ri DNA koruyucu aktiviteleri açısından etkili bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Stachys iberica*, *Allium sivasicum*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum laevigatum*, *Teucrium polium*, *Salvia hypargeia*, Antioksidan aktivite, Antimikrobiyal aktivite, DNA koruyucu aktivite



**ABSTRACT****M.Sc. THESIS****DETERMINATION OF SOME PLANT SPECIES FOR THEIR  
ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND DNA DAMAGE PROTECTION  
POTENTIALS****Pelin KARAMAN****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Molecular Biology and Genetics****Supervisor****Assoc. Prof. Dr. Bektaş TEPE**

In this study *in vitro* antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the water extracts of *Stachys iberica*, *Allium sivasicum*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum laevigatum*, *Teucrium polium* and *Salvia hypargeia* were investigated. In the first part of the study,  $\beta$ -carotene-linoleic acid, phosphomolybdenum, DPPH free radical scavenging, reducing power and metal chelating effect tests were performed to detect antioxidant activities of the extracts. Additionally, total phenolic and flavonoid constituents of the extracts were determined. The extract of *O. laevigatum* exhibited the maximum activity according to the results of DPPH and phosphomolybdenum assays. In  $\beta$ -carotene-linoleic acid bleaching test system, it was seen that the antioxidant activities of the plant extracts were found high enough when compared with those of synthetic antioxidants BHT and BHA. In the case of metal chelating effect, *A. sivasicum* and *O. laevigatum* extracts did not show remarkable activity whereas water extract of *F. vulgare* exerted the highest antioxidant activity. In the case of reducing power assay, the highest activity was obtained from the polar extract of *A. sivasicum*. Amount of the total phenolic compounds for *O. laevigatum* extract

was found high. On the other hand *A. sivasicum* extract was found as the richest plant in terms of flavonoids. According to the results of antimicrobial activity tests, the extracts were found as moderately effective against the test microorganisms. In addition, all of the plant extracts used in this study were found active in terms of their DNA damage protection potentials.

**Key Words:** *Stachys iberica*, *Allium sivasicum*, *Foeniculum vulgare*, *Origanum laevigatum*, *Teucrium polium*, *Salvia hypargeia*, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, DNA damage protection potential

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrencisi olarak beni kabul eden, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olup desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Bektaş TEPE' ye teşekkürlerimi sunarım.

Antioksidan aktivite tayini çalışmaları süresince bilgisi ve sonsuz hoşgörüsüyle yorucu çalışmaları zevkli hale getiren hocam Muğla Üniversitesi Kimya Bölümü Arş. Gör. Dr. Cengiz SARIKÜRKÇÜ' ye teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmada kullanılan bitki örneklerinin toplanması ve teşhisinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. H. Aşkın AKPULAT' a, antimikrobiyal aktivite tayini deneylerinde kullanılan bakterileri temin eden, tecrübeleri ile çalışmaları yönlendiren Sivas Halk Sağlığı Laboratuvar Müdürü Sayın Dr. Ahmet ALİM' e teşekkürlerimi sunarım. DNA koruyucu etki potansiyeli araştırmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Serdal ARSLAN' a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında karşılıksız yardımları için arkadaşlarım Yüksek Lisans Öğrencileri Muhammet KARABAŞ ve Nil ÖZBİLÜM' a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, beni destekleyen, mutluluk ve huzur kaynağım değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1.1. Sekonder metabolit sentez yolları	4
Şekil 1.2. Antimikrobiyal ajanların gram (+) ve gram (-) bakteri hücrelerine girişi	11
Şekil 1.3. Bazı antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizmaları	12
Şekil 1.4. <i>Stachys iberica</i>	20
Şekil 1.5. <i>Allium sivasicum</i>	21
Şekil 1.6. <i>Foeniculum vulgare</i>	22
Şekil 1.7. <i>Origanum laevigatum</i>	23
Şekil 1.8. <i>Teucrium polium</i>	24
Şekil 1.9. <i>Salvia hypargeia</i>	25
Şekil 3.1. Bitki özütlerinin serbest radikal giderim kapasitesi (DPPH)	34
Şekil 3.2. Bitki özütlerinin ve standartların $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteleri	36
Şekil 3.3. Bitki özütlerinin metal-şelatlama kapasitesi	37
Şekil 3.4. Askorbik asit kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 3.5. Bitki özütlerinin fosfomolibdenyum metoduna göre belirlenen antioksidan kapasitesi	38
Şekil 3.6. Bitki özütlerinin indirgeme gücü kapasiteleri	39
Şekil 3.7. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 3.8. Bitki özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları	41
Şekil 3.9. Quercetin kalibrasyon grafiği	42
Şekil 3.10. Bitki özütlerinin toplam flavonoid bileşik miktarları	42
Şekil 3.11. <i>F. vulgare</i> bitkisinin bakteri türleri üzerinde inhibisyon zonları görünümü	45
Şekil 3.12. <i>T. polium</i> bitkisinin bakteri türleri üzerinde inhibisyon	

zonları görünümü	46
<b>Şekil 3.13.</b> <i>O. laevigatum</i> bitkisinin bakteri türleri üzerinde inhibisyon zonları görünümü	47
<b>Şekil 3.14.</b> <i>S. iberica</i> bitkisinin bakteri türleri üzerinde inhibisyon zonları görünümü	48
<b>Şekil 3.15.</b> <i>A. sivasicum</i> ve <i>S. hypargeia</i> bitkilerinin bakteri türleri üzerinde inhibisyon zonları görünümü	49
<b>Şekil 3.16.</b> <i>T. polium</i> ve <i>O. laevigatum</i> özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi	53
<b>Şekil 3.17.</b> <i>S. iberica</i> ve <i>A. sivasicum</i> özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi	55
<b>Şekil 3.18.</b> <i>F. vulgare</i> özütünün DNA koruyucu aktivitesi	56
<b>Şekil 3.19.</b> <i>S. hypargeia</i> özütünün DNA koruyucu aktivitesi	57

**TABLolar DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Tablo 1.1.</b> Radikaller, simgeler, özellikleri	6
<b>Tablo 2.1.</b> Bitkilerin özüt verimleri	27
<b>Tablo 3.1.</b> Agar-kuyucuk metodu ile elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları	44
<b>Tablo 3.2.</b> MİK yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları	51

**KISALTMALAR**

AIDS	Edinilmiş bağıklık eksikliği sendromu
BHA	Butillenmiş hidrokianizol
BHT	Butillenmiş hidrokitoluen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EtBr	Etidyum bromür
FCR	Folin-Coicalteu Reaktifi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HIV	İnsan bağıklık yetmezlik virüsü
Linear DNA	Doğrusal DNA
MHA	Müller-Hilton Agar
MHB	Müller-Hilton Besiyeri
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standarts
Opencircular DNA	Tek zincir kırığı içeren halkasal DNA
QE	Quercetin eşdeğeri
Supercoiled DNA	Süper kıvrımlı halkasal DNA
UV	Ultraviyole
VIS	Görünür ışık

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler

Bitkilerin tedavi edici güce sahip olduğu bilgisi antik çağlara kadar uzanmaktadır. Eski Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalılar tarafından temelleri atılan şifalı bitkilerle tedavi ilmini, daha sonraki çağların insanları da kullanmış ve onu sürekli olarak zenginleştirmişlerdir (Çöllü, 2007).

Tıbbi bitkiler konusunda en eski ve en önemli belge M.Ö. 1550’de yazılmış olan “*Papyrus Ebers*” adlı eserdir. Papyrus ruloları üzerinde mineral, bitki ve hayvan aleminden elde edilen 700 drog (bitkisel yada hayvansal kökenli ilaç hammaddesi) ve 811 reçete bulunmaktadır. Burada hastalığın çeşidi, gerekli olan ilaç miktarı, hazırlanması günümüzdeki gibi açık ve doğru bir şekilde yazılmıştır. M.Ö. 460-377 yıllarında ise Yunan tıbbının ünlü hekimlerinden Hippokrates, 200’ün üzerinde tıbbi bitkiyi tanımlamıştır. Roma İmparatorluğu zamanında yaşamış önemli hekimlerden olan Dioscorides ise bitkileri incelemiş ve bunlardan çeşitli hastalıklara karşı kullanılan bitkileri “*Materia Medica*” adlı 5 ciltlik eserinde toplamıştır. Dioscorides’in bu eseri genellikle otlar üzerinedir ve çağının bu alanda en önemli kitabı olduğu gibi, 15. asra kadar bu eser bitki ilmi için temel bir kaynak olmuştur. Orta çağın hekimlerinden bir diğeri de Galen’dir. Galen yaklaşık 540 bitki üzerine çalışmalar yapmış ve preparat hazırlama konusunda 20’ye yakın eser ortaya çıkarmıştır. İbn-i Sina ise “*Canon Medicinæ*” adlı eserinde bütün Yunan ve Arap tıbbını sistematik olarak ele almıştır (Karamanoğlu, 1977).

Tarih öncesi çağlardan sentetik ilaçların bulunduğu 19. yy’a kadar bitkiler tıbbi tedavilerin temelini oluşturmuştur (Djeridane ve ark., 2006). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerine yapılan bir araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan bitki sayısı 20.000 olarak tespit edilmiştir. Ancak dünyadaki tıbbi bitki sayısının 100.000’i geçeceği tahmin edilmektedir (Hızlısoy, 2009). Dünya nüfusunun ise % 80’i tıbbi bitkileri kullanmakta iken gelişmiş ülkelerde ilaç preparatlarında tıbbi bitki kullanım oranı % 25’i bulmaktadır.



Son zamanlarda ise modern tıbbı tamamlayıcı olarak tıbbi bitkilerin kullanılması fikri yaygınlaşmaktadır. Bunun nedeni sentetik ilaçların artan hastalıklara karşı kimi zaman yetersiz kalması ve mutajenik, teratojenik ve karsinojenik yan etkilerinin ortaya çıkmaya başlamasıdır. Diğer bir önemli neden ise bitki drogları birden fazla etkiye sahipken, sentetik ilaçların tek bir etkiye sahip olmasıdır.

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan sekonder metabolitler olarak adlandırılan kimyasalların ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır. Kozmetik, gıda, ilaç ve parfümeri gibi birçok alanda bu biyoaktif kimyasallardan yararlanılmaktadır. Özellikle antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, bu çalışmaların artmasını teşvik etmiştir.

Sekonder metabolitlerin antioksidan aktivitelerinin araştırılmasına ilişkin pek çok çalışma mevcuttur (Vukics ve ark., 2008, Sharififar ve ark.,2009). Bu araştırmalara göre en yüksek antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin fenolik bileşikler olduğu söylenebilir. Bu bileşiklerin arasında en önemlileri fenolik bileşikler, flavonoidler ve alkaloidlerdir.

Bazı bitkilerden elde edilen özütler, antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle deri, gastrointestinal, idrar yolları ve solunum enfeksiyonlarında etkin olarak kullanılmaktadır (Rios ve Recio, 2005). Çağın en ciddi hastalıklarından biri olan kansere karşı da tıbbi bitkilerden yararlanılmaktadır. 1940 ile 2002 arasında kullanılan antikanser ilaçların % 40 kadarının doğal ürün ya da doğal ürün türevlerinden oluştuğu bilinmektedir (Balunas ve Kinghorn, 2005).

## **1.2. Türkiye'deki Tıbbi ve Aromatik Bitkiler**

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde bitkisel tür endemizminin yüksek olmasına neden olan faktörler muhtemelen şunlardır (Toroğlu ve Çenet, 2006):

- i. Üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması
- ii. Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması

- iii. Pek çok cins ve seksiyonun orjin ve farklılaşma merkezlerinin Anadolu olması

Türkiye sahip olduğu yaklaşık 12.000 bitki taksonu ile dünyada önemli bir yere sahiptir. Mevcut taksonların yaklaşık 3800'ü endemik türlerden oluşmakta olup, Türkiye'deki endemizm oranı % 31'dir. Ancak ülkemizde hala ilaç sanayinin ihtiyacı olan hammaddelerin % 70'den daha fazlası ithal edilmektedir (Yaldız ve ark., 2010).

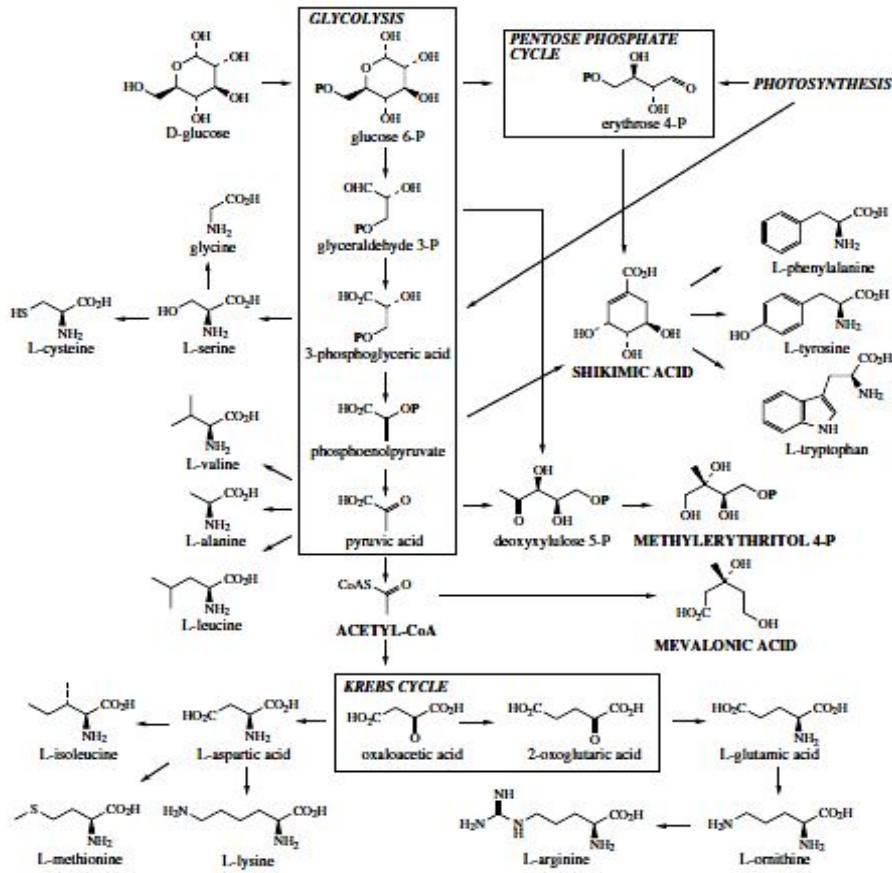
Ülkemizde bitkilerle tedavi yöntemleri çok eski çağlardan beri bilinmektedir. Günümüzde modern tıbbın gelişmesi ile birlikte bitkisel tedaviye olan gereksinim azalmış gibi görünse de özellikle kırsal bölgelerde birçok bitki; soğuk algınlığı, bronşit, mide rahatsızlıkları, tansiyon problemleri, egzema ve akne gibi cilt rahatsızlıklarına karşı halen kullanılmaya devam edilmektedir.

### **1.3. Bitkisel Sekonder Metabolitler**

Sekonder metabolit kavramı ilk olarak A. Kossel (1891) tarafından ileri sürülmüş; bundan otuz yıl sonra F. Czapek (1921), sekonder metabolitleri tanımlamıştır (Guedes, 2009).

Sekonder metabolitler, bitkinin ekosistemle olan ilişkilerinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, koruma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan kimyasallardır (Çetin, 2006). Bu kimyasallar bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri olan primer metabolitler kadar önemli maddelerdir. Genellikle çok az miktarda üretilirler. Bitkinin gelişim periyodu süresince belirli fonksiyonları yerine getirirler, bu nedenle bitki yaşamının farklı evrelerinde farklı miktarlarda sentezlenebilirler. Sekonder metabolitler primer metabolizma yollarının ara ürünlerinden özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar. Sekonder metabolitler 4 temel metabolik yoldan sentezlenirler.

İlk yol, “asetat yolu” olup bu yoldan fenoller, prostaglandinler ve makrolid antibiyotikler sentezlenir. Diğer bir yol “şikimat yolu”dur. Bu yol üzerinden alkaloidler, sinnamik asit türevleri ve lignanlar sentezlenir. Üçüncü ve dördüncü yol ise “mevolanat ve deoksi ksiloz fosfat” metabolik yollarıdır. Terpenoidler ve steroidler bu iki yol üzerinden sentezlenen metabolitlerdir (Dewick, 2002).



Şekil 1.1. Sekonder metabolit sentez yolları (Dewick, 2002).

Bitkisel sekonder metabolitler birkaç grup altında toplanabilir (Siddiqui, 2009);

#### 1. Fenolik Polifenoller:

- Basit Fenoller, Fenolik asitler
- Kinonlar
- Flavonlar, Flavonoidler, Flavonollar

- Tanenler
- Kumarinler
- Ligninler
- Fenilpropanoidler
- Fenilpropenler

*2. Terpenoidler ve Esansiyel Yağlar*

*3. Alkaloidler*

*4. Lektinler ve Polipeptitler*

#### **1.4. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller birçok fizyolojik ve patolojik reaksiyon esnasında oluşabilen, eşleşmemiş bir elektronu bulunan reaktif moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlar bu molekülleri oldukça reaktif hale getirir ve protein, lipid, nükleik asitler gibi önemli molekülleri tahrip edecek reaksiyonları başlatabilirler (Delibaş ve Özçankaya, 1995).

Çevre kirliliği, radyasyon, kimyasallar, toksinler, yağda kızartılmış yiyecekler, psikolojik stres ve daha pek çok nedenden dolayı oluşan serbest radikaller, bağışıklık sistemi antioksidanlarının tükenmesine, gen ifadesinde değişmelere ve mutasyonların oluşumuna neden olur (Pourmorad ve ark., 2006). Sağlıklı biyolojik sistemlerde antioksidasyon ile oksidasyon arasındaki denge kritik bir öneme sahiptir. Ancak serbest radikallerin artışı vücutta bu dengeyi bozar. Bu dengesizlik, diyabet, kanser, felç, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına sebep olabilir (Letelier ve ark., 2008). Ayrıca yaşlanma sürecinde cilt kırışıklıkları, böbrek fonksiyonlarında azalma ve immün hastalıklara yatkınlığın artması gibi tablolara da serbest radikallerin neden olduğu bildirilmektedir.

Aktif oksijen türleri arasındaki en reaktif formlar tek bir elektronun moleküler oksijene eklendiği süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ) ve bu radikallerin bazı metal iyonlarının mevcudiyetinde ( $Fe^+$ )  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmesi neticesi oluşan daha reaktif  $OH^\bullet$  radikalleridir (Kozluca, 1993).

Reaktivite sıralaması:  $\text{HO}^\bullet$  ve  $^1\text{O}_2 > \text{O}_2^{\bullet-} > \text{H}_2\text{O}_2$

**Tablo 1.1.** Radikaller, Simgeler, Özellikleri (Çöllü,2007)

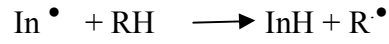
Radikal	Simge	Özellikler
Hidrojen	$\text{H}^\bullet$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	$\text{O}_2^\bullet$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	$\text{OH}^\bullet$	En toksik oksijen metaboliti
Hidrojen Peroksit	$\text{H}_2\text{O}_2$	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Tekli oksijen	$\text{O}_2^\bullet$	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	$\text{HO}_2^\bullet$	Lipitlerde hızlı çözülerek lipit peroksidasyonu artırır
Peroksil radikal	$\text{ROO}^\bullet$	Peroksil daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olur
Triklorometil	$\text{CCl}_3$	$\text{CCl}_4$ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiol radikali	$\text{RS}^\bullet$	Sülfürlü ve eşleşmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	$\text{RO}^\bullet$	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	$\text{NO}$	L-arjinin amino asitinden üretilir
Azot dioksit	$\text{NO}_2$	$\text{NO}$ 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

İnsanlarda çeşitli rahatsızlıklara ve yaşlanmaya neden olduğu bilinen oksidatif stres; oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin, hastalıklara sebep olan oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanabilir. Dengenin oksidasyon yönüne doğru kayması çok kolaydır (Katalinic ve ark., 2006). Oksidatif strese neden olan radikal yapımı eksojen ve endojen faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir. Çoklu doymamış yağ asitleriyle beslenme, alkol alımı, aşırı demir ve bakır alınması, antioksidan içeren gıdalarca fakir ve hayvansal proteinlerce zengin beslenme, sigara dumanı, hava kirliliği ( $\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ), diğer kirleticiler (asbest, pestisit) ve radyasyona maruz kalma eksojen faktörler arasındadır. Bilinçsiz yapılan veya yetersiz fiziksel egzersiz, stres, yaşlılık, doku hasarı ve kronik hastalıklar, enzim reaksiyonları, otooksidasyon tepkimeleri endojen faktörlere örnek verilebilir (Antmen, 2005).

### 1.4.1. Serbest Radikal Zincir Reaksiyonları

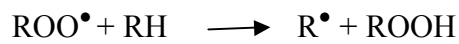
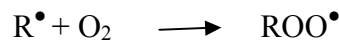
Lipit peroksidasyon süreci, çeşitli radikalleri açığa çıkaran kompleks serbest radikal zincir reaksiyonlarına neden olur. Gıdalardaki yağlarda meydana gelen lipit peroksidasyonu, sadece gıdalarda bozulmaya neden olmaz, bunun yanı sıra mutasyon ve kanser oluşumu, kireçlenme, damar tıkanıklığı ve yaşlanmayla ilişkili peroksil, hidroksil, alkoksil serbest radikali gibi aktif oksijen türleri ya da serbest radikalleri meydana getirir (Panpipat ve ark., 2010). Başlangıç, ilerleme, sonuç aşamalarından oluşan serbest radikal zincir reaksiyonlarına “*oto-oksidasyon*” adı verilir.

*Başlangıç:* Başlangıç basamağındaki anahtar nokta, bir başlatıcı radikal ( $\text{In}^\bullet$ ) ile yağ asiti (RH) substratının reaksiyonu sonucu bir lipit radikalinin ( $\text{R}^\bullet$ ) oluşmasıdır.



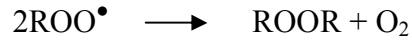
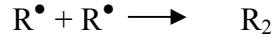
(  $\text{In}^\bullet$  : Başlatıcı bir radikal, RH: Yağ asiti,  $\text{R}^\bullet$  : Lipit radikali )

*İlerleme:* Serbest radikal zincir reaksiyonlarındaki ilerleme basamağı; oksijen ile radikal bağlama, atom ya da grup transferleri, parçalama ve yeniden düzenleme gibi süreçleri içerir. Bu aşamada  $\text{R}^\bullet$  radikale oksijen eklenmesiyle peroksil radikali ( $\text{ROO}^\bullet$ ) meydana gelmektedir (Porter ve ark., 1995). Lipit peroksil radikalleri sadece yağ asitleri ile etkileşime girmekle kalmaz aynı zamanda karbonhidrat, peptitler gibi diğer biyolojik moleküllerle de reaksiyona girerek yapılarını bozar (Göğer, 2006). Bu peroksil radikali diğer bir yağ asiti (RH) molekülünden ayrılan bir hidrojen atomu ile birleşerek tekrar hidroksiperoksitlere ( $\text{ROOH}$ ) ve yeni lipit radikallerine dönüşmektedir.



( $\text{ROO}^\bullet$  : Lipit peroksil radikali,  $\text{ROOH}$ : Lipit hidroperoksidi)

*Sonlanma:* Sonuç basamağında ise oluşan radikaller birbirleriyle reaksiyona girerek radikal olmayan ester, eter, aldehit, keton ve alkol gibi kararlı radikal olmayan ürünlerine dönüşmektedir (Koca ve Karadeniz, 2003).



### 1.5. Antioksidanlar

Antioksidan maddelerin birçok farklı tanımı vardır. Antioksidan maddeler, özellikle okside edilebilir substrata oranla, daha düşük konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktiren, engelleyen maddelerdir (Sies, 1997). Canlılar reaktif oksijen türlerine karşı vücutta organ ve hücre sistemlerini korumak için kompleks ve karmaşık antioksidan sistemleri geliştirmişlerdir. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize eden birlikte ve karşılıklı etkileşim gösteren hem endojen hem de eksojen orjinli farklı bileşiklerdir. Bu bileşikler orjinlerine göre 4 ana grupta incelenebilir:

- *Besin türevli antioksidanlar:* Askorbik asit (C vitamini), tokoferol (vitamin E), karotenoid, glutatyon ve lipoik asit gibi diğer düşük moleküler ağırlıklı bileşikler.
- *Antioksidan enzimler:* Serbest radikal giderme reaksiyonlarını kataliz eden glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz.
- *Metal bağlama proteinleri:* Oksidatif reaksiyonları katalizleme kapasitesine sahip bakır iyonları, albümin, laktoferrin ve ferritin.
- *Diğer bitkisel besin antioksidanları:* Birçok bitkide mevcut fenolik bileşikler (Percival, 1996).

Antioksidanlar, oksidatif süreçte 5 değişik aşamada görev alabilirler. Bu mekanizmalar;

1. Lokal oksijen konsantrasyonunu azaltmak
2.  $O_2^-$ ,  $HO^-$  gibi başlatıcı radikalleri ortadan kaldırarak zincir reaksiyonunun başlamasını engellemek
3. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak, radikal oluşumunun başlamasını engellemek
4. Peroksitleri parçalayarak onların zincir reaksiyonu oluşturan radikallere dönüşümünü engellemek
5. Aktif radikaller tarafından başlamış olan bir radikal zincir reaksiyonunu kırmak (Dorman ve ark., 2003).

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik (enzim olmayan) antioksidanlar şeklinde sınıflandırılabilir. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin etkisi, hem enzim hem de enzim olmayan antioksidanlar tarafından dengede tutulur. En etkili enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz'dır. Vitamin C, vitamin E, karotenoidler, tiol antioksidanlar (glutatyon, thioedoksin, lipoik asit), doğal flavonoidler ve melatonin non-enzimatik antioksidanlar arasında sayılabilir (Şahin ve ark., 2004).

Antioksidan maddeler, sentetik ve doğal antioksidanlar olarak da 2 temel kategoriye ayrılır. BHT (butillenmiş hidroksi toluen) ve BHA (butillenmiş hidroksi anizol), 1940'lı yıllarda sentetik antioksidanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. BHT ve 2-BHA karışımı, lipid peroksidasyonuna karşı birlikte etki göstererek, peroksit radikalleri ile olan reaksiyonları engeller. BHT ve 2-BHA'nın hidrojen verici olması BHT ve 2-BHA karışımının antioksidatif etkisinin sonucudur (Hudson, 1990). Sentetik antioksidanların çeşitli yan etkilere sebep olduklarının anlaşılmasının ardından kullanımı birçok ülkede kısıtlanmıştır (Gülçin ve ark., 2004). Bu maddeler, canlı organizmalarda kanserojen etkiler gösterebilmekte ve karaciğerde büyümeye ve mikrozomal enzim aktivitelerinde artışa sebep olabilmektedir. Bu nedenle gıdaların bozulmasını engelleme, çeşitli



hastalıklardan insanları koruma, yağların oksidatif bozulmalarını geciktirme ve serbest radikal reaksiyonlarını önleme kapasitesine sahip doğal antioksidanlara olan ilgi son yıllarda artmaktadır (Ebrahimabadi ve ark., 2010).

Fitokimyasalların (bitkisel kökenli kimyasalların) antioksidan aktiviteleri gün geçtikçe daha fazla anlaşılmaya başlamıştır (Percival, 1996). İnsan sağlığı üzerindeki olumlu rolleri nedeniyle bitkilerdeki antioksidan bileşenler ve fitokimyasallar bilim adamları, gıda üreticileri ve tüketiciler arasında önemli bir yere sahiptir (Lako ve ark., 2007). Birçok tıbbi bitki organı (kökler, yapraklar, gövdeler, kabuklar, çiçekler ve meyveler); flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, taninler, kumarinler, ligninler ve lignanlar gibi fenolik bileşiklerce zengindir. Flavonoidler ve fenolik asitlerin antioksidan özellikleri, onların tekli oksijen giderme, metal şelatlama yetenekleri ve redoks potansiyellerine dayanmaktadır (Surveswaran ve ark., 2007).

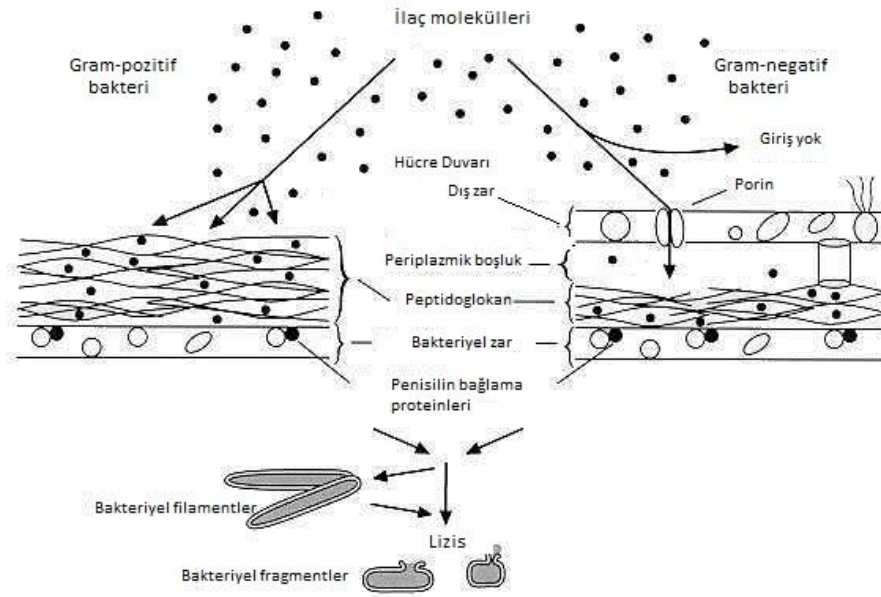
### **1.6. Antimikrobiyal Ajanlar**

Tıbbi ve aromatik bitkilerin antiseptik özellikleri eski çağlardan beri bilinmesine rağmen, ancak 1900'lü yılların başında laboratuvarlarda bu özellikleri test etmek için girişimler başlamıştır (Dorman ve Deans, 2000). Bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinden birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler izole edilmiştir (Hızlısoy, 2009). Antik çağlardan bu yana, insanoğlu bazı yaygın enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bitkileri kullanmıştır. Halk arasında yaban mersini (*Myrtus communis*) üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırken, oğulotu (*Melissa officinalis*), sarımsak (*Allium sativum*) ve çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) gibi türler geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olarak kabul görmüştür. Pek çok bitkisel özüt; solunum, üriner ve gastrointestinal sistemlerdeki bulaşıcı patojenlerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rios ve Recio, 2005). Antimikrobiyal etki gösteren kimyasallar genel olarak alkaloid, flavonoid, isoflavonoidler, taninler, kumarinler, terpenler, fenilpropenler ve organik asitlerdir.

Antimikrobiyal ajanların etki mekanizmaları mikroorganizmaların hedef bölgeleri ve bakteri hücre yapıları ile ilişkilidir (Mendonça, 2006). Bakteriler

hücre duvarı yapılarına göre gram pozitif ve gram negatif olmak üzere 2 grupta incelenir.

Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabaka, hücre duvarının %50-90, gram negatif bakterilerde ise sadece % 5-10 kadarını kapsamaktadır. Gram pozitif hücre duvarı, teichoic asit ve polisakkaritler içerir. Gram negatif hücre duvarı daha komplekstir ve lipopolisakkaritler mevcuttur. Lipopolisakkaritler dıştan içe doğru 3 bölümden oluşur. İlk bölüm O-antijenlerinin tespit edildiği, ikinci bölüm çekirdek polisakkarit ve üçüncü bölüm ise endotoksin aktiviteden sorumlu glikolipit kısımdır. Gram negatif bakterilerde dış zar olarak adlandırılan tabaka dış zar proteinlerinden oluşmuştur. Bu proteinler arasında küçük moleküllerin difüzyonunu sağlayan porinler yer almaktadır (Kakore, 2008).



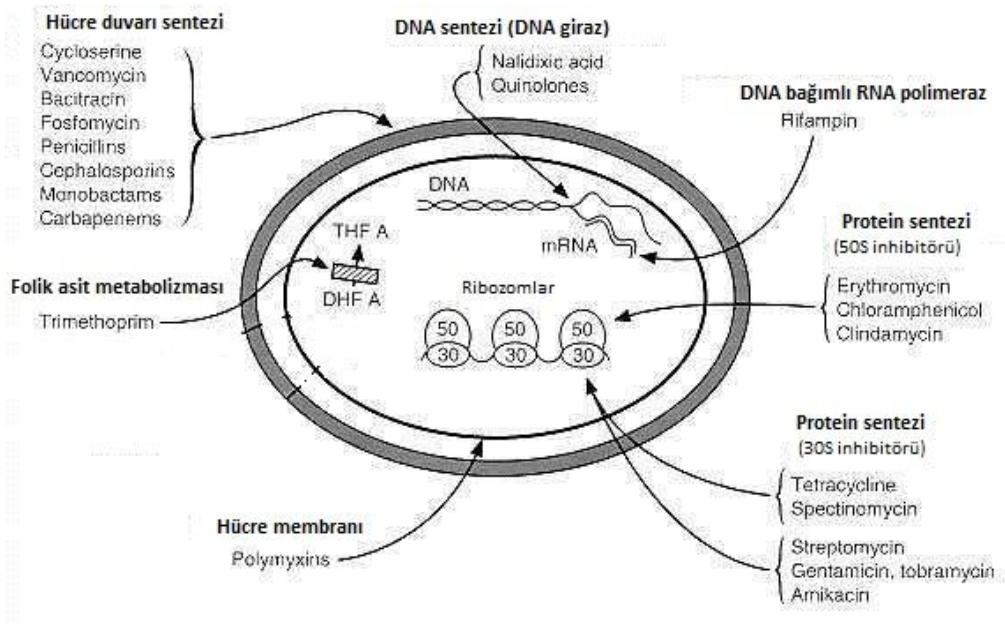
**Şekil 1.2.** Antimikrobiyal ajanların Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri hücrelerine girişi (Baron, 1996).

### 1.6.1. Antimikrobiyal Ajanların Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal ajanlar, hücre duvarı sentezini, protein sentezini, nükleik asit sentezini ve metabolik yolları inhibe ederek etkinlik sağlayabilirler (Şekil 1.3).

*Hücre duvarı inhibitörleri:* Bazı antimikrobiyal ajanlar peptidoglikan tabakanın sentezi için gerekli olan enzimleri engelleyerek etki sağlarlar.

*Protein sentezi inhibitörleri:* Bakteri ribozomları ile ökaryotik ribozomların yapıları birbirinden farklıdır. Bazı antimikrobiyal ajanlar bu farklılıktan yararlanarak, prokaryot ribozomunun iki alt birimi olan 30S ve 50S veya bu alt birimlerin birleşimi olan 70S ribozomal alt birimine bağlanarak etki ederler.



Şekil 1.3. Bazı antimikrobiyal ajanlar ve etki mekanizmaları (Baron, 1996).

*Nükleik asit sentezi inhibitörleri:* Bazı antimikrobiyal ajanlar folik asit sentezini inhibe ederek ve DNA replikasyonu sırasında DNA çift zincirini gevşeten DNA giraz enzimine bağlanarak etki gösterir.

*Metabolik yol inhibitörleri:* Folik asit analogu olarak etki gösteren antimikrobiyal ajanlar, bakteriyel folik asit sentezinde enzimatik yoldaki bazı basamakları inhibe ederek DNA sentezini durdurur.

*Sitoplazmik membran inhibitörleri:* Antimikrobiyal ajanların bu tipi sitoplazmik membran geçirgenliğini artırarak destabilizasyona yol açabilir. Bazı ajanlar ise bakteri hücre zarındaki lipit içerisine girerek membranı depolarize eder ve bakteri hücresinin ölümüne neden olur (Tenover, 2006).

### **1.6.2. Antimikrobiyal Ajan Dirençliliği**

Tarih boyunca insanlarla hastalığa sebep olan mikroorganizmalar arasında sürekli bir savaş olmuştur. 20. yy ortalarında antibakteriyal ilaçlarla ilgili gelişmeler ve enfeksiyon kontrolünde yardımcı olan diğer ilaçların katkısı ile bu savaş insanların lehine dönmüştür. Antibakteriyal ajanların yaygın kullanılmaya başlamasından hemen sonra bakteriler çeşitli direnç formları ile karşılık vermiştir (Kuyucu, 2007).

Bakteriler çeşitli mekanizmalar ile antibakteriyal ilaçlara direnç ortaya koyabilirler. Bazı bakteri türleri doğal direnç mekanizmasına sahiptirler. Ancak asıl kaygı verici olan, eskiden antibakteriyal ajanlara duyarlı olan bakteri popülasyonunun bu ajanların kullanımının seçici baskısı altında direnç kazanması, üremesi ve yayılmasıdır (Tenover, 2006). Bakterilerin, genetik özelliklerindeki değişime bağlı olarak önceden duyarlı olduğu bir antibakteriyal ajandan etkilenmemesi durumuna, “*kazanılmış direnç*” adı verilir (Yüce, 2001). Genetik değişiklik çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. Nokta mutasyonlar hedef bağlanma yerlerini değiştirerek antimikrobiyal ajanın aktivitesini engelleyebilir. Bakterilerde görülebilen diğer bir genetik değişiklik büyük bir DNA segmentinin yeniden düzenlenmesidir. Bakteri kromozomu veya plazmidi bir lokalizasyonundan büyük bir DNA segmenti, bir diğer bölgeye inversiyon, duplikasyon, insersiyon, delesyon veya transpozisyon ile taşınarak yeniden düzenlenme geçirebilir. Plazmidler, bakteriyofajlar, yalın DNA dizimleri veya taşınabilir genetik elementler aracılığıyla gerçekleşen yabancı bir DNA segmentinin kazanılması da diğer bir genetik değişikliktir. Bu mekanizmalarla herhangi bir antimikrobiyal ajana direnç gelişebilir. Antibiyotik direnç geni bir kez geliştikten sonra bu direnç transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon ve transpozisyon ile bakteriler arasında yayılır (Kuyucu, 2007).

- *Transformasyon:* Hücre lizisinden sonra açığa çıkan DNA'nın diğer bakteri hücresi tarafından içine alınmasıdır. Bu şekilde önceden duyarlı suşların içerisine direnç genleri taşınabilir.
- *Transdüksiyon:* Direnç genlerinin bakteriyofaj aracılığıyla transferidir.
- *Konjugasyon:* İki bakteri arasında, uzamış proteinli bir yapı olan piluslar aracılığıyla gerçekleşen DNA transferidir (Tenover, 2006).
- *Transpozisyon:* Transpozon veya taşınabilir elementler şeklinde bilinen kısa DNA sekanslarının aktarımıdır (Yüce, 2001).

Bakterilerde enzimatik inaktivasyon, permeabilitenin azalması, antibiyotiğin aktif pompa sistemiyle dışarı çıkarılması, reseptör veya bağlanma bölgesinde oluşan değişme, alternatif bir metabolik yolun kullanılması gibi farklı direnç mekanizmaları vardır.

*Enzimatik inaktivasyon:* Bakteriler, onları inaktif hale getiren antimikrobiyal ajanları kimyasal olarak değiştiren, parçalayan bir enzim ya da daha fazla enzim üretebilir (Alanis, 2005).

*Bakteriyel membran permeabilitesinde azalma:* Gram negatif bakterilerde bulunan dış membran lipitlerden zengin bir tabaka olup antibiyotiklerin hücreye girmesini engelleyen bariyer görevi yapar. Bu bakterilerde antibiyotiklerin hücre içine girmesi, dış membrandaki porinler aracılığıyla olur. Mutasyonlar ile membran porin proteinlerindeki değişimlerle geçirgenlik azalarak dirençli suşlar ortaya çıkabilir (Yüce, 2001).

*Aktif pompa sistemi:* Aktif pompalar, hücre içinden dış ortama çıkarılan toksik maddelerin atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Bu proteinler hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde bulunur (Webber ve Piddock, 2003).

*Reseptör veya bağlanma bölgesinde oluşan değişme:* Antibiyotiklerin bağlandığı hedef bölgeler farklıdır. Bunlar ribozomlar ve çeşitli enzimler olabilir. Bu noktalarda tek bir mutasyon sonucu antibiyotiğe bağlanma özelliği düşük yeni bir hedef oluşumu söz konusudur. Bazen de bir dizi mutasyon veya yabancı bir DNA'nın kromozoma eklenmesi sonucu hedef değişimi olabilmektedir (Yüce, 2001).

### **1.6.3. Bitki Özülerinin Antimikrobiyal Aktivitesi**

Bitkilerin tedavide kullanılmaları çok eski tarihlere dayanır. Doğada yetişen bazı bitkilerin antimikrobiyal etkilere sahip oldukları uzun yıllardır bilinmektedir. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Kırbağ ve Zengin, 2006). Tıbbi bitkiler antimikrobiyal ajan olarak çok zengin bir kaynaktır. Yüzlerce bitki türünün antimikrobiyal özellikleri çalışılmasına rağmen, çok büyük bir bölümü henüz keşfedilmemiştir (Masesh ve Satish, 2008). Antibiyotiklerin ortaya çıktığı 1950'lerde, bitkilerden elde edilen maddelerin antimikrobiyal olarak kullanımı henüz yaygın değildi. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde elde edilen başarıların üzerine antibiyotikler, mucize ilaç olarak kabul edilmiş ve birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fakat daha sonraki yıllarda direnç gelişimi görülmeye başlanmıştır. Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bu ilaçlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar bildirilmekte ve sorunun boyutları giderek büyümektedir (Kürek, 2007). Buna karşılık mikroorganizmalar antimikrobiyal aktivite gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazanmamaktadır. Bunun nedeni sentetik olarak üretilen ilaçların tek bir aktif madde içermesidir. Oysa bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte kompleks yapı halinde bulduklarından bakterilerin bu yapılara karşı "çoklu" direnç geliştirmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle son yıllarda bilim adamları bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması çalışmalarına ağırlık vermiştir.

### **1.6.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler**

Bugüne kadar bitkilerden 12.000'in üzerinde sekonder metabolit izole edilmiştir. Bu sayının toplam sekonder metabolit sayısının sadece %10'u kadarını oluşturduğu tahmin edilmektedir.

Antimikrobiyal aktivite gösteren fitokimyasallar birkaç ana grup altında incelenebilir.

*Basit fenoller ve fenolik asitler:* Tek bir fenolik halka içeren en basit biyoaktif fitokimyasallardan birisidir. Fenol grupları üzerindeki hidroksil gruplarının bağlanma yeri ve sayısının, mikroorganizmalar üzerine toksisitesi ile ilişkili olduğu düşünülmüş ve hidroksilasyon artışının toksisiteyi artırdığı kanıtlanmıştır. Buna ek olarak, bazı araştırmacılar daha yüksek oranda okside olmuş fenollerin daha iyi inhibitör olduğunu tespit etmiştir (Cowan, 1999).

Fenolik bileşiklerin ana etki mekanizmasının, okside olmuş bileşiklerle proteinlerin spesifik olmayan etkileşimleri olduğu düşünülmektedir. Fenolik bileşikler içerisinde yer alan eugenol, catechol, caffeic ve sinamic acid gibi bileşiklerin bakteri, virüs ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Cowan, 1999).

*Kinonlar:* Kinonlar, iki keton içeren aromatik halkaya sahiptir. Bu bileşikler, nükleofilik aminoasitlerle geriye dönüşümsüz bir kompleks oluşturarak, proteinlerin inaktivasyonuna ve fonksiyon kaybına neden olur. Kinonların potansiyel antimikrobiyal etki aralığı çok geniştir. Mikrobiyal hücrelerdeki hedefler, hücre duvarı polipeptitleri ve membran bağımlı enzimlerdir.

*Flavonlar, flavonoidler ve flavonoller:* Flavonlar, bir karbonil grubu içeren fenolik yapılardır. Bu yapıya 3-hidroksil grubu eklenerek bir flavonol oluşur. Flavonoidler ise aromatik bir halkaya C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ünitesinin bağlanmasıyla oluşan hidroksillenmiş fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkiler tarafından mikrobiyal enfeksiyonlara cevap olarak üretilirler. Bu nedenle *in vitro* ortamda mikroorganizmaların birçoğuna karşı etkili olmaları sürpriz değildir. Bu bileşikler antimikrobiyal aktivitelerini bakteri hücre duvarı ve hücre dışı çözünebilir proteinlerle kompleks oluşturma yeteneklerine borçludurlar. Daha lipofilik flavonoidler mikrobiyal membrana da hasar verebilirler.

*Tanenler:* Buruk tadları ile tanınan, derinin dabaklanmasında kullanılan, kanı pıhtılaştırma özelliği bilinen polimerik fenolik bileşiklerin bir grubunun genel adıdır. Moleküler ağırlıkları 500-3000 dalton arasında değişmekte olup genellikle birçok bitkinin kabuk, odun, yaprak, meyve ve köklerinde bulunur. İki grup altında incelenebilirler; hidrolizlenebilen tanenler ve kondense tanenler. Hidrolizlenebilen tanenler gallik asit merkezliken, kondense tanenler ise

flavonoid monomerlerinden türevlenirler (Cowan, 1999). Bu bileşikler antimikrobiyal etkilerini hücre membranında elektron taşıma sistemlerini tahrip ederek sağlarlar (Ergezer ve Çam, 2008).

*Kumarinler:* Benzen ve  $\alpha$ -piron halkasının kaynaşmasıyla oluşan fenolik bileşiklerdir. Kumarinler; antitrombotik, anti-inflamatuar, anti-viral ve vazodilatör aktiviteleri ile bilinirler. Bu gruptaki bileşiklerin makrofajları uyardığı tespit edilmiştir.

*Terpenoidler ve esansiyel yağlar:* Terpenler olarak isimlendirilen bu yağlar, izopiren yapılardan oluşan sekonder metabolitlerdir. İzopiren birimlerinden oluşan zincirlerin büyümesiyle meydana gelen terpenlerin sınıflandırılması; hemiterpenler (C<sub>5</sub>), monoterpenler (C<sub>10</sub>), seskiterpenler (C<sub>15</sub>), diterpenler, triterpenler ve tetraterpenler (C<sub>20</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>40</sub>) şeklinde olur.

Bu bileşikler bakterilere, funguslara, virüslere ve protozoalara karşı aktiftirler. Terpenlerin antimikrobiyal etki mekanizması henüz anlaşılammış olmasına rağmen, hücre membranı içerisindeki lipofilik bileşiklerin arasına girerek etki gösterdiği tahmin edilmektedir (Cowan, 1999).

*Alkaloidler:* Alkaloidler, heterosiklik bir halka ve nitrojen atomu içerirler. İlk teşhis edilen alkaloid olan “*morfin*”, 1805 yılında *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinden izole edilmiştir. Kodein ve eroin, morfin türevleridir. Yaklaşık 6500 bileşik ile sekonder metabolitler arasında en geniş sınıflardan biridir. Alkaloidlerin doğal ve modifiye edilmiş formları günümüzde modern tıpta halen kullanılmaktadır. Berberin, antimikrobiyal aktivitesi ile tanınan bir alkaloiddir. DNA zincirleri arasına girerek replikasyonu engelleyici etki gösterdiği bilinmektedir. Berberin, HIV-1 revers transkripsiyonunu inhibe ettiği için AIDS hastalığının tedavisinde kullanılması muhtemel bileşiklerdendir (Aniszewski, 2007).

### **1.7. UV Kaynaklı DNA Hasarı**

Endojen ve ekzojen faktörlerin etkisiyle, genetik materyalin moleküler bütünlüğünde meydana gelen tüm değişiklikler “*DNA hasarı*” olarak adlandırılır. DNA bütünlüğü çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli olarak tehdit altındadır.



Reaktif oksijen türlerinin artması sonucu ortaya çıkan oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde şeker ve baz modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, bazik olmayan bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Atmaca ve Aksoy,2009). Sonuçta meydana gelen DNA hasarı mutajenite, karsinojenite ve yaşlanmaya yol açmaktadır. Reaktif oksijen türleri DNA'da 20'den fazla oksidatif hasarlı baz ürününün oluşmasına yol açar. Guanin, DNA bileşenleri içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşik olup serbest radikallerin etkilerine çok açıktır. Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), guanin'in 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir. 8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı yaklaşık 23 tane oksidatif baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinendir. DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimini artırır.

Reaktif oksijen türleri üretiminin artmasına sebep olan tüm etkenler, 8-OHdG oluşumuna yani oksidatif DNA hasarına katkıda bulunur. Oksijen radikali üreten ajanlar arasında  $H_2O_2 + UV$ 'nin deoksiguanozin' den (dG) 8-OHdG oluşumu *in vitro* olarak gösterilmiştir (Yokuş ve Çayır, 2002).

Deri kanseri görülme sıklığı sürekli olarak artmaktadır, bunun nedeni ise güneşin genotoksik UV (ultraviyole) ışınlarının artışına bağlanmaktadır (Yamaguchi, 2009). Dünyaya ulaşan UV ışınlarının çoğu (% 90) UV-A (315-400 nm) ışınları olup UV-B' ye (280-315 nm; epidermise kadar ulaşabilir) oranla derinin daha derin tabakalarına (dermis) ulaşabilir.

İnsan derisi VIS (görünür ışınlar) ve UV ışınlarının zararlı etkisini azaltacak bir dizi mekanizmaya sahiptir. Bunlar, reaktif oksijen türlerini baskılayan ya da yakalayan enzimatik ya da non-enzimatik antioksidan savunma sistemleridir. UV-A / VIS ışınlarına yüksek seviyede maruz kalma hücrel antioksidan tükenmesine ve sonuçta reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarına yol açabilir (Roche ve ark., 2010).

### 1.7.1. Bitki Özütlerinin DNA Koruyucu Etkisi

Antioksidanların oksidatif DNA hasarına ve kansere karşı koruyucu etkileri birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Yamaguchi ve ark.,2009, Tepe ve ark., 2010). Bu çalışmalarda antioksidanların kanser indüksiyonunu veya büyümesini azaltabildikleri gösterilmiş ve reaktif oksijen türleri ile indüklenen DNA hasarının bu fitokimyasallar ile kontrol edilebileceği tespit edilmiştir (Karaca ve Güder, 2009).

Wei ve ark. (1999), yeşil çay ve siyah çayın su özütlerinin UV-kaynaklı oksidatif DNA hasarını engelleme etkinlikleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda hem yeşil, çay hem de siyah çayın UV-kaynaklı oksidatif DNA hasarına karşı koruma etkinliği anlamlı bulunmuştur.

Yamaguchi ve ark. (2009), *Araucaria angustifolia*'dan izole edilen biflavonoidlerin UV-kaynaklı DNA hasarını engelleme yeteneklerini araştırmak için yaptıkları çalışmada biflavonoidlerin UV-B ışınlarına karşı etkili olduğunu ancak UV-A ışınlarına karşı DNA koruyucu etki gösteremediklerini ortaya koymuşlardır.

Kumar ve Chattopadhyay (2009) tarafından *Mentha spicata* n-butanol özütünün DNA koruyucu aktivitesi üzerine yapılan çalışmada ise, DNA koruyucu etkinin yüksek olduğu ve bu etkinin bitkideki polifenollerden kaynaklandığı gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmaya göre ise, *Cistus incanus* ve *C. monspeliensis*'den elde edilen su özütlerinin DNA hasarını önleme yetenekleri ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki bitkinin de doza bağımlı serbest radikal yakalama kapasitelerinin varlığı kanıtlanmıştır. Ayrıca buna paralel olarak DNA hasarını önleme kapasiteleri de yüksek bulunmuştur (Attiguile ve ark., 2000).

## 1.8. Çalışma Kapsamında Değerlendirilen Bitkiler

### 1.8.1. *Stachys iberica* ssp. *stenostachya* (Boiss.) Rech.fil

*Stachys*, “mısır koçanı” ya da “başak” anlamına gelen Yunanca bir kelimedir. *Stachys*, Lamiaceae familyasının en geniş sınıflarından birisidir ve 270’in üzerinde bitki türü içerir (Radulovic ve ark., 2007). Türkiye’de 76 tür ile temsil edilir. Türkiye’de bu tür 3 alttür ve 2 varyete ile temsil edilir (Kaya ve ark., 2001). *S. iberica*, halk arasında; bronşit, astım, soğuk algınlığı, karın ağrısı, safra ve karaciğer rahatsızlıklarının giderilmesinde bitkisel tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır (Tepe ve ark., 2010).



Şekil 1.4. *S. iberica*

### 1.8.2. *Allium sivasicum* Özhatay & Kollmann

*Allium* genusu Liliaceae familyasına ait olup polifenollerin bir grubu olan besinsel flavonoidlerin en büyük kaynaklarından birisidir. Bu genus üyeleri çok yıllık, yumrulu ve otsu bitkilerdir. Kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde yayılış gösterirler. Tek yıllık, iki yıllık ve çok yıllık otsu bitkilerdir ve dünyada 700’ün üzerinde türle temsil edilirler. Türkiye’de ise 164 türü mevcut olup bu türlerin 65’i endemiktir (Polat ve ark., 2007). *Allium* türlerinin dünyanın en eski tarımı yapılan sebzelerden olduğu bilinmektedir. Bu bitkiler sebze ya da baharat

olarak ve tıpta kullanılmaktadır. *Allium* türleri bugüne kadar genellikle tatları nedeniyle tüketilmelerine rağmen son zamanlarda onların besinsel önemleri nedeniyle de tüketimlerine olan ilgi artmıştır (Benkeblia ve Lanzotti, 2007). *A. sivasicum* türü ise halk arasında “*yabani sarımsak*” olarak bilinir. Çalışmalarda bu türün güçlü antineoplastik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Turan ve ark., 2010). Ayrıca farklı çalışmalarda antioksidan ve amip öldürücü aktivitelerin varlığı tespit edilmiştir (Tepe ve ark., 2005).



Şekil 1.5. *A. sivasicum*

### 1.8.3. *Foeniculum vulgare* Miller

Çok eski tarihlerden bu yana bilinen *F. vulgare*, Apiaceae familyasına ait bir türüdür. Halk arasında bilinen adı “*rezene*” olan bu bitki; tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık olabilir. Akdeniz kıyısındaki ülkelerde doğal olarak yetişmektedir (Oktay ve ark., 2003). Bitkinin gövdeleri dik, içleri boş ve silindirik şeklinde ve tüsüzdür. Uzun saplı, birleşik şemsiye şeklinde ve küçük sarı çiçekleri vardır. Tohumları ise oval şekilde, güçlü, lezzetli bir tada sahiptir (Kaur ve Arora, 2010). Aromatik tadı sebebiyle soslara, yemeklere, salatalara katılabilmektedir. Rezene; kas gevşetici, idrar söktürücü ve uyarıcı etkileri nedeniyle halk arasında kullanılmaktadır (Özcan ve Chalchat, 2006). Ayrıca rezene ve rezenenin tıbbi ilaç preparatlarından mide-bağırsak rahatsızlıkları, şişkinlik, gaz şikayetleri gibi hazımsızlık sorunlarında da faydalandığı bilinmektedir (Özbek ve ark., 2003). Anethole, limonene ve fenchone gibi rezeneden izole edilen terpenoidler tıbbi

amaçla, kozmetikte ve parfümeri endüstrisinde sıklıkla kullanılan bileşiklerdendir (Özbek ve ark., 2002).



Şekil 1.6. *F. vulgare*

#### 1.8.4. *Origanum laevigatum* Boiss.

*Origanum* türleri yarı çalimsı ya da otsu çok yıllık bitkilerdir. Bu türler özellikle Akdeniz ülkelerinde, Avrupa, İran, Anadolu, Kuzey Amerika, Asya'nın bir bölümünde ve Sibiry'a da yetişir. *Origanum* genusu Türkiye'de 23 tür ve 32 takson, dünyada ise 41 tür ve 52 taksonla temsil edilir. Türkiye'de "kekik" adı ile bilinen *Origanum* türleri, tüm dünyada eski çağlardan beri ilaç ve baharat olarak kullanılan bitkilerdir (Oflaz ve ark., 2002). *Origanum* genusuna ait bitkiler, spazm giderici, antimikrobiyal, gaz giderici, öksürük kesici etkileri nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bitkiden tıbbi tedavi amacıyla yararlanıldığı gibi izole edilen uçucu yağlardan da parfümeri ve kozmetik sektöründe faydalanılmaktadır (Şahin ve ark., 2004). *O. laevigatum* Türkiye'de; Adana, Hatay, Maraş, Gaziantep ve Kıbrıs'ta yayılış gösterir. Bu tür Amerika'da bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Tabanca ve ark., 2001).



Şekil 1.7. *O. laevigatum*

#### 1.8.5. *Teucrium polium* L.

*T. polium* Lamiaceae familyasına ait 10-40 cm boyunda, yatık ya da dik, gri ve beyaz tüylü, çok yıllık bir bitki türüdür. Bu tür halk arasında “tüylü kısa mahmutotu” olarak bilinir. Çiçekleri beyazımtırak renktedir. Toprak üstü kısımlarında %0.04-0.06 oranında uçucu yağ tespit edilmiştir (Toroğlu ve ark., 2005). *T. polium* sıklıkla Akdeniz bölgesinde yetişir ve bu genusun yabani olarak büyüyen çiçekli türlerinden birisidir (Tepe ve ark., 2010). Antik çağlardan beri bitkisel tedavide kullanılan bir bitkidir. Uzun yıllar boyunca idrar söktürücü, terletici, kuvvet verici, ateş düşürücü özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca bitkinin hipoglisemik, insülin düzenleyici, zayıflatıcı etkisi, tansiyon düşürücü ve antioksidan aktivitelerinin varlığı bilinmektedir (Ljubuncic ve ark., 2006). Bu bitkiden hazırlanan çay çocuklarda iştah açıcı olarak kullanılmaktadır.





Şekil 1.8. *T. polium*

#### 1.8.6. *Salvia hypargeia* Fisch & Mey.

*Salvia*, Lamiaceae familyasına ait bir genus olup tüm dünyada yaklaşık 900 tür ile temsil edilir. Türkiye’de ise 94 takson ve 89 tür yetişmekte ve bunlar içerisinde 45 türün endemik olduğu bilinmektedir. *Salvia* türleri halk arasında “adaçayı” olarak bilinmektedir. Bu cinse ait türler, bitki çayı ya da yemeklerde baharat olarak kullanılabilen gibi bu türlerden kozmetik, parfümeri ve ilaç endüstrisinde de faydalanılmaktadır (Tepe ve ark., 2007). Birçok *Salvia* türünün ve o türlerden izole edilen bileşiklerin enzimatik ve non-enzimatik sistemlerde önemli bir antioksidan aktivite gösterdikleri anlaşılmıştır (Tepe, 2005). Ayrıca bu genusa ait bitkilerin fenolik bileşiklerinin bazılarının yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *S. hypargeia* türü ise Türkiye’de doğal olarak yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları bazal ve basit şekilde, çiçekleri zigomorf ya da simetrik yapılı mor, eflatun ve krem renkte 4-8 çiçek içermektedir (Kandemir, 2003).



Şekil 1.9. *S. hypargeia*

### 1.9. Amaç

Bu çalışmada, halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bazı aromatik bitki türlerinin; antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerini araştırmak amaçlanmıştır. *T. polium* ve *F. vulgare* türlerinin, daha önceki çalışmalarla pek çok aktivitesi aydınlatılmıştır. Ancak *S. hypargeia*, *S. iberica*, *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* türlerinin aktiviteleri hakkındaki çalışmalar sınırlı sayıdadır. Son yıllarda popülerite kazanan bir alan olan DNA koruyucu aktivitenin tespiti, bilinen aromatik ve tıbbi bitki türlerine yeni uygulanmakta olan yöntemlerden birisidir. Dolayısıyla burada ele alınan bitki türlerinin büyük bir kısmı, bu açıdan değerlendirildiğinde tamamen özgün veriler ortaya koymaktadır.

Bitkilerin antioksidan aktiviteleri;  $\beta$ -karoten-linoleik asit sistemi, fosfomolibdenyum metodu, DPPH serbest radikal giderim yöntemi, indirgenme gücü ve şelatlama kapasitesi olmak üzere 5 farklı metot ile ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Aktivite testlerinin yanı sıra özütlerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarı da belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite ise agar-kuyucuk metodu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testleri ile tespit edilmiştir. DNA koruyucu aktivite ise, kuvvetli UV ışık ve bitkisel özüt varlığında pBR322 plazmit DNA'sının korunumu prensibine dayalı olarak tespit edilmiştir.



## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Bitkilerin Toplanması ve Adlandırılması

Tez kapsamında değerlendirilen bitkilerin tür düzeyinde adlandırma işlemi, Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. H. Aşkın AKPULAT tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilerin isimleri ve lokaliteleri şöyledir:

1. *S. iberica*: Söğütlüöl yaylası, Düziçi-Osmaniye C6 22/07/2009, AA 4424.
2. *A. sivasicum*: B6 Sivas, Ulaş ziyaretepe, 1250 m, 19/07/2008, AA 4358.
3. *F. vulgare*: A6 Trabzon, Maçka-Hamsiköy arası, 400-500 m, 27/07/2008, AA 4382.
4. *O. laevigatum*: Söğütlüöl yaylası, Düziçi-Osmaniye C6 22/07/2009, AA 4425.
5. *T. polium*: B6 Sivas, Ulaş ziyaretepe, 1250 m, 19/07/2008, AA 4359.
6. *S. hypargeia*: B6 Sivas-Deliilyas arası, Boğazdere köyü civarı, 1200-1300 m, 19/07/2008, AA 4360.

### 2.2. Bitkilerin Kurutulması ve Özütleme İşlemi

Toplanan bitkilerin toprak üstü kısımları, doğrudan güneş ışığı almayan ve hava akımının bulunduğu bir ortamda kurutuldu. Literatür çalışmaları doğrultusunda tüm bitkilerin özütleme işlemleri aşağıdaki yönteme göre gerçekleştirildi.

Serin ve doğrudan güneş almayan bir ortamda kurutulan bitkilerin her birinden 25 g'lık örnekler alınarak blender yardımıyla öğütüldü. Ardından örnekler 30 °C' de 24 saat süresince su ile özütlendi. Elde edilen özüt - 80 °C' de dondurularak liyofilize edildi ve özütler + 4 °C' de saklandı.

Tezde kullanılan bitkilerin farklı kısımlarından su özütleri hazırlandı. Bütün bitki özütleri antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktivite testleri için kullanıldı. Elde edilen bitki özütü verimleri Tablo 2.1’de verilmektedir.

**Tablo 2.1.** Bitkilerin özüt verimleri

Bitki türü	Familyası	Özüt verimleri (%)
<i>S. iberica</i>	Lamiaceae	7.24 (w/w)
<i>A. sivasicum</i>	Liliaceae	3.16 (w/w)
<i>F. vulgare</i>	Apiaceae	5.40 (w/w)
<i>O. laevigatum</i>	Lamiaceae	5.82 (w/w)
<i>T. polium</i>	Lamiaceae	4.62 (w/w)
<i>S. hypargeia</i>	Lamiaceae	3.28 (w/w)

### 2.3. Antioksidan Aktivite

Hazırlanan tüm özütlerin antioksidan aktiviteleri literatürde tanımlanan yöntemler izlenerek yapıldı (Dapkevicius ve ark., 1998; Prieto ve ark., 1999; Hatano ve ark., 1988; Oyaizu, 1986; Dinis ve ark., 1994; Chandler ve Dodds, 1983; Slinkard ve ark., 1999; Arvouet-Grand ve ark., 1994).

#### 2.3.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi

Örneklerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Hatano ve ark., 1988). İçerisinde 1 ml özüt çözeltisi (0.2–0.8 mg/ml) bulunan test tüplerine 1 ml metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi (final derişimi 0.2 mM) ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 1 ml su konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansıdır. BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### 2.3.2. $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Renk Açılım Yöntemi

Özütlerin aktivitesi  $\beta$ -karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi (Dapkevicius ve ark., 1998).  $\beta$ -karoten çözeltisi, 0.5 mg  $\beta$ -karotenin 1 ml kloroformda çözülmesiyle hazırlandı. Bu çözeltiliye 25  $\mu$ l linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotary evoparatörde buharlaştırıldıktan sonra 100 ml oksijenlendirilmiş distile su ile karıştırıldı. Bu emülsiyondan 2.5 ml, 2.0 mg/ml derişimdeki özütlerin 0.5 ml'sine ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 0.5 ml su konuldu. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakıldı.  $\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edildi (120 dk).

$\beta$ -karoten renk açılım oranı (R), 1 nolu eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \ln (a/b)/t \quad (1)$$

Burada; ln: doğal logaritma,  $a$ = başlangıç absorbansı,  $b$ = 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbans değeri

Antioksidan Aktivite (AA) ise 2 nolu eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (2)$$

Testlerde BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### 2.3.3. Metal-Şelatlama Kapasitesi

Örneklerin  $\text{Fe}^{+2}$  iyonlarını şelatlama kapasiteleri Dinis ve ark. (1994) tarafından belirlenen yöntemle göre belirlendi. İçerisinde 2 ml özüt çözeltisi (1.0 mg/ml) bulunan test tüplerine 2 mM 0.05 ml  $\text{FeCl}_2$  çözeltisi ilave edildi. Tepkime

0.2 ml 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı. Karışım karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı ve daha sonra 562 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Ferrozin-Fe<sup>+2</sup> oluşum inhibisyonu (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Metal şelatlama kapasitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansıdır. Testlerde EDTA pozitif kontrol olarak kullanıldı.

#### 2.3.4. Fosfomolibdenyum Yöntemi

Bu yöntem örnekler varlığında Mo(VI)’nın Mo(V)’e indirgenmesi sonucunda asidik pH’larda oluşan yeşil renkli fosfat-Mo(V) kompleksinin spektroskopik olarak takip edilmesi temeline dayanmaktadır (Prieto ve ark., 1999). İçerisinde 0.1 ml özüt bulunan test tüplerine 3 ml reaktif çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ilave edildi. Test tüpleri 95 °C’de 90 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve köre karşı (kör, 3 ml reaktif çözelti ve 0.1 ml saf su içermektedir) 695 nm’de absorbans değerleri okutuldu. Özütlerin toplam antioksidan kapasiteleri standart askorbik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi.

#### 2.3.5. İndirgeme Gücü Kapasitesi

İndirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) tarafından belirlenen yönteme göre yapıldı. Özütlerin 2.5 ml’si (0.2–1.0 mg/ml) test tüplerine ilave edildi. Her bir tüpe 2.5 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 2.5 ml % 1’lik potasyum ferrisiyanür ilave edilerek karışım 50 °C de 20 dk inkübe edildi. Sonra tepkime karışımına 2.5 ml %10’luk trikloroasetik asit ilave edilerek çözülden 2.5 ml alındı. Örnek üzerine 2.5 ml distile su ve % 0.1’lik 0.5 ml FeCl<sub>3</sub> ilavesinden sonra

700 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Kontrol olarak örnek yerine su kullanıldı. Testlerde BHA ve BHT pozitif kontrol olarak kullanıldı.

### **2.3.6. Fenolik Bileşik Miktarı**

Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) kullanılarak gallik aside eşdeğer olarak belirlendi (Chandler ve Dodds, 1983; Slinkard ve Singleton, 1999). İçerisinde 1 ml özüt çözeltisi (2 mg/ml) bulunan test tüplerine 45 ml distile su, 1 ml FCR ve 3 dk sonra % 2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinden 3 ml ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ara sıra çalkalandı. Örneklerin absorbansları 760 nm'de okutuldu. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi.

### **2.3.7. Flavonoid Bileşik Miktarı**

Özütlerin toplam flavonoid bileşik miktarları Arvouet-Grand ve ark. (1994) tarafından belirlenen yöntem kullanılarak quercetin'e eşdeğer olarak belirlendi. İçerisinde 1 ml özüt çözeltisi (2 mg/ml) bulunan test tüplerine % 2'lik 1 ml metanolde hazırlanmış  $\text{AlCl}_3$  çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Kör örnek 1 ml özüt çözeltisi (2 mg/ml) ve 1 ml metanol içermektedir. Örneklerin absorbansları 415 nm'de okutuldu. Özütlerin toplam flavonoid bileşik miktarları standart quercetin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi.

## **2.4. Antimikrobiyal Aktivite**

Agar-Kuyucuk ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonu yöntemlerinden yararlanılarak özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri saptandı.

#### 2.4.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Antimikrobiyal aktivite testlerinde gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Corynebacterium diphtheriae* RSHM-633 ve gram negatif bakterilerden *Salmonella typhi* NCTC-9394, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Shigella boydii* NCTC-9359, *Shigella dysenteriae* NCTC-9762, *Klebsiella pneumonia* NCTC-5046, *Escherichia coli* ATCC-35218, *Proteus vulgaris* RSHM-96022 ve bir maya olan *Candida albicans* ATCC-10231 kullanıldı.

#### 2.4.2. Agar Kuyucuk Metodu

Mikroorganizma kültürleri için besiyeri olarak, Mueller-Hinton Agar (MHA) kullanıldı. Steril olarak hazırlanan besiyerleri yaklaşık 6 mm kalınlığında olacak şekilde petri kaplarına döküldü.

Katılaştıran agar üzerine birbirine eşit uzaklıkta ve 6 mm çapında delikler açıldı. Bu delikler açılırken cam bir boru kullanılmış olup çalışma sırasında bu cam boru her defasında alkol ile yakılarak steril edildi.

Süspansiyonlar, katı besiyerlerinde üretilen bakteri ve maya suşlarından 0.5 McFarland eşeline uygun (bakteriler için  $10^8$  cfu/ $\mu$ l, mayalar için  $10^6$  cfu/ $\mu$ l) hazırlandı. Süspansiyonların her birine ayrı ayrı eküvyon çubuklar daldırılarak karıştırıldı. Hazırlanan süspansiyonlar eküvyon çubuk ile besiyerleri yüzeyine yayıldı.

Agar üzerindeki deliklere 0.45  $\mu$ m membran filtresi kullanılarak 10 mg/ml derişimde, steril edilmiş özütlerden 60  $\mu$ l yükleme yapıldı. Bütün petriler 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda özüt yüklenen deliklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları petri plaklarının alt yüzeyinden cetvel yardımıyla ölçüldü. Standart antibiyotik diskleri olarak Gentamisin ve Nystatin kullanıldı (Alim ve ark., 2009).

### 2.4.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Metodu

Agar kuyucuk metodundaki hassasiyetin ölçülmesi için MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) metodu uygulandı. Minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi için NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standarts) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı (NCCLS, 1997).

Bakteri ve maya üretiminde Mueller-Hinton Broth (MHB) sıvı besiyeri kullanıldı. Bakteri suşları 37 °C’de MHA’da bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından son derişimleri  $5 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde MHB’de sulandırıldı. Mikrodilüsyon testleri, 96 adet “U” tipi kuyucuklara sahip, steril, dibi düz olan mikrotitrasyon plaklarda yapıldı. Tüm bitkiler için bir önceki agar-kuyucuk metodunda maya ve bakterilerden elde edilen sonuçlar ışığında her seferinde iki kat oranında seyreltme yapacak şekilde bitki özütlerinin 72.00 mg/ml’den 4.50 mg/ml’ye kadar seri dilüsyonları hazırlandı. Seri halde seyreltmeleri tamamlandıktan sonra test mikroorganizmaları ilave edildi. MHB ve bitki özütü içeren kuyucuk, negatif kontrol kuyucuğu olarak belirlendi. İçerisinde bitki özütü, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96 kuyucuklu mikropaklar, bakteriler için 37 °C’de 24 saat, maya için 30 °C’de 48 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresinden sonra, üremenin gerçekleştiği konsantrasyondan yüksek olan bir önceki konsantrasyon MİK değeri olarak alındı.

### 2.5. DNA Koruyucu Aktivite

Kullanılan bitki özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi pBR322 plazmit DNA’sı (vivantis) kullanılarak değerlendirildi. Plazmit DNA’sı, bitki özütleri varlığında  $H_2O_2$  + UV ile muameleye tabi tutuldu ve % 1.5’luk agaroz jelde yürütüldü. 3 µl pBR322 plazmit DNA’sı (172 ng/µl), 1 µl % 30’luk  $H_2O_2$  ve sırasıyla 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml’lik konsantrasyonlarda 5 µl bitki özütü eklenerek toplam hacim 10 µl olacak şekilde ayarlandı (Tepe ve ark., 2010). Ayrıca F.

*vulgare* ve *S. hypergeia* özütleri için 10, 20, 40, 50, 70 mg/ml'lik konsantrasyonlarda aynı işlemler tekrarlandı.

Reaksiyonlar oda sıcaklığında 302 nm' de 8000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  ışık yoğunluğunda 5 dk UV transilluminator (DNR-IS) yüzeyinde bekletilerek meydana getirildi. UV muamelesi sonunda, reaksiyon karışımı (10  $\mu\text{l}$ ) jel yükleme boyası (6x) ile % 1.5'luk agaroz jele yüklendi. Kontrol olarak agaroz jele plazmit DNA'sı, plazmit DNA'sı + UV, plazmit DNA'sı + UV+  $\text{H}_2\text{O}_2$ , plazmit DNA'sı +  $\text{H}_2\text{O}_2$  yüklendi. Jel etidyum bromid ile boyandı. Elektroforez sonunda jellerin, jel görüntüleme sistemi (DNR-IS, MiniBIS Pro) ile fotoğrafları çekildi.



### 3. BULGULAR

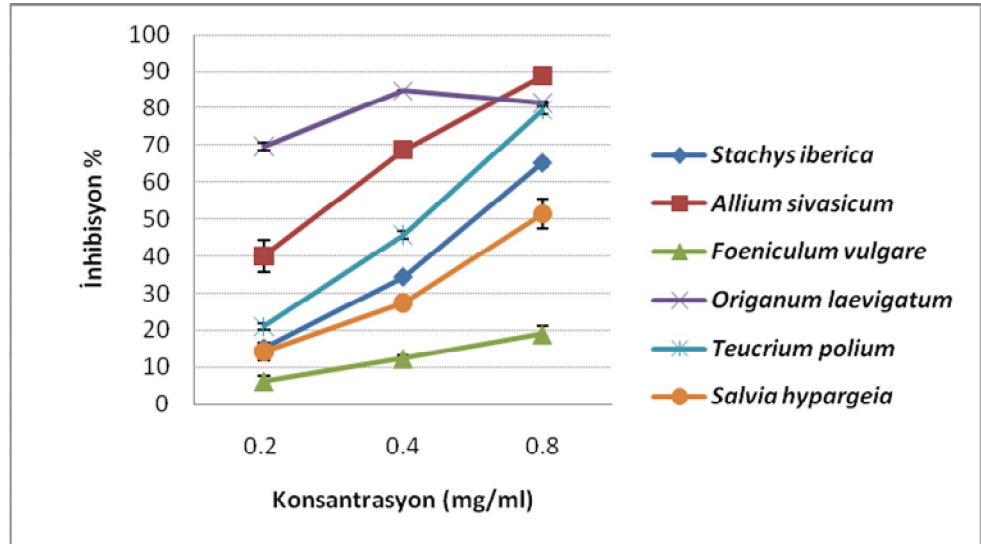
Materyal ve metod kısmında verilen özütleme yöntemi ile *S. iberica*, *A. sivasicum*, *F. vulgare*, *O. laevigatum*, *T. polium*, *S. hypargeia* bitkilerinden su özütleri elde edildi. Bu özütlerin antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri belirlendi.

#### 3.1. Antioksidan Aktivite

##### 3.1.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi

DPPH radikali doğal antioksidanların serbest radikal yakalama aktivitesini değerlendirmek için kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm bitki özütlerinin serbest radikal giderici etkileri DPPH radikali üzerinden tayin edildi. BHA ve BHT standartları pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Üç farklı derişimdeki özütlerin serbest radikal giderim aktiviteleri Şekil 3.1'de verilmektedir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.



Şekil 3.1. Bitki özütlerinin serbest radikal giderim kapasitesi (DPPH)

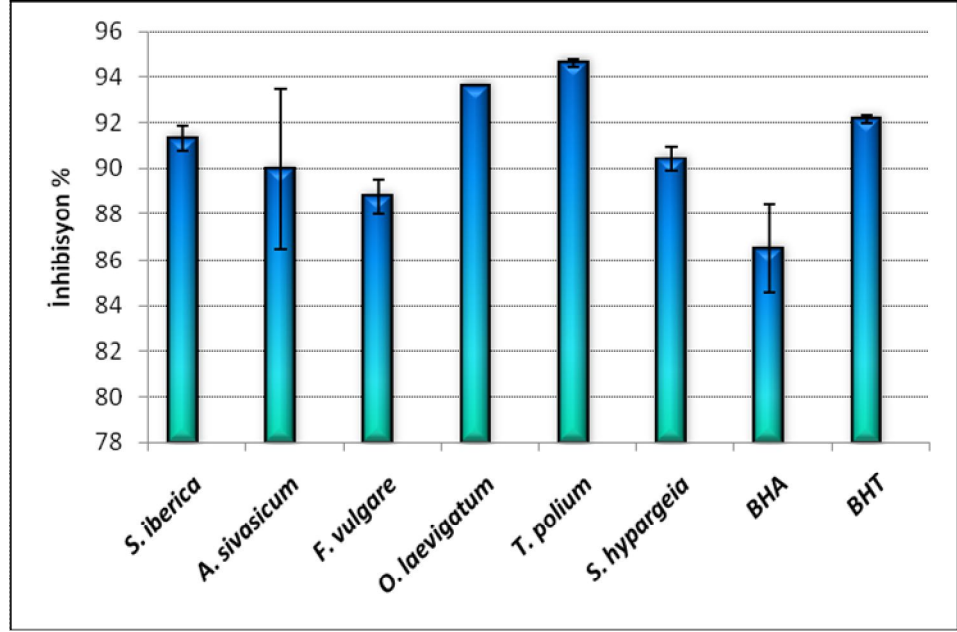
Çalışmada kullanılan bitkilerden hazırlanan su özütlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi üç farklı konsantrasyonda (0.2, 0.4 ve 0.8 mg/ml) tayin

edildi. DPPH testinde *O. laevigatum* ve *A. sivasicum* özütlerinin oldukça güçlü radikal süpürücü aktiviteye sahip oldukları saptandı. Bu bitkilerin 0.8 mg/ml konsantrasyonda serbest radikal giderim yüzdeleri sırasıyla %  $81.37 \pm 0.40$  ve %  $88.76 \pm 0.77$  olarak tespit edildi. Hiçbir bitki özütünün, sentetik antioksidanlar BHA ve BHT kadar güçlü bir aktivite sergileyemediği gözlemlendi. BHA'nın 0.2 mg/ml konsantrasyonda serbest radikal giderim kapasitesi %  $92.83 \pm 0.84$  olarak saptanırken, BHT'nin ise aynı konsantrasyonda serbest radikal giderim kapasitesi %  $81.41 \pm 0.00$  olarak tespit edildi.

### 3.1.2. $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Renk Açılım Yöntemi

Kullanılan bitkilerin su özütlerinin ve standartların 2.0 mg/ml'lik derişimlerinin,  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri Şekil 3.2'de verilmektedir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

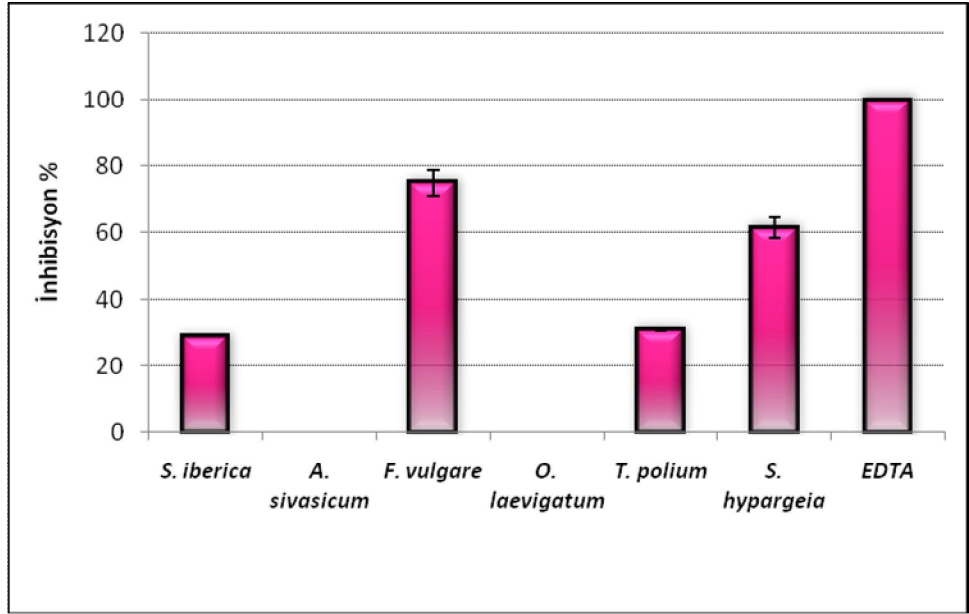
$\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım yönteminde pozitif kontroller olarak BHA ve BHT kullanıldı. Bu yöntemde tüm bitki özütlerinin oldukça yüksek aktivite gösterdiği gözlemlendi. Bu test sisteminde *T. polium* (%  $94.59 \pm 0.16$ ) ve *O. laevigatum* (%  $93.62 \pm 0.00$ ) özütlerinin en yüksek aktiviteleri gösterdiği belirlendi. Ayrıca bu bitki özütlerinin sentetik antioksidanlar BHA (%  $86.48 \pm 1.93$ ) ve BHT'ye (%  $92.14 \pm 0.15$ ) oranla çok daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları görüldü.



**Şekil 3.2.** Bitki özütlerinin ve standartların  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteleri

### 3.1.3. Metal-Şelatlama Kapasitesi

Metal-şelatlama kapasitesi, bitki özütlerinin çözeltildeki  $Fe^{+2}$  iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmaya girmesi esasına dayalı olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak, iyi bir şelatlayıcı olan EDTA seçildi. Çalışmada kullanılan özütlerin metal-şelatlama kapasitesi gösteren konsantrasyonları Şekil 3.3'de verilmektedir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

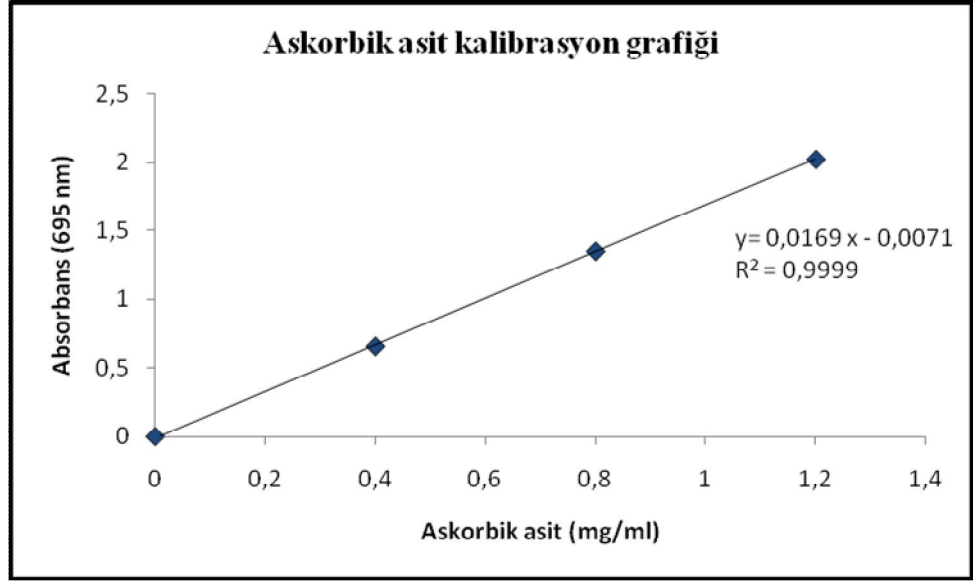


**Şekil 3.3.** Bitki özütlerinin metal-şelatlama kapasiteleri

Şekil 3.3’de de görüldüğü gibi, çalışmada kullanılan bitki özütleri içerisinde en yüksek aktivitenin *F. vulgare* özütü tarafından sergilendiği belirlendi (% 74.78 ± 3.78). Ancak *F. vulgare* dahil hiçbir özütün  $Fe^{+2}$  iyonlarını şelatlama kapasitesinin EDTA kadar yüksek olmadığı tespit edildi (% 99.74 ± 0.15). *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* özütlerinde ise metal-şelatlama aktivitesi gözlenmedi.

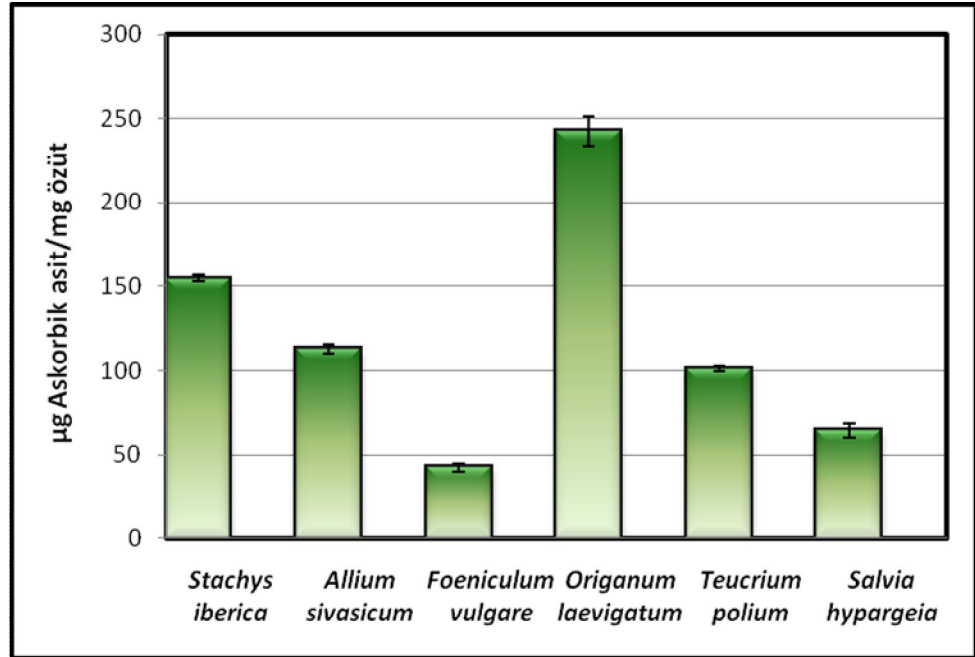
### 3.1.4. Fosfomolibdenyum Yöntemi

Fosfomolibdenyum yöntemi,  $Mo(VI)$ ’nın  $Mo(V)$ ’e indirgenmesi sonucunda asidik pH’larda oluşan yeşil renkli fosfat- $Mo(V)$  kompleksinin spektrofotometrik olarak takip edilmesine dayanmaktadır. Örneklerin absorbanları 695 nm’de ölçülerek Şekil 3.4’de verilen askorbik asit kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.



**Şekil 3.4.** Askorbik asit kalibrasyon eğrisi

Standart askorbik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak bitki özütlerinin toplam antioksidan aktivitesi Şekil 3.5’de verilmiştir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

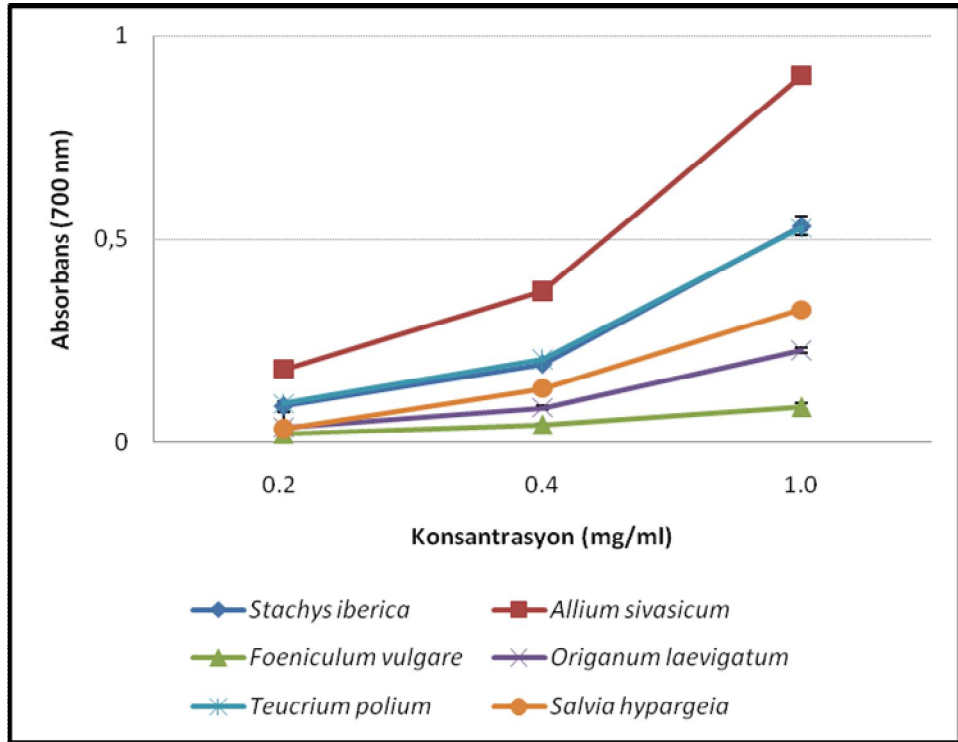


**Şekil 3.5.** Bitki özütlerinin fosfomolibdenyum metoduna göre belirlenen antioksidan kapasitesi

Fosfomolibdenyum metoduna göre çalışılan bitki özütlerinin antioksidan aktivite sıralaması *O. laevigatum* > *S. iberica* > *A. sivasicum* > *T. polium* > *S. hypargeia* > *F. vulgare* şeklinde gerçekleşmiştir. Bitkiler arasında en yüksek antioksidan aktivitenin gösteren *O. laevigatum* tarafından sergilendiği tespit edildi ( $242.64 \pm 8.99$  µg askorbik asit/mg züt). Diğer yandan *F. vulgare* zütünün, incelenen bitki özütleri arasında en düşük aktiviteye sahip bitki olduğu saptandı ( $42.34 \pm 2.51$  µg askorbik asit/mg züt).

### 3.1.5. İndirgeme Gücü Kapasitesi

Bitki özütlerinin ve standartların farklı derişimlerinin ortamdaki  $Fe^{+3}$  iyonlarını  $Fe^{+2}$ ’ye indirgeyerek serbest radikal oluşumunu engelleme kapasiteleri Şekil 3.6’da verilmiştir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.

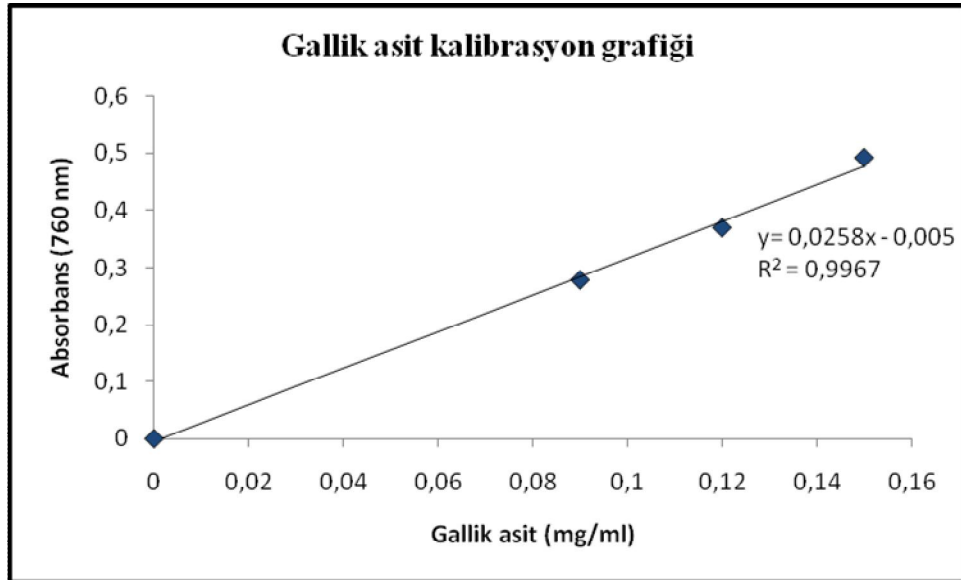


Şekil 3.6. Bitki özütlerinin indirgeme gücü kapasiteleri

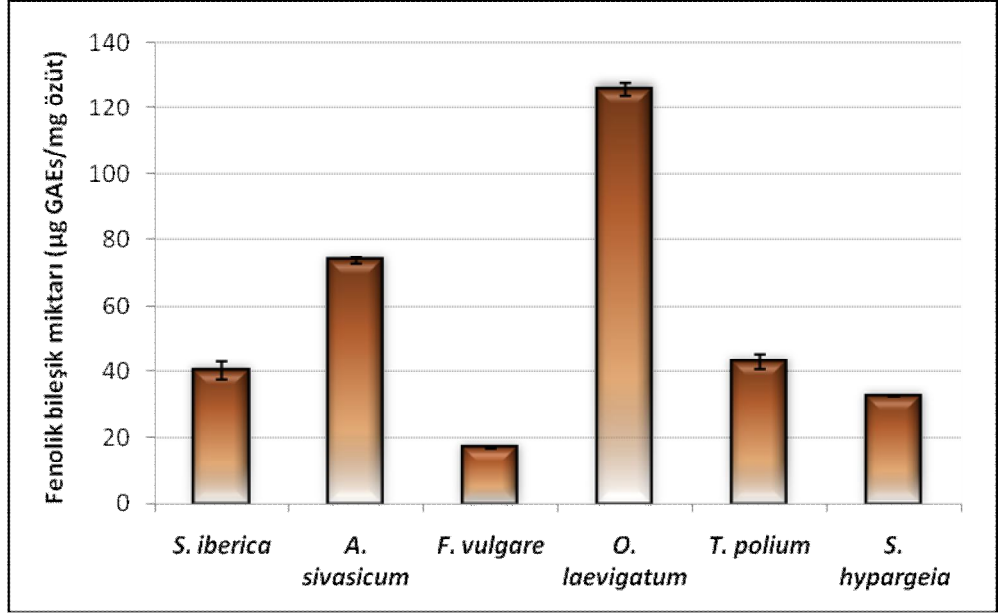
Çalışmada kullanılan su özütlerinin indirgeme gücü kapasitesi üç farklı konsantrasyonda (0.2, 0.4 ve 1.0 mg/ml) tayin edildi. İndirgeme gücü kapasitesi testinde *A. sivasicum* özütünün diğer bitkiler içerisinde en güçlü aktiviteye sahip bitki olduğu saptandı. Ancak hiçbir bitki özütünün, pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidanlar BHA ve BHT kadar güçlü aktivite sergileyemediği gözlemlendi. BHA'nın 0.2 mg/ml konsantrasyonda indirgeme gücü kapasitesi  $2.303 \pm 0.064$  olarak saptanırken, BHT'nin ise aynı konsantrasyonda indirgeme gücü değeri  $1.258 \pm 0.121$  olarak tespit edildi.

### 3.1.6. Fenolik Bileşik Miktarı

Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları tayininde Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi Şekil 3.7'de ve özütlerin gallik asit eşdeğeri fenolik bileşik miktarları Şekil 3.8'de verilmiştir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.



Şekil 3.7. Gallik asit kalibrasyon eğrisi



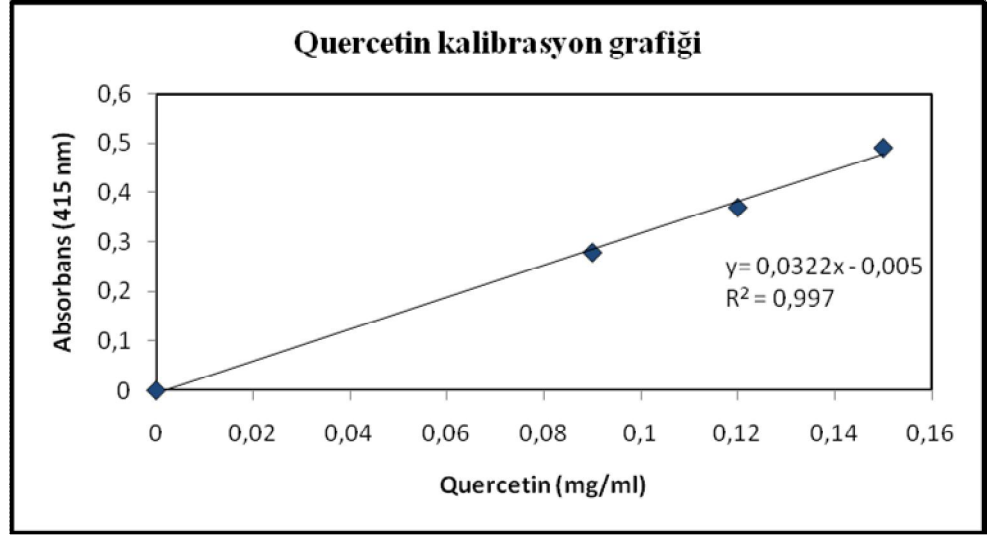
**Şekil 3.8.** Bitki özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları

Bitki özütlerinin antioksidan özelliklerinden, genellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Şekil 3.8’de görüldüğü gibi, incelenen bitki özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları *O. laevigatum* > *A. sivasicum* > *T. polium* > *S. iberica* > *S. hypargeia* > *F. vulgare* şeklinde sıralanmıştır. Bitkiler arasında fenolik bileşik miktarı en yüksek olan bitki *O. laevigatum* olarak belirlenirken ( $125.96 \pm 1.98$  µg gallik asit / mg özüt), *F. vulgare* özütünün ise en düşük düzeyde ( $17.01 \pm 0.14$  µg gallik asit / mg özüt) fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu saptandı.

### 3.2.7. Flavonoid Bileşik Miktarı

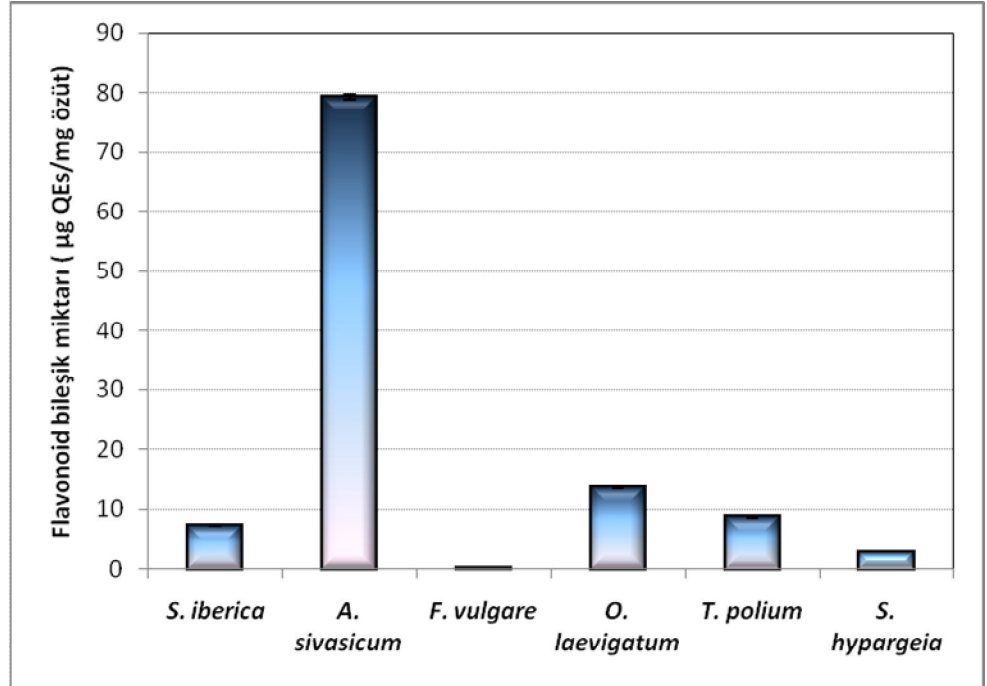
Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam flavonoid bileşik miktarları, quercetin eşdeğeri olarak tespit edildi. Örneklerin absorbanları 415 nm’de ölçülerek Şekil 3.9’da verilen quercetin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.





**Şekil 3.9.** Quercetin kalibrasyon grafiği

Oluşan kalibrasyon eğrisi üzerinden özütlerin toplam flavonoid miktarları Şekil 3.10'de verilmiştir. Tüm aktivite sonuçları 3 tekrardan elde edilen ortalamalardır.



**Şekil 3.10.** Bitki özütlerinin toplam flavonoid bileşik miktarları

Şekil 3.10'da görüldüğü gibi, incelenen bitki özütlerinin toplam flavonoid madde içeriklerinin  $0.18 \pm 0.00$  ile  $79.25 \pm 0.46$   $\mu\text{g}$  quercetin / mg özüt arasında değişiklik gösterdiği bulundu. *A. sivasicum*'un toplam flavonoid bileşik miktarı açısından en zengin özüt olduğu tespit edildi. Diğer bitkilerin toplam flavonoid bileşik miktarlarının *A. sivasicum* özütüne oranla oldukça düşük olduğu gözlemlendi.

### 3.2. Antimikrobiyal Aktivite

#### 3.2.1. Agar-Kuyucuk Metodu

Bitki özütlerinin *B. subtilis* ATCC-6633, *S. aureus* ATCC-25923, *C. diphteriae* RSHM-633, *S. typhi* NCTC-9394, *P. aeruginosa* ATCC-27853, *S. boydii* NCTC-9359, *S. dysenteriae* NCTC-9762, *K. pneumonia* NCTC-5046, *E. coli* ATCC-35218, *P. vulgaris* RSHM-96022 ve *C. Albicans*'a ATCC-10231 karşı oluşturdukları inhibisyon zonları ölçüldü.

Bakteri suşları için pozitif kontrol olarak Gentamisin, *Candida* için ise Nystatin kullanıldı. Agar üzerinde 6 mm çapında delikler açıldı. Zon çapı ölçümü delik çapı dahil olmak üzere yapıldı. Tablo 3.1'de bitki özütlerinin, Gentamisin ve Nystatin antibiyotiklerinin besi ortamında oluşturdukları inhibisyon zon çapları verilmiştir.

Bu test sisteminde sadece *O. laevigatum* ve *S. iberica* özütlerinin etkili olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Gentamisin'in, *S. boydii* ve *S. dysenteriae* türlerine karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları sırasıyla 12.6 ve 13.5 cm olarak ölçüldü. *O. laevigatum*, hem *S. boydii* hem de *S. dysenteriae* türlerine karşı 12.0 cm inhibisyon zon çapı meydana getirerek ılımlı ölçüde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *S. iberica* ise *S. dysenteriae*'ye karşı oldukça zayıf aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu yöntemde, çalışmada kullanılan bitki özütlerinden hiçbiri *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. diphteriae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *P. vulgaris* ve *C. albicans*'e karşı antimikrobiyal aktivite sergilememiştir.

**Tablo 3.1.** Agar-kuyucuk metodu ile elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları<sup>a</sup>

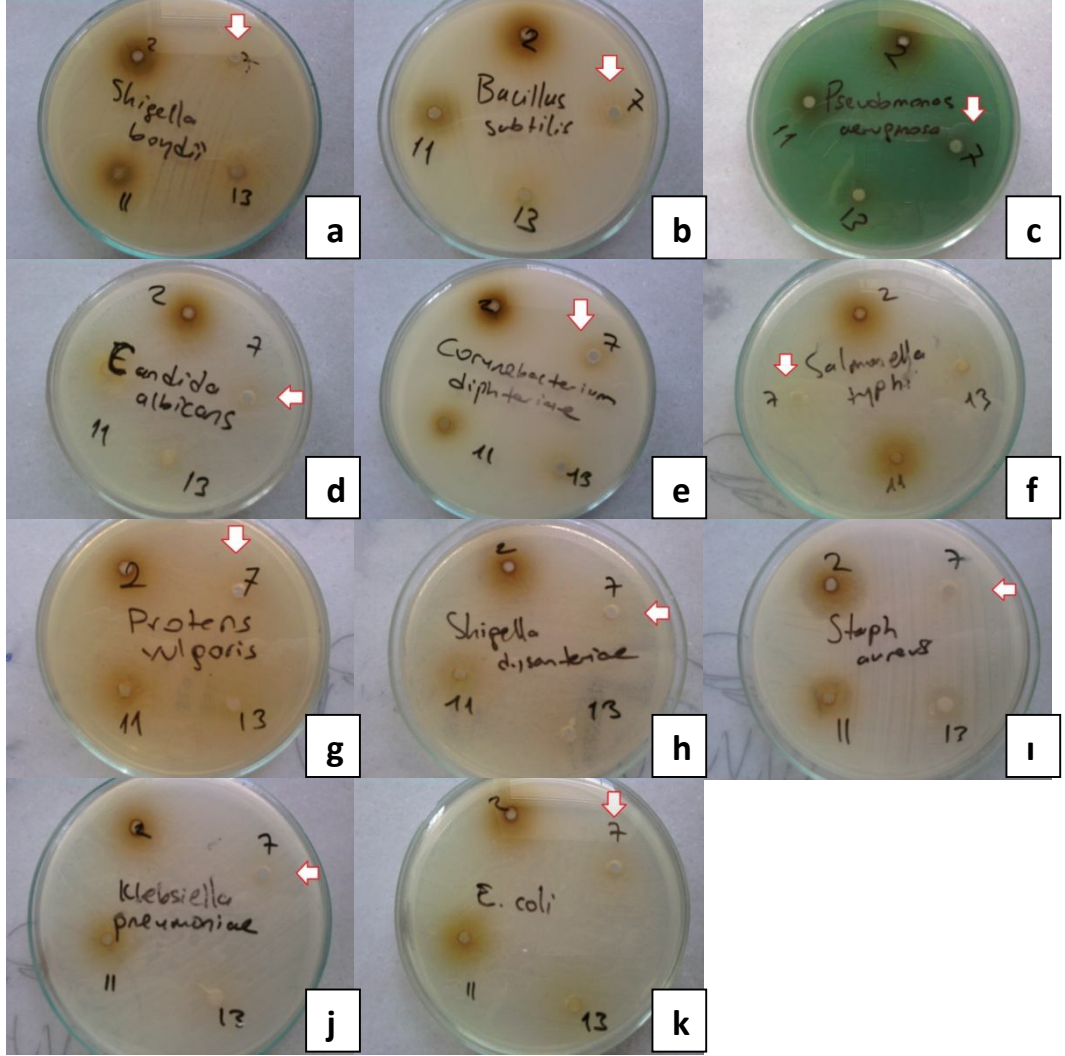
Mikroorganizmalar	Bitki Türleri						Gen <sup>b</sup>	Nys <sup>c</sup>
	<i>S. iberica</i>	<i>A. sivasicum</i>	<i>F. vulgare</i>	<i>O. laevigatum</i>	<i>T. polium</i>	<i>S. hypargeia</i>		
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	29.0	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	7.0	-	23.0	-
<i>C. diphtheriae</i>	-	-	-	-	-	-	23.0	-
<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	10.0	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	20.0	-
<i>S. boydii</i>	-	-	-	12.0	-	-	12.6	-
<i>S. dysenteriae</i>	7.0	-	-	12.0	-	-	13.5	-
<i>K. pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	20.0	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	16	-
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	22.0	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	25.0

<sup>a</sup> İnhibisyon zon çapı (mm) (6 mm kuyucuk çapı dahil)

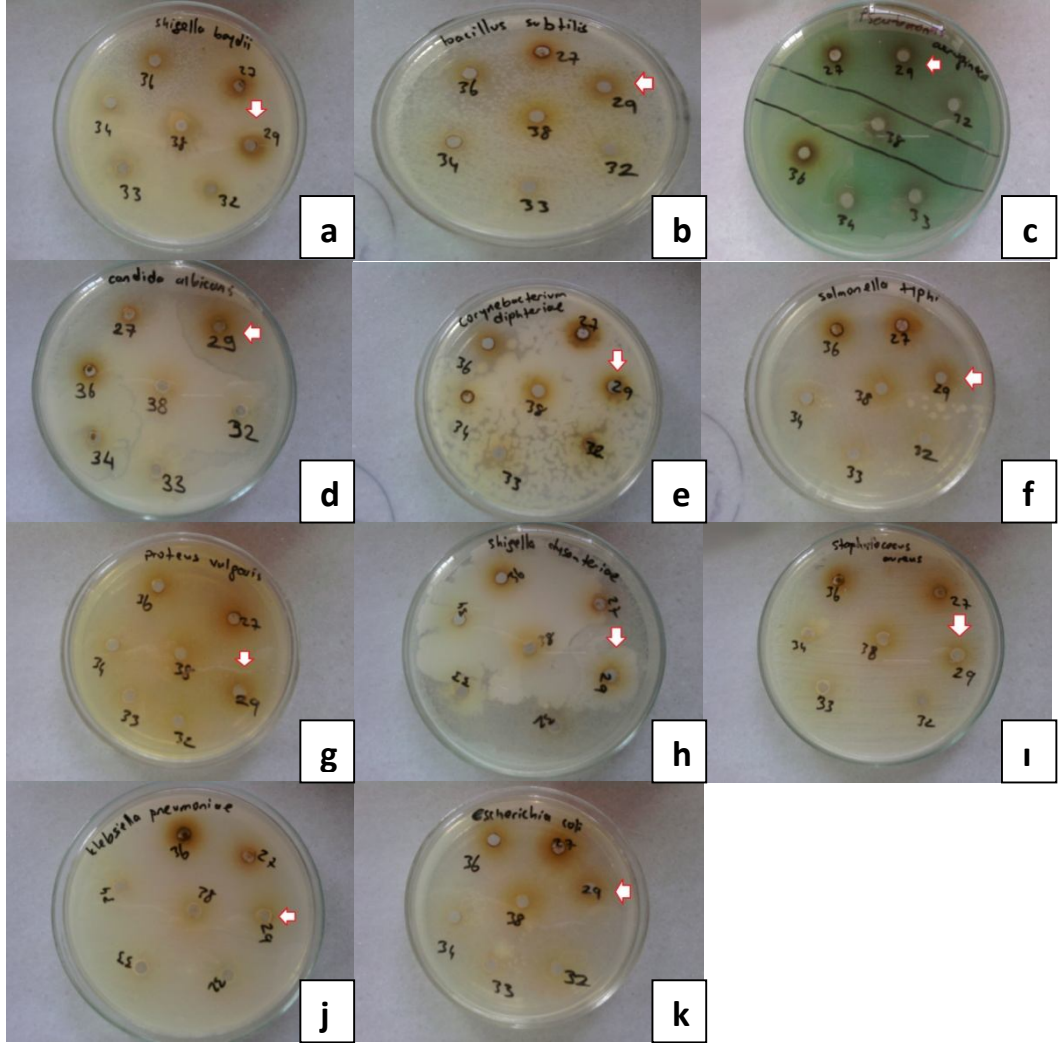
<sup>b</sup> 10 µg etken madde içeren Gentamisin 6 mm' lik standart kuru diski

<sup>c</sup> 25 µg etken madde içeren Nystatin 6 mm' lik standart kuru diski

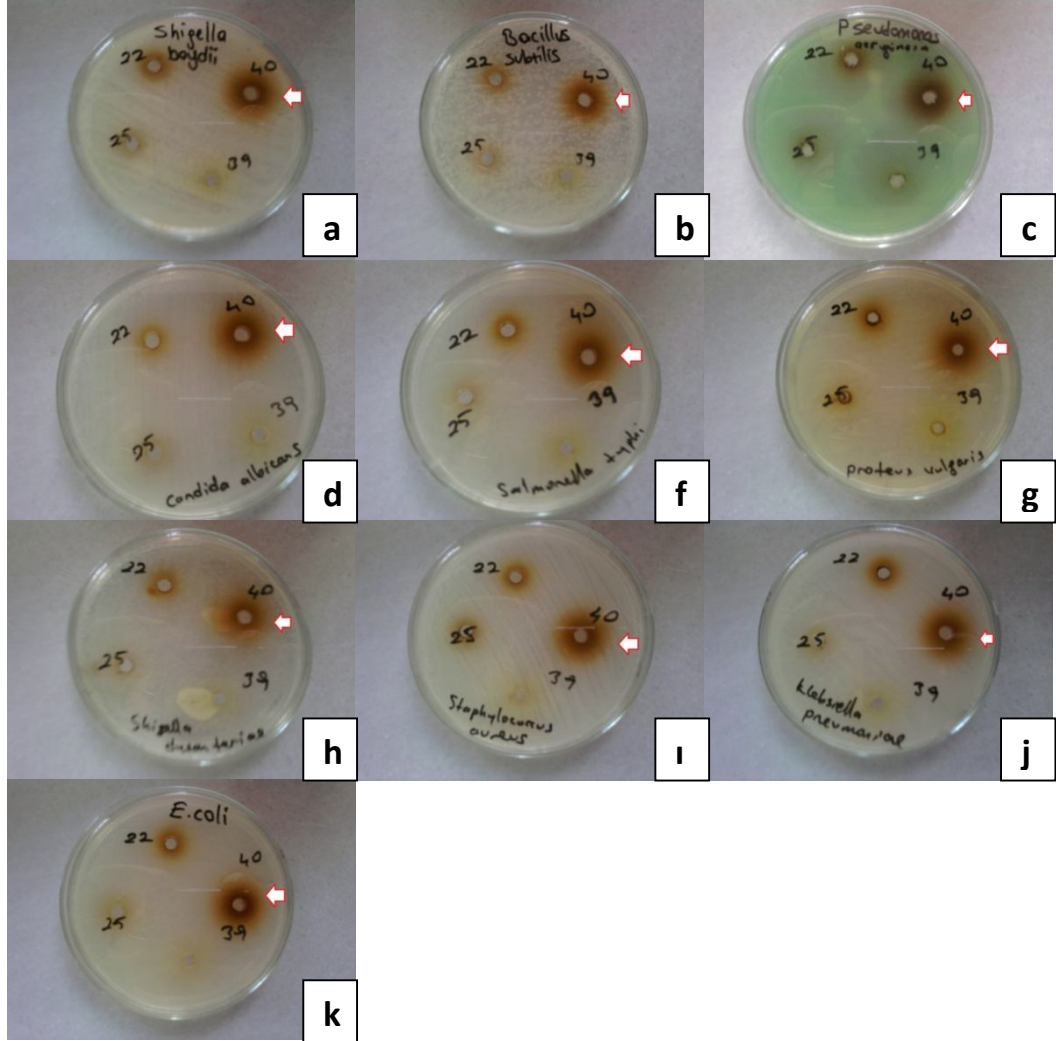
Bitki özütlerinin bu yöntemde test mikroorganizmaları karşı oluşturdukları inhibisyon zonları Şekil 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 ve 3.15’de verilmiştir.



**Şekil 3.11.** Ok ve 7 numara ile gösterilen *F. vulgare*' nin; a) *S. boydii*, b) *B. subtilis*, c) *P.aeruginosa*, d) *C. albicans*, e) *C. diphtheriae*, f) *S. typhi*, g) *P. vulgaris*, h) *S. dysenteriae*, i) *S. aureus*, j) *K. pneumoniae* k) *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları

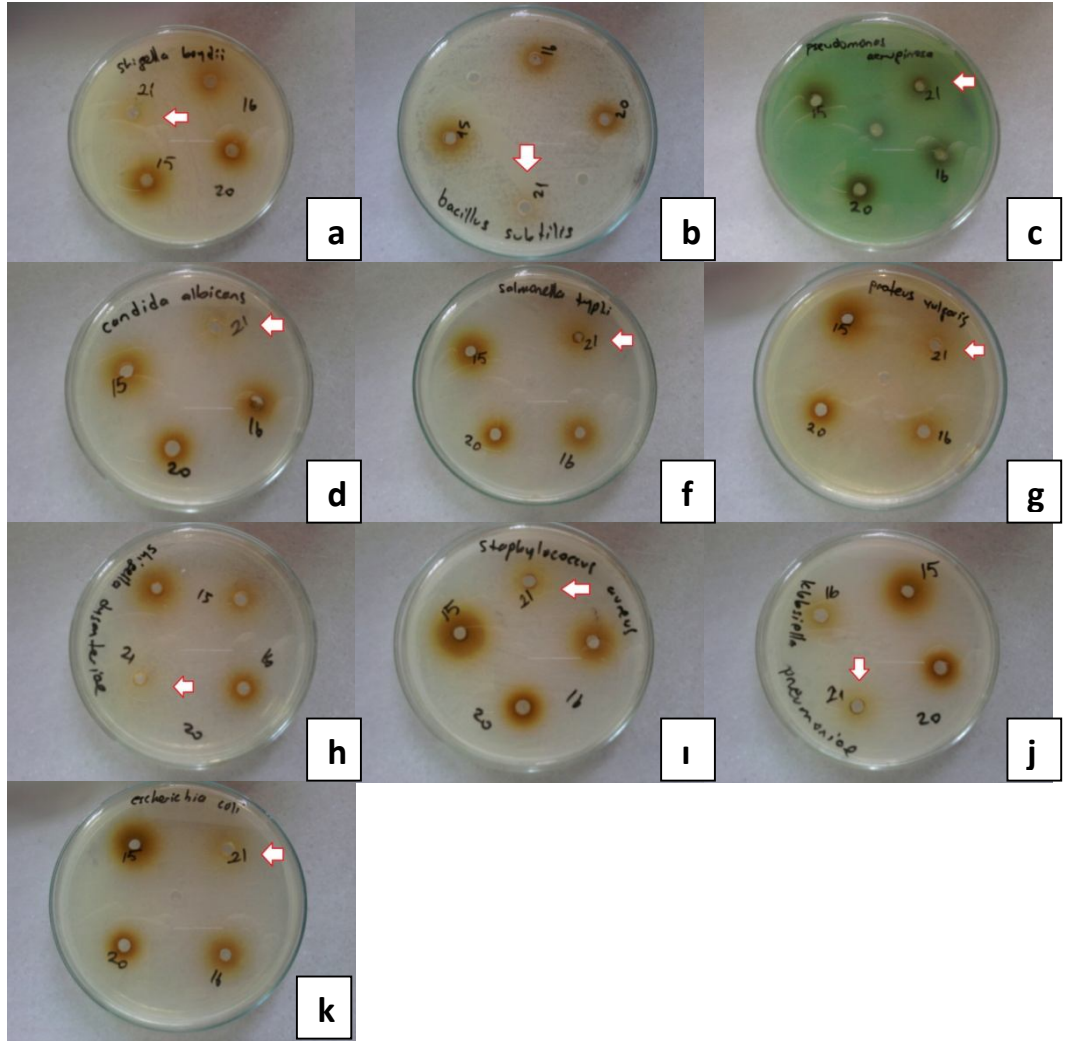


**Şekil 3.12.** Ok ve 29 numara ile gösterilen *T. polium*'un; a) *S. boydii*, b) *B. subtilis*, c) *P.aeruginosa*, d) *C. albicans*, e) *C. diphtheriae*, f) *S. typhi*, g) *P. vulgaris*, h) *S. dysenteriae*, ı) *S. aureus*, j) *K. pneumoniae* k) *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları

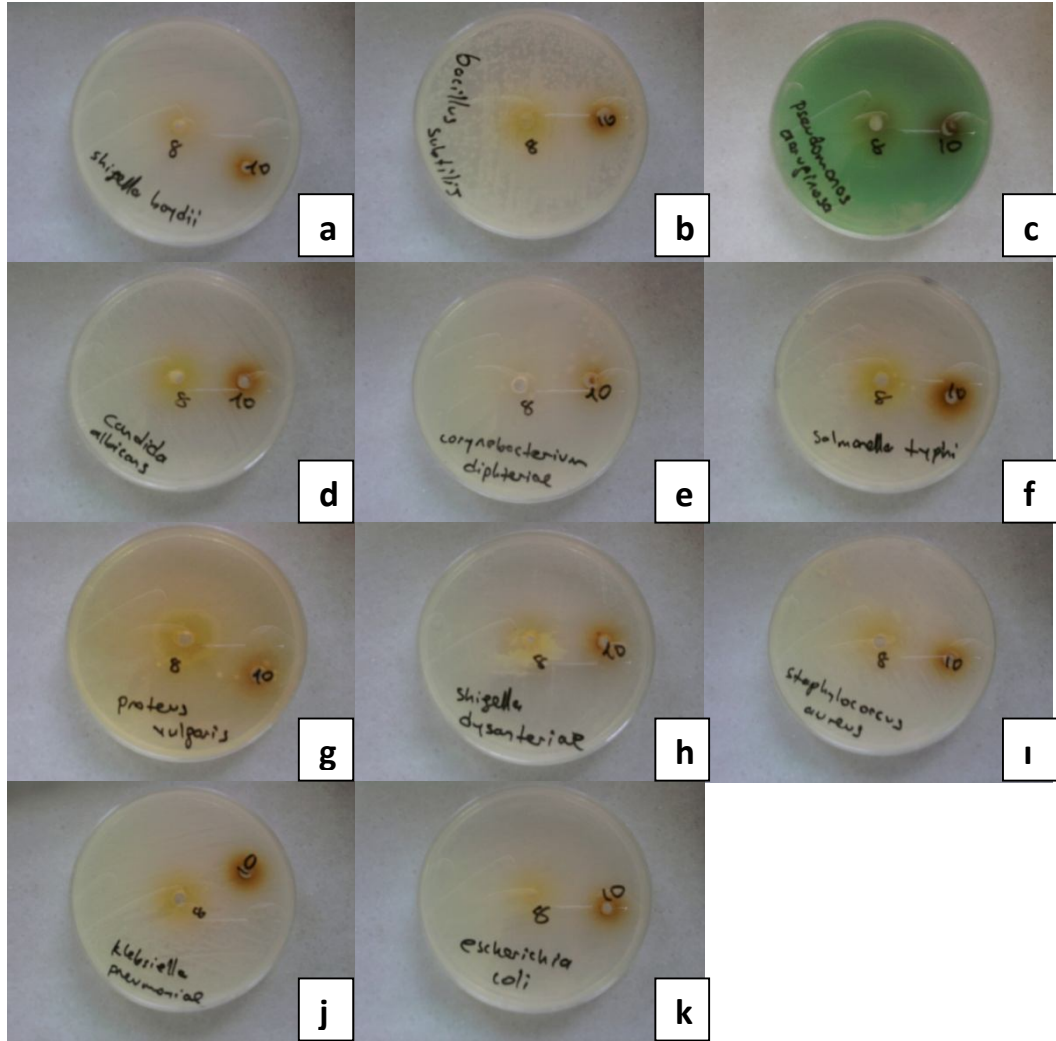


**Şekil 3.13.** Ok ve 40 numara ile gösterilen *O. laevigatum*' un; a) *S. boydii*, b) *B. subtilis*, c) *P. aeruginosa*, d) *C. albicans*, f) *S. typhi*, g) *P. vulgaris*, h) *S. dysenteriae*, i) *S. aureus*, j) *K. pneumoniae* k) *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları





**Şekil 3.14.** Ok ve 21 numara ile gösterilen *S. iberica*'nın; a) *S. boydii*, b) *B. subtilis*, c) *P. aeruginosa*, d) *C. albicans*, f) *S. typhi*, g) *P. vulgaris*, h) *S. dysenteriae*, i) *S. aureus*, j) *K. pneumoniae* k) *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları



**Şekil 3.15.** 8 numara ile gösterilen *A. sivasicum*' un ve 10 numara ile gösterilen *S. hypargeia*' nın a) *S. boydii*, b) *B. subtilis*, c) *P.aeruginosa*, d) *C. albicans*, e) *C. diphtheriae*, f) *S. typhi*, g) *P. vulgaris*, h) *S. dysenteriae*, ı) *S. aureus*, j) *K. pneumoniae*, k) *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zonları



### 3.2.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu Metodu

Bitki özütlerinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. diphteriae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *P. vulgaris* ve *C. albicans*'a karşı MİK değerleri tespit edildi. Bakteri suşları için pozitif kontrol olarak Gentamisin, *C. albicans* için ise Nystatin kullanıldı.

Minimum inhibitör konsantrasyonu metodunda, özütün stok çözeltisinden dilüsyonlar yapılarak düzenli şekilde azalan konsantrasyonlar elde etmek, bu sayede üremeyi inhibe eden en düşük derişimi (MİK) belirlemek mümkün olmaktadır (İşcan ve ark., 2002).

Çalışmamız sonucunda bitki özütlerinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Gentamisin ve Nystatin'in test mikroorganizmalarına karşı elde edilen MİK değerleri Tablo 3.2'de verilmektedir.

**Tablo 3.2.** MİK yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları<sup>a</sup>

Mikroorganizmalar	Bitki Türleri							Nys <sup>c</sup>
	<i>S. iberica</i>	<i>A. sivasicum</i>	<i>F. vulgare</i>	<i>O. laevigatum</i>	<i>T. polium</i>	<i>S. hypargeia</i>	Gen <sup>b</sup>	
<i>B. subtilis</i>	>72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	72.0	12.50	-
<i>S. aureus</i>	72.0	72.0	72.0	>72.0	72.0	72.0	3.12	-
<i>C. diphtheriae</i>	72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	12.50	-
<i>S. typhi</i>	72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	16.66	-
<i>P. aeruginosa</i>	>72.0	72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	125.00	-
<i>S. boydii</i>	>72.0	72.0	72.0	72.0	>72.0	72.0	15.74	-
<i>S. dysenteriae</i>	72.0	>72.0	72.0	72.0	72.0	72.0	14.21	-
<i>K. pneumonia</i>	>72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	72.0	2.94	-
<i>E. coli</i>	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	72.0	25.00	-
<i>P. vulgaris</i>	72.0	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	10.25	-
<i>C. albicans</i>	72.0	>72.0	>72.0	>72.0	>72.0	72.0	-	3.12

<sup>a</sup>Konsantrasyon aralığı: 4.50 - 72.00 mg/ml<sup>b</sup>Gentamisin (µg/ml)<sup>c</sup>Nystatin (µg/ml)

*S. iberica* özütünün *S. aureus*, *C. diphtheriae*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *P. vulgaris*, *C. albicans*'a karşı 72.00 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu saptanmıştır.

*A. sivasicum* özütünün *S. dysenteriae*, *E. coli* ve *C. albicans* dışında kullanılan tüm test mikroorganizmalarına karşı 72.00 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir.

*F. vulgare* özütünün tüm test mikroorganizmaları içerisinde sadece *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*'ye karşı 72.00 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu gözlenmiştir.

*O. laevigatum* özütünün agar-kuyucuk metodu sonuçlarını destekleyecek şekilde, kullanılan test mikroorganizmaları içerisinde sadece *S. typhi*, *S. dysenteriae*'ye karşı 72.00 mg/ml konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir.

*T. polium* özütünün ise, test mikroorganizmaları arasında *S. aureus* ve *S. dysenteriae*'ye karşı 72.00 mg/ml konsantrasyonda minimum inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.

*S. hypargeia* özütünün Gram pozitif bakterilerden *B. subtilis*, *S. aureus*, gram negatif bakterilerden *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *K. pneumonia*, *E. coli* ve *C. albicans*'a karşı 72.00 mg/ml derişimde minimum inhibitör konsantrasyonu gösterdiği belirlenmiştir.

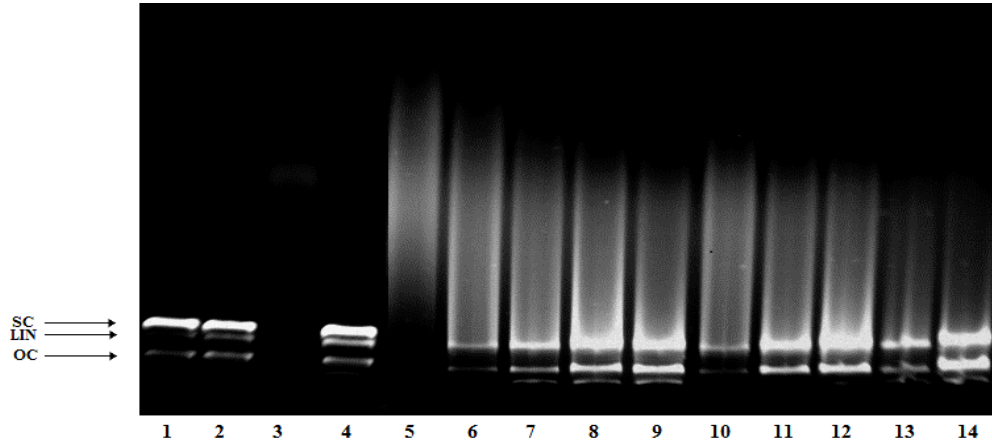
### 3.3. DNA Koruyucu Aktivite

Çalışmada kullanılan bitkilerden elde edilen su özütlerinin DNA koruyucu aktiviteleri, kuvvetli UV ışık ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında plazmit DNA'sının korunmasının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi esasına dayalı olarak incelenmiştir.

DNA kırılımını incelemenin bir yolu, supercoiled DNA'nın (süper kıvrımlı halkasal DNA; kırık yok), open-circular (tek zincir kırığı içeren halkasal DNA; DNA zincirlerinden birinde kırık mevcut) veya linear (doğrusal DNA; iki zincirde de bir veya birden fazla kırık mevcut) forma dönüşümünü gözlemlemektir.

Agaroz jel elektroforezinde bu formların farklı hızlarda hareket ettikleri bilinmektedir. Agaroz jel elektroforezinde pBR322 plazmit DNA'sı; hızlı hareket eden supercoiled DNA (scDNA) ve daha yavaş hareket eden open-circular DNA (ocDNA) olmak üzere 2 bant oluşturmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kuvvetli UV ışık ile muamele edilen plazmit DNA'sı, supercoiled halkasal DNA'nın kırılması sonucu linear DNA'yı meydana getirmektedir

*A. sivasicum*, *T. polium*, *O. laevigatum*, *S. iberica* özütlerinin 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml'lik konsantrasyonlarda DNA'yı -OH radikale karşı koruma etkisi tespit edilmiştir. (Şekil 3.16 ve 3.17) *F. vulgare* ve *S. hypargeia* özütlerinin ise 10, 20, 40, 50, 70 mg/ml'lik konsantrasyonları için DNA koruyucu aktivite test edilmiştir. (Şekil 3.18 ve 3.19)

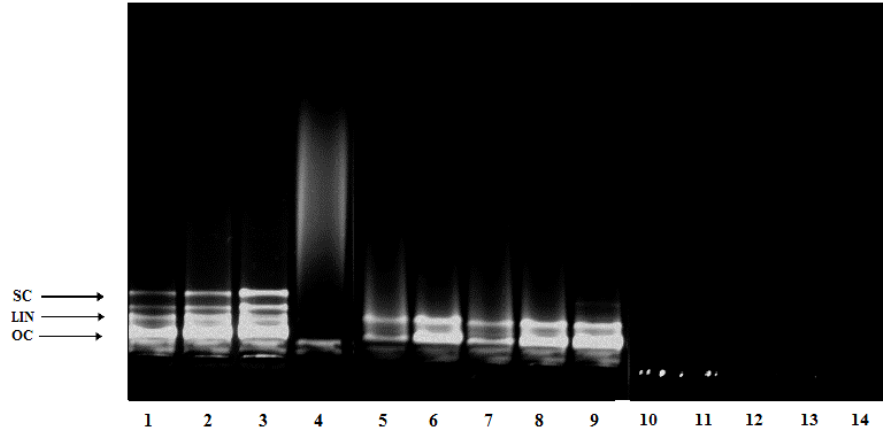


**Şekil 3.16.** *T. polium* ve *O. laevigatum* özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi

1.kuyucuk: Plazmit DNA; 2.kuyucuk: Plazmit DNA + UV; 3.kuyucuk: Plazmit DNA + UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 4.kuyucuk: Plazmit DNA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5.kuyucuk-9.kuyucuk: *T. polium* bitkisinin sırasıyla 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA + UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 10.kuyucuk-14.kuyucuk: *O. laevigatum* bitkisinin sırasıyla 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA + UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **SC:** Supercoiled DNA, **LIN:** Linear DNA, **OC:** Open-circular DNA

Şekil 3.16'da ilk 4 kuyucuk kontrol olarak kullanılmıştır. 1 ve 2. kuyucuklarda üç bant (scDNA, linDNA ve ocDNA) meydana geldiği

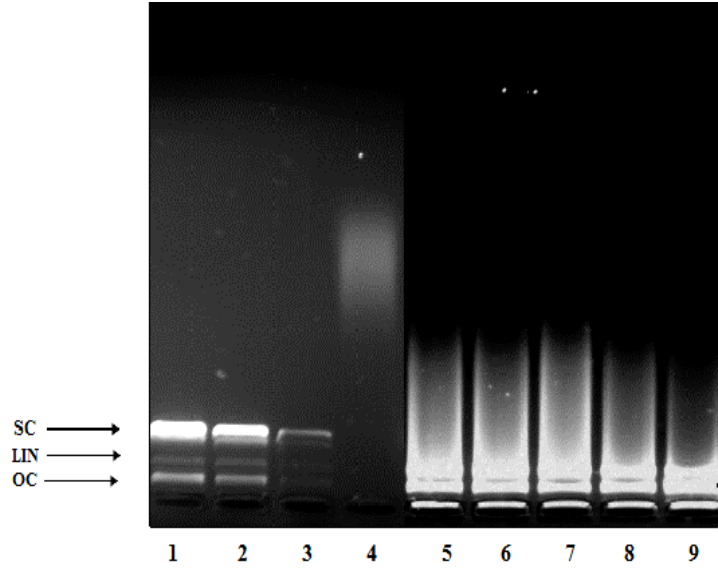
gözlenmiştir. 3. kuyucukta DNA' nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ile etkileşimi sonucu -OH radikalinin DNA'yı kestiği görülmüştür. 4. kuyucukta ise jel üzerinde yine 3 bant (scDNA, linDNA ve ocDNA) oluştuğu belirlenmiştir. *T. polium* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 5. kuyucuk ile 9. kuyucuk arasında belirlenmeye çalışılmıştır. 5 mg/ml özüt varlığında plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezinde smear (sürüntü) görüntüsü meydana getirdiği görülmüştür. 6 ve 7. kuyucuklarda ise sırasıyla 10 ve 20 mg/ ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA olarak isimlendirilen iki bant oluştuğu gözlenmiştir. 8 ve 9. kuyucuklarda ise sırasıyla 40 ve 50 mg/ml özüt varlığında kuvvetli iki bant (ocDNA ve linDNA) meydana geldiği gözlenmiştir. *O.laevigatum* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 10. kuyucuk ile 14. kuyucuk arasında belirlenmeye çalışılmıştır. 5 mg/ml özüt varlığında agaroz jel elektroforezinde smear (sürüntü) görüntüsü meydana geldiği görülmüştür. 11, 12 ve 13. kuyucuklarda ise sırasıyla 10, 20 ve 40 mg/ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA bantlarının oluştuğu gözlenmiştir. 14. kuyucukta 50 mg/ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA' nın kuvvetli oranda korunduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3.17.** *S. iberica* ve *A. sivasicum* özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi

1.kuyucuk: Plazmit DNA+ UV; 2.kuyucuk: Plazmit DNA+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3.kuyucuk: Plazmit DNA; 4.kuyucuk: Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5.kuyucuk-9.kuyucuk: *S. iberica* bitkisinin sırasıyla 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **SC:** Supercoiled DNA, **LIN:** Linear DNA, **OC:** Open-circular DNA; 10.kuyucuk-14.kuyucuk: *A. sivasicum* bitkisinin sırasıyla 5, 10, 20, 40, 50 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **SC:** Supercoiled DNA, **LIN:** Linear DNA, **OC:** Open-circular DNA.

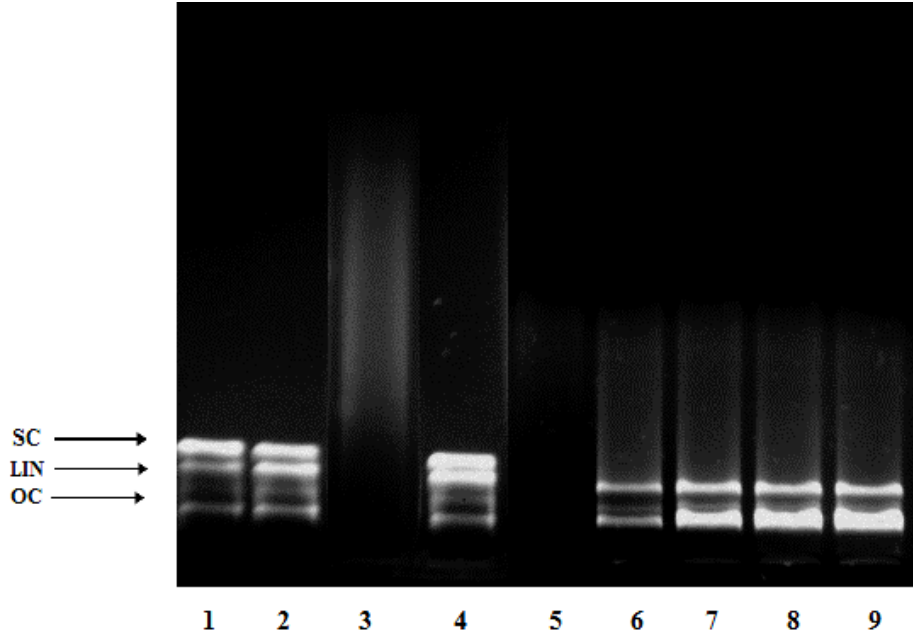
Şekil 3.17' de ilk 4 kuyucuk kontrol olarak kullanılmıştır. 1, 2 ve 3. kuyucuklarda jel üzerinde üç bant (scDNA, linDNA ve ocDNA) oluştuğu gözlenmiştir. 4. kuyucukta DNA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ile etkileşimi sonucu -OH radikalinin DNA'yı kestiği görülmüştür. *S. iberica* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 5. kuyucuk ile 9. kuyucuk arasında belirlenmeye çalışılmıştır. 5-8. kuyucuklarda ise sırasıyla 5, 10, 20 ve 40 mg/ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA bantlarının oluştuğu gözlenmiştir. 9. kuyucukta ise 50 mg/ml özüt varlığında DNA'nın üç bant oluşturduğu ve supercoiled DNA'nın korunduğu gözlenmiştir. *A. sivasicum* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 10-14. kuyucuklar arasında belirlenmeye çalışılmıştır. *A. sivasicum* özütünün 5, 10, 20, 40 ve 50 mg/ml konsantrasyonlarında bant oluşumu gözlenmemiştir.



**Şekil 3.18.** *F. vulgare* özütünün DNA koruyucu aktivitesi

1.kuyucuk: Plazmit DNA; 2.kuyucuk: Plazmit DNA+ UV; 3.kuyucuk: Plazmit DNA+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 4.kuyucuk: Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5.kuyucuk-9.kuyucuk: *F. vulgare* bitkisinin sırasıyla 10 ,20 ,40, 50, 70 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **SC:** Supercoiled DNA, **LIN:** Linear DNA, **OC:** Open-circular DNA.

Şekil 3.18' de ilk 4 kuyucuk kontrol olarak kullanılmıştır. 1. kuyucukta üç bant (scDNA, linDNA ve ocDNA) olduğu gözlenmiştir. 2 ve 3. kuyucuklarda ise jel üzerinde yine 3 bant olduğu görülmüştür. 4. kuyucukta DNA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ile etkileşimi sonucu -OH radikalinin DNA'yı kestiği belirlenmiştir. *F. vulgare* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 5-9. kuyucuklar arasında belirlenmeye çalışılmıştır. 5, 6 ve 7. kuyucuklarda ise sırasıyla 10, 20 ve 40 mg/ ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA bantlarının olduğu gözlenmiştir. 8 ve 9. kuyucuklarda ise sırasıyla 50 ve 70 mg/ml özüt varlığında kuvvetli iki bant (ocDNA ve linDNA) olduğu görülmüştür. Ancak hiçbir konsantrasyonun supercoiled DNA'yı korumadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 3.19.** *S. hypargeia* özütünün DNA koruyucu aktivitesi

1.kuyucuk: Plazmit DNA UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 2.kuyucuk: Plazmit DNA+ UV; 3.kuyucuk: Plazmit DNA; 4.kuyucuk: Plazmit DNA+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5.kuyucuk-9.kuyucuk: *S. hypargeia* bitkisinin sırasıyla 10, 20, 40, 50, 70 mg/ml'lik konsantrasyonları + Plazmit DNA+ UV+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **SC:** Supercoiled DNA, **LIN:** Linear DNA, **OC:** Open-circular DNA.

Şekil 3.19'da ilk 4 kuyucuk kontrol olarak kullanılmıştır. 1 ve 2. kuyucuklarda üç bant (scDNA, linDNA ve ocDNA) oluştuğu gözlenmiştir. 3. kuyucukta DNA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ile etkileşimi sonucu -OH radikalının DNA'yı kestiği görülmüştür. 4. kuyucukta ise jel üzerinde yine 3 bant oluştuğu belirlenmiştir. *S.hypargeia* özütünün DNA koruyucu potansiyeli agaroz jel üzerinde 5-9. kuyucuklar arasında belirlenmeye çalışılmıştır. 10 mg/ml özüt varlığında agaroz jel elektroforezinde smear (sürüntü) görüntüsü meydana gelmiştir. 6 ve 7. kuyucuklarda ise sırasıyla 20 ve 40 mg/ml özüt varlığında ocDNA ve linDNA bantlarının oluştuğu gözlenmiştir. 8 ve 9. kuyucuklarda ise sırasıyla 50 ve 70 mg/ml özüt varlığında plazmit DNA'sının kuvvetli iki bant (ocDNA ve linDNA) oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak hiçbir konsantrasyonun supercoiled DNA'yı korumadığı tespit edilmiştir.



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler binlerce yıldır doğal ilaç olarak kullanılmaktadır (Balunas ve Kinghorn, 2005). Son yıllarda ise bitkilerden elde edilen farklı özütler ve bu özütlerden elde edilen doğal ürünlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Kelen ve Tepe, 2008). Birçok bitki türünün antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri hakkında çok sayıda çalışma mevcuttur.

Literatür bilgileri ışığında, çalışmada kullanılan *S. iberica*, *S. hypargeia*, *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* bitkileri hakkında sınırlı sayıda çalışma olduğu söylenebilir. Buna karşılık *T. polium* ve *F. vulgare* bitkilerden elde edilen özütlerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada *S. hypargeia*, *A. sivasicum*, *O. laevigatum* ve *F. vulgare* su özütlerinin DNA koruyucu aktiviteleri ilk kez çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitkilerin antioksidan aktiviteleri 5 farklı metod kullanılarak incelenmiştir. Aktivite testlerinin yanı sıra özütlerin toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarı da belirlenmiştir.

Antioksidan aktivite tespitinde kullanılan DPPH testi, antioksidan özelliğe sahip bileşiklerin elektron ve hidrojen atomu transferi ile DPPH radikalinin hidrazin türevlerine indirgenmesi sonucu absorbansın düşmesi temeline dayanmaktadır (Göger, 2006). Çalışmada DPPH serbest radikal giderim aktivitesi üç farklı derişimde tayin edilmiştir. Bitki özüt derişimi artışına bağlı olarak % inhibisyon değerinde de artış saptanmıştır. Kullanılan bitkiler arasında *O. laevigatum* ve *A. sivasicum* özütlerinin oldukça güçlü radikal süpürücü aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Literatürde, *Allium* cinsi üyelerinden elde edilen özütlerin antioksidan aktiviteleri üzerine pek çok çalışma mevcuttur (Stajner ve Varga 2003; Chaithradhyuthi ve ark., 2009). Tepe ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *A. sivasicum* metanol özütünün antioksidan aktivitesi DPPH serbest radikal giderim ve  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım testi ile tespit edilmiştir. 5 farklı *Allium* türü metanol özütünün antioksidan aktiviteleri kıyaslandığında *A. sivasicum* türünün orta düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği

söylenbilir. Benzer şekilde *Origanum* cinsi üyelerinden elde edilen özütler hakkında da literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Tepe ve ark.,2004; Baaliouamer ve ark., 2006). Ancak *O. laevigatum* türü üzerine daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hücre membranlarında bulunan lipitler, linoleik asit ve arakidonik asit gibi oksidasyona müsait doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengindir.  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım testinde, linoleik asitten hidrojen çıkması sonucu oluşan pentadienil serbest radikalının yüksek konjugasyona sahip olan  $\beta$ -karotene hücum etmesi sonucu reaksiyon emülsiyonunun renginin açılması esastır (Shariffifar ve ark., 2009). Çalışmada kullanılan tüm bitki özütlerinin yüksek oranda  $\beta$ -karoten-linoleik asit oksidasyonunu engellediği gözlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *T. polium* (% 94.59  $\pm$  0.16) ve *O. laevigatum* (% 93.62  $\pm$  0.00) özütlerinin gösterdiği belirlenmiştir. *T. polium* ve *O. laevigatum* türlerinin, sentetik antioksidanlar BHT ve BHA'dan daha yüksek aktivite gösterdikleri görülmüştür. Kadifkova-Panovska ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *T. polium*, *T. montanum* ve *T. chamaedrys* organik solventleriyle elde edilen özütlerin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. *T. polium* özütünün 0.4 mg/ml derişim değerinde  $\beta$ -karoten oksidasyon inhibisyonu oldukça yüksek bulunmuştur (Ljubuncic ve ark., 2006). *T. polium*' un farklı polariteye sahip özütlerinin antioksidan aktivitelerinin araştırılmasının yanı sıra, yine bu bitkiden elde edilen fitokimyasalların farklı gruplarının, flavonoidlerin (Shariffifar ve ark., 2009; Vukics ve ark., 2008) ve fenolik bileşiklerin (Rice-Evans ve ark., 1997; Wang ve ark., 2000) antioksidan aktiviteleri birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara paralel olarak, Tepe ve arkadaşlarının (2010) *S. iberica* ve *T. polium* türleri üzerine yaptıkları çalışmada,  $\beta$ -karoten-linoleik asit renk açılım testinde *T. polium* su özütü inhibisyon yüzdesini 93.37  $\pm$  0.14 olarak tespit edilmişlerdir.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemleri lipit peroksidasyonu üzerine olan etkileridir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerini parçalayarak ve

lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederek serbest radikallerin zararlarını artırır (Benzer ve Kılıç, 2006). Serbest demir en güçlü pro-oksidan moleküllerden birisidir. Demirin oksidatif stres, toksik serbest radikal oluşumu, lipit peroksidasyonu gibi pek çok süreçte aktif rol oynadığı bilinmektedir (Okutur, 2006). Lipit peroksidasyonu gıdalardaki oksidatif bozulmanın ve insan vücudundaki hücrel organellerin fizyolojik fonksiyonlarının kaybının en önemli nedenidir (Göger, 2006).

Çalışmamızda kullanılan Dinis metodu, bitki özütleri ve EDTA' nın ferrozin ve demir kompleksiyle yarışması, ferrozinden önce demir iyonlarını yakalayıp onunla kompleks yapmaları esasına dayanmaktadır. Düşük absorpsiyon,  $Fe^{+2}$  ferrozin kompleksinin azaldığının belirtisidir. Çalışmamızda kullanılan bitki özütlerinden *F. vulgare*' nin metal şelatlama aktivitesinin diğer bitkilere oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $\% 74.78 \pm 3.78$ ). *A. sivasicum* ve *O. laevigatum* özütlerinde ise metal-şelatlama aktivitesi gözlenmemiştir. Kullanılan bitki özütlerinin metal şelatlama aktivitelerinden elde edilen sonuçlar aynı zamanda demir (metal) bağlama kapasitelerinin de göstergesidir.

Fosfomolibdenyum metodu, diğer antioksidan testlerinden bağımsız, yaygın olarak kullanılan, uygulanması basit bir yöntemdir. Antioksidan bileşikler tarafından Mo(VI)'nın Mo(V)'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır (Lu ve Foo, 2001). *O. laevigatum* özütünün diğer bitki özütlerine oranla oldukça yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur ( $242.64 \pm 8.99 \mu\text{g}$  askorbik asit/mg özüt). Çalışmamızda kullanılan bitki özütlerinin fosfomolibdenyum metoduna göre, antioksidan aktiviteleri ile fenolik bileşik miktarları arasında güçlü bir paralellik ( $r^2 = 0,967$ ) olduğu görülmüştür.

Bileşiklerin antioksidan aktivitesi, peroksidlerin detoksifikasyonu, geçiş metallerinin kataliz etkisini geciktirmesi, zincir reaksiyonlarını engellemesi ve radikalleri temizleme aktiviteleri gibi farklı mekanizmalara bağlı olabilir. Ancak antioksidan aktivite ile indirgeme gücü kapasitesi doğrudan ilişkili değildir (Oktay ve ark., 2003). Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin indirgeme gücü sırasıyla

BHT > BHA > *A. sivasicum* > *S. iberica* > *T. polium* > *S. hypargeia* > *O. laevigatum* > *F. vulgare* şeklinde bulunmuştur. Bitki özütlerinin indirgeme gücü sonuçları ile diğer antioksidan aktivite sonuçları arasında güçlü bir ilişki olmadığı görülmüştür. Tepe ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmaya göre, *T. polium*' un 1.0 mg/ml konsantrasyondaki indirgeme gücü kapasitesinin  $0.600 \pm 0.013$  nm ve *S. iberica*' nın aynı konsantrasyondaki indirgeme gücü kapasitesinin  $0.285 \pm 0.007$  nm olduğu rapor edilmiştir.

Fenolik bileşikler, hidroksil grupları içermeleri nedeniyle serbest radikal yakalama yeteneğine sahip bileşiklerdir (Oktay ve ark., 2003). Bu özellikleriyle hem canlı dokularda hem de gıda ürünlerinde oluşan peroksit detoksifikasyonuna ve lipid oksidasyona engel olabilirler (Sharififar ve ark., 2009). Çalışmamızda kullanılan bitkiler arasında *O. laevigatum*' un, toplam fenolik bileşik miktarı açısından en zengin özüt olduğu tespit edilmiştir ( $125.96 \pm 1.98$  µg gallik asit / mg özüt). Literatürdeki birçok çalışmaya paralel olarak, bitki özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları ile toplam antioksidan aktivite sonuçları arasında kuvvetli bir paralellik olduğu görülmüştür. Bitkilerin toplam fenolik bileşik miktarları ile hem DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ( $r^2 = 0.918$ ) hem de β-karoten-linoleik asit yöntemiyle elde edilen sonuçlar arasındaki ( $r^2 = 0.943$ ) güçlü ilişki dikkat çekicidir. Daha önceki çalışmalarda da bazı araştırmacılar, bitkilerdeki toplam fenolik bileşik miktarı ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişkinin varlığından bahsetmişlerdir (Gülçin ve ark., 2004).

Flavonoidler, fenolik hidroksil grupları ile C6-C3-C6 yapısında bileşiklerdir. Bitkilerin önemli sekonder metabolit gruplarından biri olan flavonoidlerin,  $O_2^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $ROO^{\bullet}$  ve  $NO^{\bullet}$  radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama, α-tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlara katıldığı bildirilmiştir (Selen ve İşbilir, 2008). Genel olarak flavonoidlerin antioksidan aktiviteye sahip olmalarının, yapılarındaki hidroksil gruplarının yerleşimine bağlı olduğu bilinmektedir (Sharififar ve ark., 2009). Flavonoidlerin yapılarındaki –OH sayısının artışı, B halkasındaki o-dihidroksi yapı, 3' ve 4' karbon atomlarına –OH gruplarının bağlanması antioksidan aktiviteyi artırmaktadır (Zerroug ve ark.,

2011). Çalışmamızda *A. sivasicum*' un en yüksek flavonoid bileşik miktarına sahip bitki olduğu görülmüştür ( $79.25 \pm 0.46$  µg quercetin / mg özüt). *A. sivasicum* özütünün diğer bitki özütlerine oranla toplam flavonoid içeriğinin oldukça yüksek olması dikkat çekicidir. Birçok çalışmada flavonoid madde miktarı ile antioksidan aktivite arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Sharififar ve ark., 2009; Tepe ve ark., 2010). Çalışmamızda bitki özütlerinin toplam flavonoid bileşik miktarı ile indirgeme gücü sonuçları arasında pozitif bir ilişki ( $r^2 = 0,832$ ) olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda kullanılan bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılmasında 2 farklı yöntem uygulanmıştır. Agar-kuyucuk yönteminde *T. polium* özütünün, test edilen mikroorganizmalar arasında sadece *S. aureus*' a karşı ılımlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. *O. laevigatum* özütünün ise *S. boydii* ve *S. dysanteria* bakterilerine karşı inhibisyon zonu meydana getirdiği gözlenmiştir.

Toroğlu ve ark. (2005), *T. polium*' dan elde edilen uçucu yağın *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* ve *Klyveromyces fragilis*' e karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Ahmadian-Attari ve ark. (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *T. polium*' dan elde edilen etanol özütünün antimikrobiyal aktivitesi *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* bakterilerine karşı test edilmiş, *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir.

Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için kullanılan diğer bir yöntem ise MİK testidir. MİK testinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde agar-kuyucuk yöntemi sonuçları ile paralel olduğu göze çarpmaktadır. Tabanca ve ark. (2001), *Origanum amanum* ve *Origanum laevigatum* bitkilerinin hibridi olan *O. dolichosiphon*' dan elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini mikrodilüsyon metodu ile *E. coli*, *S. aureus* ve *S. typhimurium* bakterileri üzerinde çalışmıştır. Ancak kuvvetli bir antimikrobiyal etki gözlenememiştir.

Zerroug ve ark. (2011), mikrodilüsyon metodu ile *T. polium* methanol özütünü 5 farklı test mikroorganizmasına karşı denemiştir. *T. polium* en kuvvetli antimikrobiyal etkiyi *B. subtilis*, *M. luteus*, *P. paratrophus* üzerinde göstermiş ve bu etkinin *T. polium*' un zengin flavonoid içeriğinden kaynaklandığı öne sürülmüştür.

Genel olarak çalışmamızda kullanılan bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri, kontrol olarak kullanılan antibiyotikler ile kıyaslandığında elde edilen sonuçların oldukça zayıf olduğu görülmüştür.

Deri kanserine yakalanma oranı gün geçtikçe artmakta olup bu artışın sebebinin yüksek seviyede güneş kaynaklı genotoksik UV radyasyona maruz kalma olduğu düşünülmektedir (Yamaguchi ve ark., 2009). UV ışınları, serbest radikallerle birlikte doğrudan ya da dolaylı olarak lipit, protein ve DNA üzerinde hasara neden olmaktadır. Yüksek derişimde serbest radikal üretimi, muhtemel DNA lezyonlarını ve dolayısıyla mutasyon oranını artırır. Gıdalardaki ve tıbbi bitkilerdeki çeşitli bileşikler, cilt üzerindeki rahatsızlıkları tedavi edici ve yaşlanma karşıtı etkileri ile halk arasında uzun süredir kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin malign melanom'u da içeren deri kanseri türlerine karşı korumada etkili olduğu kanıtlanmıştır (Rigano ve ark., 2009).

Çalışmamızda bitkilerden elde edilen polar özütlerin DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisi kuvvetli UV ışık ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında agaroz jel elektroforeziyle incelenmiştir. *S. iberica* özütünün agaroz jel elektroforezinde supercoiled DNA'yı koruduğu ve serbest radikaller sonucu oluşan DNA kesimini engellediği gözlenmiştir. *T. polium*, *O. laevigatum*, *F. vulgare* ve *S. hypargeia* özütlerinin varlığında ise, DNA'nın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında UV ile etkileşmesi sonucu agaroz jel elektroforezinde supercoiled DNA'da kesim meydana geldiği ve supercoiled formun, tamamen lineer ve opencircular forma dönüştüğü görülmüştür. *A. sivasicum* özütünün ise hiçbir derişim değerinde DNA koruyucu aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Tepe ve ark. (2010) tarafından yapılan benzer bir çalışmada *T. polium* ve *S. iberica* su özütlerinin kuvvetli UV ışık ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında pBR322 plazmit DNA'sını koruma potansiyelleri incelenmiştir. Çalışmamızın aksine *T. polium* özütünün *S. iberica* özütüne göre daha güçlü DNA koruyucu aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin bitkilerin yetiştikleri coğrafi bölge ve kullanılan bitkisel kısımların farklılığı olduğu söylenebilir.

Çalışmada kullanılan tüm bitki özütlerinin düşük antimikrobiyal aktivite göstermelerine rağmen serbest radikalleri gidermede oldukça yüksek etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bitki özütlerinin DNA koruyucu aktivitelerinin araştırılmış olmasının daha sonraki çalışmalara temel olabilecek nitelikte önemli veriler sağladığı söylenebilir. Tezde kullanılan bitkilerin aktiviteleri hakkında literatürde sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan bazı bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu aktiviteleri ilk kez bu tez ile araştırılmıştır. Ancak bu bitkilerin antioksidan aktivitelerinden sorumlu sekonder metabolit gruplarının neler olduğunun araştırılması da büyük önem taşımaktadır. Özütlerin yapısında bulunan etken maddelerin tespiti ile üretilen doğal antioksidanlar, yan etkileri olduğu kabul edilen BHT ve BHA gibi sentetik antioksidanların yerini alabilecektir. Sonuç olarak, bu bilgiler ışığında gıda, kozmetik ve farmakoloji alanlarında doğal antioksidan kaynağı olarak bu bitki özütlerinin değerlendirilmesinin mümkün olduğu düşünülmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Ahmadian-Attari, M.M., Monsef Esfahani, H.R., Amin, G.R., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., Kamalinia, G., Khanlarbeik, M., Ashtiani, H., Farsam, H. 2009.** The ethnopharmacological study on antibacterial activity of some selected plants used in Iranian traditional medicine. *Journal of Medicinal Plants*, 31: 50-57.
- Alanis, A.J. 2005.** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36: 697-705.
- Alim, A., Göze, İ., Çetin, A., Atas, A.D., Çetinus, Ş. A., Vural, N. 2009.** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *Albiflora* (Boiss.) gams. *African Journal of Microbiology*, 8: 463-467.
- Aniszewski, T. 2007.** Alkaloid- Secrets of Life, Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role, (pp.1-6). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Antmen, Ş.E. 2005.** Beta talasemide oksidatif stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P. 1994.** Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49: 462-468.
- Atmaca, E., Aksoy, A. 2009.** Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 20: 79-83.
- Attaguile, G., Russo A., Campisi A., Savoca F., Acquaviva R., Ragusa N., Vanella A. 2000.** Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biology and Toxicology*, 16: 83-90.



- Balunas, M.J., Kinghorn A.D. 2005.** Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 431-441.
- Baron, S. 1996.** Medicinal Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. In: Neu, H.C., Gootz, T.D. (eds), Antimicrobial Chemotherapy, University of Texas Medical Branch, Texas, USA.
- Benkeblia N., Lanzotti V. 2007.** Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Global Science Books*, 1: 193-201.
- Benzer, F., Kılıç, A. 2006.** Klamidiozisli insanlarda serbest radikal hasarı ile geçiş metallere Fe ve Cu arasındaki ilişkiler. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20: 9-13.
- Chaithradhyuthi, Gayathri S., Sowmya P. S., Shwetha B.R., Swarna G., Rama Bhat P., Manojkumar N.H., Raghavendra Rao B. 2009.** Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of some members of *Allium*. *ETEAFChe*, 5:345-350.
- Chandler, S. F., Dodds, J. H. 1983.** The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum lacinitum*. *Plant Cell Reports*, 4: 205-208.
- Cowan, M.M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Çetin, B. 2006.** *Rubia tinctorum* bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla transforme saçaklı kök kültürlerinin oluşturulması ve sekonder metabolit üretimi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Çöllü, Z. 2007.** *Urtica pilulifera* L. bitkisinin antioksidant aktivitesinin araştırılması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linszen, P. H. 1998.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures

from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 140–146.

**Delibaş, N., Özçankaya R. 1995.** Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2: 11-17.

**Dewick, P.M. 2002.** Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2<sup>nd</sup> ed.(pp. 6-12). Wiley & Sons., Chichester, England.

**Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, M.L.M. 1994.** Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 161-169.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006.** Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.

**Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. 2003.** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83: 255- 262.

**Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.

**Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F.J., Mazoochi, A., Batooli, H. 2010.** Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extract of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chemistry*, 119: 452-458.

**Ergezer, H., Çam, M. 2008.** Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine Etkileri. “Türkiye 10.Gıda Kongresi, Bildiriler, 21-23 Mayıs 2008”, Erzurum, 229-232.

- Göğer, F. 2006.** *Salvia virgata* Jacq. ve *Salvia halophila* Hedge'nin antioksidan etkilerinin ve bileşimlerinin belirlenmesi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Guedes, A.P. 2009.** Essential oils from plants and in vitro shoot cultures of *Hypericum androsaemum* L. *H. perforatum* L. and *H. undulatum* Schousboe ex.Wild. Phd Thesis, University of Minho, Portugal.
- Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M., Büyükokuroğlu M.E. 2004.** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 205-215.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara. T., Okuda, T. 1988.** Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 2090-2097.
- Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro ML., Miquel MG. 2006.** Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.*, 17: 6314- 6321.
- Hızlısoy, H. 2009.** Çeşitli mikroorganizmalar üzerine gilaburunun antimikrobiyal etkisinin incelenmesi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Hudson, B.J.F. 1990.** Food antioxidants. Elsevier Applied Science, London and New York.
- İşcan, G., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., Demirci, F. 2002.** Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3943-3946
- Kadifkova-Panovska, T., Kulevanova, S., Stefova, M. 2005.** *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). *Acta Pharm.*, 55: 207-214.

- Kandemir, N. 2003.** The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia hypargeia* Fich.& Mey. (Lamiaceae) in Turkey. *Pak. J. Bot.*, 35: 219-236.
- Karaca, Ş., Güder, H. 2009.** Dermatolojide antioksidan sistem. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 3: 32-39.
- Karamanoğlu, K. 1977.** Farmasötik Botanik. (pp. 3-20). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. 2006.** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550-557.
- Kaur, G.J., Arora, D.S. 2010.** Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae-Current status. *Journal Medicinal Plant Research*, 4: 87-94.
- Kaya, A., Demirci, B., Başer, K.H.C. 2001.** The composition of the essential oil of *Stachys iberica* subsp. *stenostachya* growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 37: 326-328.
- Kelen M., Tepe B. 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 99: 4096-4104.
- Kırbağ, S., Zengin, F. 2006.** Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *Y.Y. Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 16: 77-80.
- Koca, N., Karadeniz, F. 2003.** Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 32-37.
- Kokare, C.R. 2008.** Basic Microbiology for Nursing and Health Science. (pp.3.9-3.11). Nirali Prakasyan, Pune, India.

- Kozluca, O. 1993.** Serbest radikaller ve kanser. *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri*, Clit IV: 422-425.
- Kumar, A., Chattopadhyay, S. 2007.** DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chemistry*, 100: 1377-1384.
- Kuyucu, N. 2007.** Antibiyotik direnci. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 1: 33-38.
- Kürek, N. 2007.** Denizli ve çevresinde yayılış gösteren *Eryngium* cinsine ait saf ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Lako, J., Trenerry, V.C., Wahlqvist M., Wattanapenpaiboon, N., Sotheeswaran, S., Premier R. 2007.** Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101: 1727-1741.
- Letelier, M.E., Molina-Berrios, A., Cortes-Troncoso, J., Jara-Sandoval, J., Holst, M., Palma, K., Montoya, M., Miranda, D., Gonzalez-Lira, V. 2008.** DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicology in Vitro*, 22: 279-286.
- Ljubuncic, P., Dakwar, S., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A. 2006.** Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in vitro*. *eCAM.*, 3: 329-338.
- Lu, Y., Foo, L. Y. 2001.** Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75: 197-202.
- Mahesh, B., Satish, S. 2008.** Antimicrobial activity of some important medicinal plants against plant and human pathogens. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4: 839-843.
- Mendonça, R.R. 2006.** Bioactive phytochemicals: new approaches in the phytosciences. *Modern Phytomedicine*, 23: 457-478.

- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1999.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *9th International Supplement*. M100-S9.
- Oflaz, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. 2002.** *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* üzerinde farmakognozik araştırmalar. “14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002” Eskişehir, 252- 258.
- Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2003.** Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 36: 263-271.
- Okutur, K. 2006.** Tip 2 diabetes mellitus’lu hastalarda vücut demir depoları ile metabolik kontrol, insülin rezistansı ve mikroalbuminüri arasındaki ilişki. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi III. Dahiliye Kliniği, İstanbul.
- Oyaizu, M. 1986.** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44. 307–315.
- Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, İ., Tuncer, İ., Öztürk, G., Öztürk, A. 2003.** Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74: 317-319.
- Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, İ., Tuncer, İ., Öztürk, A. 2002.** Karbontetraklorürle oluşturan akut karaciğer toksisitesinde *Foeniculum vulgare* (rezene) uçucu yağının hepatoprotektif etkisi: Deneysel çalışma. “14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002” Eskişehir, 301-308.
- Özcan, M.M., Chalchat, J.C. 2006.** Effect of collection time on chemical composition of the essential oil of *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* growing wild in Turkey. *Eur Food Res Technol.*, 224: 279-281.

- Panpipat, W., Suttirak, W., Chaijan, M. 2010.** Free radical scavenging activity and reducing capacity of five southern Thai indigenous vegetable extracts. *Walailak J. Sci. & Tech*, 7: 51-60.
- Percival, M. 1996.** Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 96: 1-4.
- Polat, Z.A., Vural, A., Tepe, B., Çetin, A. 2007.** In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitol Res.*, 101: 397-402.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A. 1995.** Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30: 277-290.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. 2006.** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 1142-1145.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.*, 269: 337-341.
- Radulovic, N., Lazarevic, J., Ristic N., Palic, R. 2007.** Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 196-208.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1997.** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 4: 152-159.
- Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Teresa Maldini, M., Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., Senatore, F. 2009.** *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 180: 211-219.

- Rios, J.L., Recio, M.C. 2005.** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- Roche, H.M., Seagrove, S., Mehta, A., Divekar, P., Campbell, S., Curnow, A. 2010.** Using natural dietary sources of antioxidants to protect against ultraviolet and visible radiation-induced DNA damage: An investigation of human green tea ingestion. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101: 169-173.
- Selen İşbilir, Ş. 2008.** Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M. 2009.** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112: 885-888.
- Siddiqui, S., Verma, A., Rather, A.A., Jabeen, F., Meghvansi, M.K. 2009.** Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plant. *Advances in Biological Research*, 3: 188-195.
- Sies, H. 1997.** Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295.
- Slinkard, K., Singleton, V. L. 1977.** Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28. 49–55.
- Stajner, D., Varga, I. S. 2003.** An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 : 103-106.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M. 2007.** Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102: 938-953.



- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H. 2004.** Biological activities of essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Food Control*, 15: 549-557.
- Tabanca, N., Demirci, F., Özek, T., Tümen, G., Başer, K.H.C. 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum x dolichosiphon* P.H.Davis. *Chemistry of Natural Compounds*, 37: 238-241.
- Tenover, F.C. 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119: S3-S10.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen M., Polissiou, M., Sökmen, A. 2004.** The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L var *bevanii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1389-1396.
- Tepe, B., Değerli, S., Arslan, S., Malatyalı, E., Sarıkürkçü, C. 2010.** Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamoebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 1-30.
- Tepe, B., Eminağaoğlu, Ö., Akpulat, H.A., Aydın, E. 2007.** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100: 985-989.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Sökmen, A. 2005.** In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chemistry*, 92: 89-92.
- Toroğlu, S., Çenet, M. 2006.** Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9: 12-20.

- Toroğlu, S., Dığrak, M., Kocabař, Y.Z. 2005.** ay ve baharat olarak tüketlenen *Teucrium polium* L., *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *Ocimum basilicum* L. ve *Foeniculum vulgare* Miller' in uçucu yağlarının in-vitro antimikrobiyal aktivesi ve bazı antibiyotiklerle etkileşimleri. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8: 36-42.
- Turan, M., Sökmen, A., Karadağı, K., Polat, Z.A., şen, M. 2010.** Sivas yöresine özđü bazı bitkilerinin antineoplastik etkileri. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 32: 9-18.
- Vukics, V., Kery, A., Bonn, G.K., Guttman, A. 2008.** Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities, *Anal.Bioanal.Chem.*, 390: 1917-25.
- Wang, W., Weng, X., Cheng, D. 2000.** Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry*, 71: 45- 49.
- Webber, M.A., Piddock, L.J.V. 2003.** The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 9-11.
- Wei, H., Zhang, X., Zhao, J.F., Wang, Z.Y., Bickers, D., Lebwohl, M. 1999.** Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by aqueous extract from green and black teas. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1427-1435.
- Yaldız, G., Yüksek, T., şekeroğlu, N. 2010.** Rize ili florasında bulunan tıbbi ve aromatik bitkiler ve kullanım alanları. "III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 20-22 Mayıs 2010", Cilt:3 pp.1100-1114.
- Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Mascio, P.D. 2009.** Bioflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. *Phytochemistry*, 70: 615-620.

- Yokuş, B., Çakır, D.Ü. 2002.** İn vivo oksidatif DNA hasarı biyomarkerı, 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci*, 22: 535-543.
- Yüce, A. 2001.** Antimikrobiyal ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klimik Dergisi*, 14: 41-46.
- Zerroug, M.M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Nicklin, J., Arrar, L. 2011.** Antibacterial activity of extracts of *Ajuga reptans* and *Teucrium polium*. *Advances in Environmental Biology*, 2: 491-495.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

04.01.1984 yılında Sivas'ta doğdu. İlkokul öğrenimini Sivas Gaziosmanpaşa İlkokulu'nda, ortaokul ve lise öğrenimini ise Sivas Selçuk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında Biyoloji lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl içerisinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programını kazandı. 2009 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programına yatay geçişi kabul edildi.