

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**“*SALVIA CAESPITOSA* MONTBRET AND AUCHER EX BENTHAM” TÜRÜNÜN  
PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL,  
ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DERYA GÜLMEZ**

**Balıkesir, Temmuz-2010**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

“*SALVIA CAESPITOSA* MONTBRET AND AUCHER EX. BENTHAM” TÜRÜNÜN  
PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL,  
ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya GÜLMEZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Sınav Tarihi: 23.07.2010

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Gülendamar TÜRMEK (BAÜ)

Doç. Dr. Arzu U. TÜRKER (AİBÜ)

Doç. Dr. Tülin AŞKUN (BAÜ- Danışman)

Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ..... sayılı oturumunun ..... nolu  
kararı ile ..... Mezun olmuştur.

Balıkesir, Temmuz - 2010

Bu tezi 2009/1 nolu proje ile destekleyen Balıkesir Üniversite Rektörlüğü  
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.

## ÖZET

### “*SALVIA CAESPITOSA* MONTBRET AND AUCHER EX. BENTHAM” TÜRÜNÜN PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL, ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Derya GÜLMEZ  
Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/Tez Danışmanı: Doç.Dr. Tülin AŞKUN)  
Balıkesir, 2010

Ülkemizde yüzyıllardır bitki çayı olarak tüketilen *Salvia* türlerinden elde edilen uçucu yağların ve ekstratların antimikrobiyal, antioksidan, antihipertansif, antidiabetik ve antitümör özelliklere sahip olduğu bir çok çalışmada belirlenmiştir. Bu nedenle bu çalışma da Türkiye'nin Antalya-Burdur arasında yetişen, Türkiye için endemik *salvia* genusuna ait *Salvia caespitosa* bitkisinin etanol, metanol ve petrol eteri ekstratlarının antibakteriyel, antifungal ve antioksidan aktivitesi araştırıldı.

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında; *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) ve *Bacillus cereus* (CCM 99) bakterileri kullanıldı. Antifungal aktivite için *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534) ve *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) fungusları ve antimaya aktivite için *Candida albicans* (ATCC 10239) mayası kullanıldı.

Çalışmamızda *Salvia caespitosa* bitkisine ait metanol, etanol ve petrol eteri ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile incelendi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlendi. Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda, *Salvia caespitosa* türünün metanol ekstresi *P. vulgaris* üzerinde bakterisit etki gösterdi (MBK: 12.5 mg/ml). Fungisit etki *F. proliferatum* üzerinde 6.3 mg/ml konsantrasyon değerinde görüldü. Etanol ekstresi *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde 12.5 mg/ml konsantrasyon değerinde bakterisit etki gösterdi. Fungisit etki *A. flavus* hariç tüm küflerde görüldü (12.5 mg/ml). Petrol eteri ekstresi ise *P. vulgaris* ve *B. cereus* bakterileri üzerinde 12.5 mg/ml konsantrasyon değerinde bakterisit etki gösterdi. *A. ochraceus* küfünde ise 6.3 mg/ml değerinde en düşük konsantrasyonda fungisit etki gösterdi.

Antioksidan aktivite DPPH metodu kullanılarak yapıldı ve IC50 değerleri metanol, etanol ve petrol eter ekstratları için sırasıyla 52.35±0.29; 30.52±0.26; 110±3.3 µg/mL olduğu tespit edildi. Total fenol miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla incelenmiş olup, etanol ekstresinin en yüksek total fenol miktarına sahip olduğu belirlendi (291.33 mgGA/gr). Alüminyum Klorür (AlCl<sub>3</sub>) Kolorimetrik Metodu kullanılarak metanol ekstresinin 26.7 mg katekol/gr total flavonoid miktarı ile en yüksek konsantrasyonda flavonoid içerdiği tespit edildi. HPLC analizi sonucunda bitkimizin ekstratlarında bulunan fenolik bileşikler tespit edildi ve elde ettiğimiz sonuçlarla tartışıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Salvia caespitosa*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite

## ABSTRACT

### DETERMINING THE ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE PETROLEUM ETHER, ETHANOL AND METHANOL EXTRACTS OF “*SALVIA CAESPITOSA* MONTBRET AND AUCHER EX. BENTHAM”

Derya GÜLMEZ  
Balıkesir University, Institute of Science  
Department of Biology

(MSc Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Tülin AŞKUN)  
Balıkesir, 2010

It has been found in many studies that the essential oils and extracts obtained from *Salvia*, which has been consumed in our country as a herbal tea for centuries, have antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, antidiabetic and antitumor features. Therefore, in this study, the antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the ethanol, methanol and petroleum ether of *Salvia caespitosa* were investigated – a plant that belongs to the *salvia* genus endemic to Turkey and that grows in Antalya and Burdur region.

For the antimicrobial activity part of the study, *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) and *Bacillus cereus* (CCM 99) were used. For the antifungal activity part, *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534) and *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) were used. For the antiyeast activity part, *Candida albicans* (ATCC 10239) was used.

In our study, the antimicrobial activities of the methanol, ethanol and petroleum extracts of *Salvia caespitosa* were examined using the disc diffusion and microdilution methods, and a minimum concentration of bactericide/fungicide was found. As a result of its antimicrobial activity, the methanol extract of *Salvia caespitosa* had a bactericide effect on *P. vulgaris* (MBK: 12.5 mg/ml). A fungicide effect was determined on *F. proliferatum* with a concentration of 6.3 mg/ml. The ethanol extract had a bactericide effect on *P. aeruginosa* and *S. aureus* with a concentration of 12.5 mg/ml. The fungicide effect was seen on all moulds except for *A. flavus* (12.5 mg/ml). The petroleum extract, on the other hand, had a bactericide effect on *P. vulgaris* and *B. cereus* with a concentration of 12.5 mg/ml. However, it had a fungicide effect on *A. ochraceus* with a lowest concentration of 6.3 mg/ml.

The antioxidant activity was carried out using the DPPH method and the IC50 values of the methanol, ethanol and petroleum extracts were found to be 52.35±0.29; 30.52±0.26; 110±3.3µg/mL respectively. The amount of total phenol was examined using the Folin-Ciocaltaeu method and it was found that the ethanol extract had the highest amount of total phenol (291.33 mgGA/gr). Using the Aluminium Chloride (AlCl<sub>3</sub>) Kolorimetrik Method, it was determined that the methanol extract contained the highest concentration of flavonoid (26.7 mgCatachol/gr). By means of HPLC analysis, phenolic compounds were determined in the extracts of our plant and the results were discussed.

**Keywords:** *Salvia caespitosa*, antimicrobial activity, antioxidant activity

## İÇİNDEKİLER

Konu No	Konu	Sayfa
	ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
	ABSTRACT, KEY WORDS	iii
	İÇİNDEKİLER	iv
	ŞEKİL LİSTESİ	vi
	ÇİZELGE LİSTESİ	vii
	KISALTMA LİSTESİ	viii
	ÖNSÖZ	ix
<b>1</b>	<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1	Lamiaceae Familyası	1
1.1.1	Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri	1
1.2	<i>Salvia</i> L. Cinsi	2
1.2.1	<i>Salvia</i> L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri	2
1.2.2	<i>Salvia</i> Cinsine Ait Türlerde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar	3
1.2.3	<i>Salvia</i> Türlerinin Kullanım Alanları ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	5
1.3	<i>Salvia caespitosa</i> L.	8
1.3.1	Tür Özellikleri	8
1.3.2	Yayılış ve Habitat	9
1.3.3	<i>Salvia caespitosa</i> 'nın Sistematığı	9
1.3.4	<i>Salvia caespitosa</i> ile Yapılan Çalışmalar	10
<b>2</b>	<b>ARAÇLAR VE YÖNTEMLER</b>	<b>11</b>
2.1	Bitki Örneğinin Hazırlanışı	11
2.2	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı	12
2.3	Kullanılan Mikroorganizmalar	13
2.4	Kullanılan Besiyerleri	13
2.4.1	Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri	13
2.5	Serum Fizyolojik Hazırlanışı	15
2.6	İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı	15
2.7	Metabolizma İndikatörü Çözeltilisinin Hazırlanışı	15
2.8	Antimikrobiyal Aktivite	16
2.8.1	Disk Difüzyon Yöntemi	16
2.8.2	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu belirleme (MİK).	17
2.8.3	Minimum Bakterisit Konsantrasyonunu (MBK) ve Minimum Fungisit Konsantrasyonunu (MFK) Belirleme	18
2.9	Antioksidan Aktivite	18
2.9.1	DPPH Metodu	18
2.9.2	Total Fenol Miktar Tayini	19
2.9.2.1	Folin-Ciocaltaeu Yöntemi	19
2.9.3	Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	20

2.9.3.1	Alüminyum Klorür (AlCl <sub>3</sub> ) Kolorimetrik Methodu	20
2.10.	HPLC Analizi (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)	21
2.11	Kullanılan Cihazlar	22
<b>3</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>23</b>
3.1	Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	23
3.1.1	Disk Difüzyon Yöntemi Bulguları	23
3.1.2	MİK, MBK ve MFK Bulguları	25
3.2	Antioksidan Aktivite Bulguları	34
3.2.1	DPPH Yöntemi Bulguları	34
3.2.2	Total Fenol Yöntemi Bulguları	35
3.2.3	Total Flavonoid Yöntemi Bulguları	36
3.3	HPLC Bulguları	37
<b>4</b>	<b>SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>EKLER</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>48</b>

## ŞEKİL TABLOSU

Şekil No	Şekil	Sayfa
Şekil.1.1	<i>Salvia caespitosa</i>	9
Şekil 2.1	Dönerli buharlaştırıcı	12
Şekil 2.2	Bitkinin çeşitli çözücüler içerisinde bekletilmesi	14
Şekil 2.3	Dönerli buharlaştırıcı	15
Şekil 3.1	<i>Salvia caespitosa</i> metanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	27
Şekil 3.2	<i>Salvia caespitosa</i> petrol eteri ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	27
Şekil 3.3	<i>Salvia caespitosa</i> etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	28
Şekil 3.4	<i>Salvia caespitosa</i> 'nın metanol ve etanol ekstresinde MİK sonuçlarına ait fotoğraf	29
Şekil 3.5	<i>Salvia caespitosa</i> 'nın petrol eteri ekstresinde MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	29
Şekil 3.6	Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	30
Şekil 3.7	Etanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	30
Şekil 3.8	Petrol eteri ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	31
Şekil 3.9	Metanol ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	32
Şekil 3.10	Etanol ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	32
Şekil 3.11	Petrol eteri ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	33
Şekil 3.12	Gallik asit kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.13	Katakol kalibrasyon grafiği	36
Şekil A-1	Standart kromatogram	44
Şekil A-2	<i>Salvia caespitosa</i> metanol ekstresinin HPLC kromatogramı	45
Şekil A-3	<i>Salvia caespitosa</i> etanol ekstresinin HPLC kromatogramı	46
Şekil A-4	<i>Salvia caespitosa</i> petrol eteri ekstresinin HPLC kromatogramı	47



## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	<i>Salvia caespitosa</i> türüne ait bilgiler bitki türüne ait bilgiler	11
Çizelge 2.2	Ekstrasyon işlemine ait bilgiler	13
Çizelge 2.3	Antimikrobiyal aktivitede kullanılan besiyerleri	14
Çizelge 3.1	<i>Salvia caespitosa</i> metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları	23
Çizelge 3.2	<i>Salvia caespitosa</i> etanol ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları	24
Çizelge 3.3	<i>Salvia caespitosa</i> petrol eteri ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları	24
Çizelge 3.4	<i>Salvia caespitosa</i> metanol ekstresinin MİK, MBK/MFK değerleri	25
Çizelge 3.5	<i>Salvia caespitosa</i> etanol ekstresinin MİK, MBK/MFK değerleri	26
Çizelge 3.6	<i>Salvia caespitosa</i> petrol eter ekstresinin MİK, MBK/MFK değerleri	26
Çizelge 3.7	<i>Salvia caespitosa</i> metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının IC <sub>50</sub> değerleri	34
Çizelge 3.8	<i>Salvia caespitosa</i> bitki ekstralarının % inhibisyon değerleri	34
Çizelge 3.9	<i>Salvia caespitosa</i> bitki ekstralarının total fenol miktarları	35
Çizelge 3.10	<i>Salvia caespitosa</i> bitki ekstralarının total flavonoid miktarları	36
Çizelge 3.11	Metanol, etanol ve petrol eter ekstresinde bulunan fenolik maddeler	37

## KISALTMA LİSTESİ

<b>Kısaltma</b>	<b>Açılımı</b>
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimum Bakterisit Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungisit Konsantrasyonu
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge

## ÖNSÖZ

Araştırmamın başlanğıcından bitimine kadar her aşamada yakın ilgisini gördüğüm, çalışmalarım boyunca katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen bilgisiyle ışık tutan değerli danışman hocam Doç. Dr. Tülin AŞKUN' a, çalışmada kullanılan bitkilerin tür teşhislerini yapan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Gülendir TÜMEN ve Fatih SATIL' a, teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım ve analizler sırasında yardımlarını esirgemeyen, Esra SOLMAZ, Feyzullah TOKAY, Şeymanur MODANLIOĞLU, Yalçın ERGİN' e, bölümümde görev yapan ve desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda laboratuvarlarını kullandığım Araş. Gör. Sema ÇARIKÇI başta olmak üzere Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi(BÜTAM) çalışanlarına teşekkür ederim.

Antioksidan çalışmalarım da bana yardımcı olan hocamız Doç. Dr. Hüsniye SAĞLAM' a ve bu çalışma sırasında olanaklarından yararlandığımız Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' ne teşekkür ederim.

Sabrı, hoşgörüsü, yardımları ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim arkadaşım Didem KARAARSLAN' a, çok teşekkür ederim.

Beni yetiştirip bugünlere getiren çalışmalarımı her zaman içtenlikle destekleyen ve teşviklerini esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Lamiaceae Familyası

### 1.1.1. Lamiaceae Familyası' nın Genel Özellikleri

Çoğunlukla ot ve çalı formunda olup çok azı ağaç formunda, tek yıllık veya çok yıllık aromatik bitkilerdir [1].

Gövde kısmı ve dallarının genellikle dört köşeli olduğu görülür. Yaprak dizilişi sıklıkla karşılıklı, nadiren sarmal ve alternat, çiçek düzenlenmesi ise çoğunlukla birleşik, nadir olarak tek ya da aksiller şeklindedir. Çiçekleri, taşıyıcı yaprakların koltuğundan çıkan sık kümeler halindedir. Çanak yaprakları dilimli, taç yaprakları 5, fakat iki taç yaprağın (petal) birleşmesi ile 4 dilimli çoğunlukla 2 dudaklıdır. Üst dudak miğfer şeklinde 2 taç yapraktan, alt dudak ise loplu 3 taç yapraktan oluşur. Erkek organları, uzunlukları farklı iki çift meydana getirirler [1].

Oldukça geniş olan Lamiaceae familyası, dünyanın her tarafında bulunan, çoğunlukla Kuzey-batı Asya ve Akdeniz bölgesine yayılmış, yaklaşık 220 cinsi ve 3500 türü bünyesinde barındırır. Türkiye' de 38 cins, 400 türü yetişir ve bu türlerin 240' ı endemiktir [2]. Çiçeklerinin alt dudak ve üst dudak şeklinde birleşmesinden dolayı De Jussieu tarafından *Labiatae* olarak adlandırılmış ve 1836 yılında Lindley tarafından Lamiaceae olarak değiştirilmiştir [3].

Lamiaceae bitkileri özellikle terpenoit bileşikler yönünden zengindir, ayrıca flavonoitler, uçucu yağlar, az da olsa kinoit yapıda maddelerle bazen basit alkaloidleri de taşırlar. [4]

## 1.2. *Salvia L. cinsi*

### 1.2.1. *Salvia L. Cinsinin Morfolojik Özellikleri*

Otsu, yarı çalimsı veya çalimsı çok yıllık, nadiren 2 yıllık veya tek yıllık aromatik kokulu bitkilerdir. Gövde dik yada toprak üzerine yatık, salgılı, salgısız yada tüsüzdür. Yapraklar bölmesiz, lirat veya pinnatisektir.

Çiçek durumu kimoza, vertisilastrum (1-)2-10(-40) çiçekli, yakınlaşmış yada uzaklaşmıştır. Kaliks çan, huni veya tübümsü, iki dudaklı; üst dudak 3 dişli, dişler belirsiz veya belirgin; alt dudak 2 dişli. Meyvalı kaliks hafifçe veya belirgin bir şekilde genişlemiş ve zarımsıdır.

Korolla beyaz, sarı, pembe, mavi veya menekşe renklerde, 2 dudaklı, üst dudak düzden oraksıya doğru; alt dudak 3 loblu, genişlemiş konkav orta lob ve iki küçük yan loblu; korolla tüpü düz, kıvrık, içe göçmüş yada şişkin, halkalı yada değil; pulsu yada değildir.

Stamenler 2, kısa filamentli ve kısa yada çok uzamış konnektif taşıyan, üst ucu fertil tekali; alt ucu ya küçük fertil tekali yada subfertil tekali (A tipi stamen) yada çeşitli steril doku şekillerde (B tipi stamen); stamenler filament ve konnektifin eklem yerlerinden birleşir nadiren birleşmez (C tipi stamen); staminodlar (üstteki stamen çifti) her zaman mevcut ve küçüktür, yapısı bir kaldıracağı gibi iki kol şeklinde uzamıştır. Uzun kol ucunda verimli teka, kısa kol ucunda plak şekline dönüşmüş verimsiz teka yer alır. Stilus 2 loblu. Nutlet tüsüz, ovoid, trigonalden suborbikulara doğru, sıklıkla üzerinde musilaj bulunur [5].

### 1.2.2. *Salvia* Cinsine Ait Türlerde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar

*Salvia* türleri fitokimyasal analizlere göre fenolik asitler, fenolik glikozidler, flavonoidler, antosiyaninler, kumarinler, polisakkaritler, terpenoidler ve esansiyel yağları içermektedir [6].

Elazığ yöresinden toplanan iki *Salvia* türünün uçucu yağ analizlerinden, *S. ceratophylla*' da ana bileşen olarak germakren D (% 27.4), bisiklogermakren (%11.3) ve spathulenol (%10); *S. aethiopsis*'de ise alfa-kopaen (%21.1), beta-kubeben (%8.1), germakren D (%26.3), bisiklogermakren (%24.1) ve delta-kadinen (%5) tespit edilmiştir [7].

Adaçayında hasat zamanlarının ve biçim yüksekliklerinin uçucu yağ oranına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, taze herbadaki uçucu yağ oranının yazın yapılan hasatlarda baharda yapılan hasatlara göre daha yüksek olduğu ve dipten biçilen bitkilerin uçucu yağ oranlarının %0.40 - 0.59, yüksekten biçilen bitkilerin uçucu yağ oranlarının ise % 0.46 - 0.69 arasında değiştiği saptanmıştır [8].

Adaçayı yaprakları % 0.5-2.5 oranında uçucu yağ taşımaktadır. Kodekslerde uçucu yağ oranının en az % 1.5 olması istenmektedir [9]. Tıbbi olarak kabul edilen yağda  $\alpha$ ,  $\beta$  thujon, 1,8 cineol, campher, borneol, bornylacetat bulunmaktadır. Bazı uçucu yağların timol ve karvakrol da taşıdığı bildirilmektedir [10]. Uçucu yağında thujon oranı % 30-50, cineol oranı % 15, borneol oranı % 10 olarak belirtilmektedir [11].

Adaçayı, üzerinde önemle durulan antioksidan etkiye sahip bir aromatik bitkidir. Biberiyede olduğu gibi, yapısındaki en önemli fenolik bileşikler karnosol, karnosik asit, rosmadial, rosmanol, epirosmanol ve metil karnosattır [12].

Adana ekolojik koşullarında yetiştirilen tıbbi adaçaylarının yapraklarında ortalama % 1.69, çiçeklerinde % 0.50 ve saplarında % 0.11 oranında, Pozantı koşullarında ise yapraklarda ortalama % 1.49, çiçeklerde % 0.58 ve saplarda % 0.13 oranında uçucu yağ bulunduğu kaydedilmiştir [13].

Karaaslan [14] tarafından yapılan bir çalışmada artan azot dozları (0, 5, 10 ve 15 kg/da) *S. Officinalis* L.'nin kuru yapraklarında uçucu yağ oranı % 1.05, % 1.21, % 1.27, % 1.45 olarak arttırdığı tespit edilmiş ve en yüksek uçucu yağ oranı 15 kg/da azot dozu uygulamasından elde edilmiştir [15].

*S. multicaulis*'in ekstraktlarından izole edilen bileşenlerin çoğunun, diterpenoid [16], noditerpenoid [17] ve triterpenoid [16] olduğu rapor edilmiştir. *S. multicaulis*'in uçucu yağ analizlerinin sonuçları, çiçekli gövdelerden elde edilen yağ analizlerinde major bileşen olarak bornil asetat, trans - karyofillen ve alfa - pinen, çiçek ve yapraklardan elde edilen uçucu yağlarda, beta - pinen (%26), 1.8 - sineol ve limonen (% 20) ve kamfor (% 19) temel bileşenler olarak tespit edilmiştir [15,19].

Gören ve arkadaşları (2006) *Salvia syriaca*, *Salvia potentilli - folia*, *Salvia candidissima* ssp. *occidentalis*, *Salvia macrochlamys*, *Salvia poculata*, *Salvia tomentosa*, *Salvia recognita*, *Salvia virgata* ve *Salvia ceratophylla* türlerinin tohum yağ asitlerine dayanarak türlerin kemotaksonomik yönden değerlendirmesini yapmışlardır. Tohum yağ asitlerinin genelde linolik, linolenik, oleik, palmitik ve stearik asit bakımından zengin olduğunu bulmuşlardır [18].

Catsiotis ve Iconomou (1984) tarafından yapılan bir çalışmada Yunanistan'ın farklı bölgelerinden toplanan *Salvia fruticosa* Mill. kurutulmuş yapraklarının uçucu yağ miktarının % 1.1 ile % 2.8 arasında olduğu saptanmıştır [20].

*Salvia verticillata* antikolinesteraz ve antioksidan etkinliği olduğu daha önceden bildirilmiş olup çeşitli polifenoller, uçucu yağlar ve diterpenoidler içerdiği bilinmektedir [21].

Ulubelen [22] yaptığı çalışmalarda adaçayının antioksidan aktivitesi üzerine yapılan araştırmalarda adaçayında bulunmakta olan karnosik asit, rosmarinik asit ve türevlerinin güçlü bir antioksidan olduğunu [23,24], ayrıca adaçayından elde edilen esansiyel yağların ve ekstraktların da antioksidan özellik gösterdiği [25,26] bildirilmektedir.

### 1.2.3. *Salvia* Türlerinin Kullanışları ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Lamiaceae familyası üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmakoloji ve parfümeri sanayiinde de önemlidir. Bunlardan eterik yağ elde edilir, baharat olarak kullanılır [27]. *Salvia* cinsi Lamiaceae familyasının en zengin salgı tüyüne sahip olan cinsidir [28].

Ülkemizde yüzyıllardır bitki çayı olarak tüketilen çeşitli *Salvia* türlerinden elde edilen uçucu yağların ve ekstraktların antimikrobiyal, antioksidan, antihipertensif, antidiabetik ve antitümör özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir [29,30].

Adaçayı uzun yıllardan beri karminatif, yatıştırıcı, midevi, diüretik, ter kesici, ağrı giderici ve dezenfektan etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Günümüzde ağız yıkama ve gargara preparatlarının imalinde, saç kuvvetlendirici şampuanların yapımında, deodorantlarda, saç boyası ve cilt kremi yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca adaçayının ıhlamurla birlikte hazırlanan infüzyonu öksürük kesici olarak kullanıldığı gibi, baharat olarak da özellikle etli yemeklere ve çorbalara katılmaktadır [31,32].

Türkiye’ de bulunan beş endemik *Salvia* türü ile yapılan bir çalışmada *S. verticillata* subsp. *amasiaca*, *S. aucheri* subsp. *aucheri* ve *S. tomentosa* antimikobakteriyel aktivite gösterirken, *S. aramiensis* ve *S. fruticosa*’ nın aktivite göstermediği bulunmuştur [33].

Adaçayı çok eski çağlardan beri ünlü bir şifalı bitki olarak bilinmektedir. Adaçayı, ilaç bitkisi olarak kullanılan bitkilerin arasında en uzun tarihe sahip olan bitkilerden birisidir. Adaçayı bitkisinin yaklaşık olarak 900 türü vardır ve birçok adaçayı türü kozmetikte, parfümeride, ilaç endüstrisinde ve bunların yanında bitkisel çay ve yiyeceklerde kullanılmaktadır [34].

Çoğu *Salvia* türü ve bu türlerin esansiyel yağları ya da ekstraktları gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Salvia* türleri genel olarak



antibakteriyel, karminatif, diüretik, hemostatik ve spazmolitik aktivitelere sahip olup, tüm dünyada bitkisel çay olarak tüketilmektedir [6].

Anadolu'da çoğu adaçayı türünden ham yaprak olarak başta çay ve baharat olarak yararlanılırken, *Salvia fruticosa* türünden sineol içeriği zengin elma yağı adı verilen bir yağ elde edilir. *S. fruticosa* Mill.; gaz söktürücü, ter kesici ve idrar arttırıcı olarak, haricen yara iyileştirici, antiseptik olarak kullanılır [35]. Bununla birlikte antimikrobiyal, antihipertensif, kan şekeri düşürücü ve spazmolitik etkilerinden dolayı da önemlidir [36,37].

*Salvia* türleri gerek tıbbi gerekse ekonomik önem taşır ve doğal yayılışları ile tür sayısı bakımından ülkemizde zengin bir potansiyele sahiptir [38,39]. *Salvia* türleri tıbbi değer taşımalarının yanı sıra güzel görünümlü çiçekleri nedeniyle bahçe ve parklarda dekoratif süs bitkileri olarak yetiştirilmektedirler [40].

Birçok *Salvia* türünün uçucu yağları; gıda, ilaç, kozmetik ve parfümeri endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar. Bu bitkilerin, dünyanın pek çok bölgesinde insanlar tarafından tat, koku ve tıbbi amaçla kullanıldığı çok iyi bilinmektedir [41-43]. *S. syriaca*'nın hayvanları tedavi etmede kullanıldığı bildirilmiştir [44]. Bu cins üyelerinin gıda, eczacılık ve kozmetik amaçlı kullanıldığı not edilmiştir [45-48].

*Salvia wiedemannii* bitkisinin kurutulmuş dal ve yaprakları, ökaliptol, cineol ve alfapinen içermektedir [49-51]. Cineol iltihabi olayların tedavisinde anestezik ve antiseptik olup kronik bronşit olaylarında balgam söktürmeyi kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Alfa-pinen ve ökaliptol ise antiseptik, antibakteriyel, diüretik ve spazmolitik amaçla tedavide kullanılmaktadır [50]. Diğer taraftan bu maddelerden, oda sprelerinde, losyonlarda ve çeşitli kozmetik preparatlarında katkı maddesi olarak yararlanılmaktadır [52].

Adaçayı geçen yıllarda fenolik antioksidanlara sahip olması nedeniyle birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda adaçayı bitkisinin, güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda adaçayı, sahip olduğu esansiyel yağ ve antioksidan bileşenler açısından ekonomik olarak da

araştırma konusu olmuştur. Yiyecekler ve bazı doğal gıdaları koruyarak ve bozunmalarını önleyerek raf ömrünü uzatmak için, adaçayı antioksidanları, bu konuda oldukça iyi bilinen biberiye antioksidanlarına alternatif oluşturmuştur [53].

Adaçayı ekstraktlarının daha önce yapılmış olan çalışmalarda birçok fenolik bileşene sahip olduğu açıklanmıştır. Antioksidan özelliği esas olarak, karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asite bağlanmaktadır. Adaçayı ekstraktı aynı zamanda, toplam antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğu düşünölen flavonoid ve diğer fenolik bileşenleri içermektedir. Adaçayı ekstraktının ticari olarak kalitesi bu fenolik bileşen içeriğine bağlıdır [53].

Adaçayı ile ilgili yapılan birçok çalışmada, adaçayı bitkisinin sahip olduğu bileşenlerin sağlığı korumaya faydalı olduğu için çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta oldukça yaygın olarak kullanıldığı görölmüştür. Beyin fonksiyonlarının ölmesi, kanser, kalp rahatsızlıkları ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ile ilgili durumlarda uygulanması artmıştır. Bu rahatsızlıkların oluşum sebebi, serbest radikallerin sebep olduğu hücre bozulması olabilir ve insanların bu antioksidanları kullanmaları birçok hastalığı önlemede önemli rol oynayabilmektedir [54].

Türkiye sahip olduğu iklim klima zenginliği nedeniyle pek çok tıbbi ve aromatik bitkinin yetiştirilmesine elverişlidir. *Salvia fruticosa* Mill. Türkiye koşullarında doğadan toplanarak ihraç edilmekte ve herbasından diğer adaçayı türlerine göre daha fazla uçucu yağ elde edilmektedir [55, 56]

*Salvia officinalis* L., nezle ve gripten ileri gelen boğaz rahatsızlıklarında, böbrek hastalıklarında çay olarak tüketilmektedir. Yağı dıştan antiseptik, fungusit etkiye sahip olduğundan boğaz ve solunum yolları iltihaplarında kullanılmaktadır [10]. Yatıştırıcı, midevi, idrar söktürücü, ter kesici ve dezenfektan etkileri de bulunmaktadır [57]. *Salvia officinalis* türünün uçucu yağında çok bulunan thujon, antiseptik ve antibiyotik etkisi çok güçlü olan bir uçucu yağ bileşenidir. Bu nedenle özellikle thujon zengini uçucu yağlar boğaz enfeksiyonları, diş iltihaplanmaları ve

ağız yaraları için yapılan ilaçların katkı maddesidir [35]. Fakat Thujon (salvion) toksik ve kanserojen olduğundan fazla dozda alınmaması önerilmektedir [10].

Ekolojik koşullarda yürütülen bir çalışmada, *Salvia fruticosa* Mill.' in özellikle azotlu gübrelemeye karşı olumlu reaksiyon gösterdiği ve özellikle verimin gübre ile birlikte arttığı saptanmıştır [56].

*Salvia verticillata* Avrupa-Asya kıtalarında bulunmaktadır. Yetiştirildiği bölgelerde alternatif tedavi amacıyla halk arasında kullanılmaktadır [58].

Ulubelen kendi araştırma ekiplerince Türkiye'de yetisen 40 *Salvia* türünün araştırıldığını ve bu türlerin antibakteriyel, antitümör ve antitüberküloz bileşiklerinin ayrıldığını rapor etmiştir [22].

### **1.3 *Salvia caespitosa* L.**

#### **1.3.1 Tür Özellikleri**

Çok yıllık, bodur, yarıçalımsı yaklaşık 60 cm çapında sık gövdeli, gövde toprak üzerine yatıktan hemen hemen dike doğru, altları salgısız pubescent tüylü, üste doğru pubescentten villoza, bazen kapitat salgı tüyü içerir.

Yapraklar pinnatisek, anahattaki segment obovat, krenat, terminal segmentler hemen hemen lanseolat, 0.6-2 x 0.1-0.6 cm. Petiyol 0.5-2 cm, sıklıkla uzun-silli. Rasemler yoğunlaşmış, hemen hemen yaprak seviyesini aşmıştır. Vertisillatlar 2-6 çiçekli, yakınlaşmış. brakteler ovat, akuminat, 11-12 x 5-8 mm; brakteoller mevcuttur.

Pediseller 3-6 mm. Kaliks çan şeklinde, sıklıkla morumsu, 10-14 mm; meyvede 15 mm' ye kadar, tüy örtüsü piloz/villoz' dan yoğun kapitat salgı tüye kadar. Korolla menekşe-maviden leylak-pembemsi (nadiren beyaz) renklere kadar,

18-30 mm, tp düz, 11-20 mm halkalı. A tipi stamenlidir. Nutlet dairesel, trigonal yada hemen hemen sferik, 2.7 x 2.5 mm' dir [5].



Şekil 1.1. *Salvia caespitosa*

### 1.3.2 Yayılış Ve Habitat

1400-2400 metre arası yükseltilerde, Sivas, Kayseri, Maraő, Adana, Erzincan, Malatya, Antalya, Niğde illerinde yayılış gösterir.

Kayalık, kireçtaőlı ve volkanik yamaçlar gibi habitatlarda yetişir [5].

### 1.3.3. *Salvia caespitosa*' nın Sistematiği

**Kingdom** : Plantae

**Subkingdom** : Tracheobionta

**Division** : Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal

**Class** : Magnoliopsida Brongn.

**Subclass** : Asteridae Takht.

**Order** : Lamiales Bromhead

**Family** : Lamiaceae Martynov

**Genus** : *Salvia* L.

**Species** : *Salvia caespitosa* Montbr. & Auch.

#### 1.3.4. *Salvia caespitosa* ile Yapılan Çalışmalar

Demirci ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada endemik altı *Salvia* türünün uçucu yağ bileşenlerine bakılmıştır. *S. caespitosa* türünün uçucu yağında rastlanan en yüksek bileşik caryophyllene oxide olarak belirlenmiştir [60].

Kılıç ve arkadaşları Kayseri' den toplanan *S. caespitosa* türü ile endemik beş *Salvia* türünün tohumlarının yağ asiti kompozisyonlarındaki benzerlikleri kemotaksonomik olarak incelemişlerdir [61].

*Salvia caespitosa* türünden dört tane bilinen diterpenle beraber bir tane yeni 6 $\beta$  -hydroxyisopimaric acid bulunmuş diğer yandan beş tane bilinen triterpen yanında bir tane yeni triterpen 3-acetylvergatic acid bulunmuş ve iki steroid ve bir flavon izole edilmiştir. Diğer taraftan yeni diterpen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* üzerinde güçlü aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [62].

## 2. ARAÇLAR VE YÖNTEMLER

### 2.1 Bitki Örneğinin Hazırlanışı

Antalya-Burdur arası yol kenarından 2008 yılında toplanan *Salvia caespitosa* bitkisi oda koşullarında ışık almayan ortamda 25 - 30 gün bekletilerek kurutuldu. Bitki türünün identifikasyonu Prof. Dr. Gülendam TÜMEN ve Doç. Dr. Fatih SATIL tarafından yapıldı. Bitkimiz Balıkesir Üniversitesi Biyoloji bölümü herbaryumunda bulunmaktadır. Çizelge 2.1’ de bitkinin toplandığı yer, zaman, yükseklik bilgileri ve herbaryum numarası verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Salvia caespitosa* türüne ait bilgiler

Bitkinin adı	Toplandığı yer	Tarih	Herbaryum numarası	Yükseklik (m)
<i>Salvia caespitosa</i>	Antalya-Burdur arası yol kenarı	01.06. 2008	FS1460	1800 m

## 2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Bitki iyice kurutulduktan sonra belli bir miktar tartılarak yaklaşık 15 - 20 gün boyunca çözücü içerisinde bekletildi. Bekleme sürecinin ardından vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı kullanılarak ekstre alım işlemi gerçekleştirildi.

Cihazın sıcaklığı bütün çözücülerin kaynama noktası sıcaklığına bağlı olarak farklı derecelere ayarlandı. Çizelge 2.2' de, kullanılan bitki, çözücü ve cihazın sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi bilgileri verildi. Elde edilen ekstrede kalan çözücünün uzaklaştırılarak konsantre hale gelmesini sağlamak için karanlıkta ve oda sıcaklığında 4 - 5 gün boyunca bekletildi.

Konsantre hale gelmiş ekstrede 0.5 gr tartılarak 5 mL % 5' lik DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözüldü. Bu stoktan 2 mL alınıp 0.22 µL' lik membran filtreden geçirilerek steril stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok çözelti hemen ya da daha sonra kullanılmak üzere -20°C' de buzdolabında saklandı.



Şekil 2.1 Dönerli Buharlaştırıcı

**Çizelge 2.2** Ekstraksiyon işlemine ait bilgiler

Çözücü	Bitki miktarı (gr)	Çözücü miktarı (mL)	Sıcaklık (°C )	Ekstraksiyon süresi (saat)
Petrol eteri	100	750	40	4
Metanol	120	1000	40	4
Etanol	140	1000	40	7

### 2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamızda *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) ve *Bacillus cereus* (CCM 99) bakterileri kullanıldı.

Antifungal aktivitede kullanılan filamentli funguslar *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534) ve *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) dur ve aynı zamanda *Candida albicans* (ATCC 10239) mayası da antifungal aktivitede kullanıldı.

### 2.4 Kullanılan Besiyerleri

#### 2.4.1 Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Ticari olarak satın alınan hazır toz besiyerlerinden tartım alınarak distile suda çözüldükten sonra manyetik ısıtıcıda berraklaşınca kadar beklendi.



Besiyeri hazırlarken 200 ml distile su için Nutrient Agar (5.6 gr), Nutrient Broth (1.6 gr), Sabouraud Dekstroz Agar (9.4 gr), Sabouraud Dekstroz Broth (6 gr), Patates Dekstroz Agar (7.8 gr), Malt Agar (9.6 gr) olmak üzere tartıldı.

Agar içeren besiyerleri ısıtılarak agarı tamamen eritildi. Petri ve tüpte olmak üzere 2 şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri 15 dk 121 °C’ de otoklavda sterilizasyon edildikten sonra bek alevi yanında petrilere 15 - 20 mL olacak şekilde döküldü. Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise agarı tamamen eritilen besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanarak 15 dk 121 °C’ de steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak bırakılarak donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere +4 °C’ de buzdolabında saklandı.

Broth besiyerleri de manyetik ısıtıcıda karıştırılarak hazırlandıktan sonra 15 dk 121 °C’ de steril edilerek tüplere paylaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere +4 °C’ de buzdolabında saklandı.

**Çizelge 2.3** Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	Marka	pH	Kullandığımız alan
<b>Nutrient broth</b>	Difco	6.8±0.2	Antibakteriyel aktivitede mikropılaka yöntemi ile MİK belirleme
<b>Nutrient agar</b>	Fluka	6.8±0.2	Antibakteriyel aktivitede MBK değeri belirleme ve disk difüzyon yöntemi ve yatık agar kültüre alma işlemi
<b>Sabouraud dekstroz broth</b>	Merck	5.6±0.2	Antifungal aktivitede mikropılaka yöntemi ile MİK belirleme
<b>Sabouraud dektroz agar</b>	Merck	5.6±0.2	Antifungal aktivitede MFK belirleme ve disk difüzyon yöntemi
<b>Malt ekstrakt agar</b>	Merck	7.6±0.2	Antifungal aktivitede yatık agarda küflerin kültüre alınması
<b>Patates dekstroz agar</b>	Merck	5.6±0.27	Antifungal aktivite’ de MFK belirleme ve disk difüzyon yöntemi

## **2.5 Serum Fizyolojik Hazırlanışı**

0.9 gr NaCl, 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. Daha sonra falcon tüplerine paylaştırılarak 20 dk 121 °C’ de steril edildi. İnokulum süspansiyonunun hazırlanışı işleminde kullanıldı.

## **2.6 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı**

Antibakteriyel aktivitede bakteri süspansiyonları serum fizyolojik ile MacFarland 0.5 standardına göre hazırlandı. Aynı zamanda spektrofotometre ile 600 nm’ de 0.5 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi. Fungus süspansiyonu mL de  $10^5$  koloni oluşturan birim (KOB) olacak şekilde hazırlandı ve 450 nm’ de 0.6 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi.

## **2.7 Metabolizma İndikatörü Çözeltilisinin Hazırlanışı**

Bakteri üremesini kontrol amaçlı olarak Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet (INT); 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür metabolizma indikatörü kullanıldı. 0,04 gr Ledanitrotetrazolum violet tartılarak 10 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. +4 °C’ de ışık almayan ortamda saklandı.

## 2.8 Antimikrobiyal Aktivite

### 2.8.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem ekstrenin mikroorganizma üzerinde kalitatif olarak etkili olup olmadığını bulmak amacıyla uygulandı.

İnokulum süspansiyonu 24 - 48 saatlik taze bakteri kültürlerinden hazırlandıktan sonra Nutrient Agar besiyeri bulunan petri plakları üzerine 100 µl süspansiyon, eküvyon çubuk ile yardımıyla yayıldı. Petri üzerine steril diskler yerleştirilip, disklere 15µl 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında bitki ekstresi emdirildi. Bu şekilde hazırlanmış petri plakları 37°C' de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu.

İnokulum 7-14 günlük taze fungus kültürleri kullanılarak hazırlandı. Aynı bakterilerde olduğu gibi inokulum Sabouraud Dekstroz Agar içeren petri plaklarına eküvyon çubuk yardımıyla yayıldı. Üzerine 15µl ekstre emdirilmiş diskler yerleştirildikten sonra 72 - 96 saat inkübasyona tabi tutuldu.

Kontrol grubu olarak bakteriler için sulphamethoxazole trimethoprim ve küfler için amphotericin B antibiyotiklerini içeren diskler kullanıldı. Disk çevresinde bakteri veya küf üremesininin olmadığı bölge inhibisyon zonu olarak adlandırılır. İnkübasyon sonrasında disk çapıda dahil olmak üzere zon çapı ölçülerek mm cinsinden sonuçlar verildi [63].

### 2.8.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)

Bakteriler ve maya, yatık Nutrient agarda 24 saat 37 °C' de funguslar ise yatık Malt agarda 72 - 96 saat 28 °C' de inkübasyona tabii tutularak yetiştirildiler.

Yirmidört saatlik taze kültürlerle inokulum süspansiyonu hazırlandı ve her bir mikroorganizma için well-plate üzerinde üç seri olarak çalışıldı. Küfler için Sabouraud Dekstroz Broth, bakteriler için Nutrient Broth kullanıldı.

İlk kuyucuğa 175 µl besiyeri, diğer kuyucuklara 100 µl besiyeri konuldu. Daha sonra ilk kuyucuğa 25 µl ekstre konuldu ve altıncı kuyucuğa kadar bir önceki kuyucukta 100 µl ekstre çözeltisi alınarak seri şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işlemi bittiğinde kuyucuklardaki son ekstre konsantrasyonu 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 ve 0.4 mg/mL' lik olacak şekilde hazırlandı.

Seyreltme işleminden sonra negatif kontrol hariç bütün kuyucuklara 10 µl inokulum süspansiyonu aşılandı. İçerisinde bitki ekstresi, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96' lık well-plate'ler, bakteriler için 37 °C' de 24 saat, funguslar için 28 °C' de 72 - 96 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresinden sonra, üremenin gerçekleştiği konsantrasyondan yüksek olan bir önceki konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu (MİK) değeri olarak alındı [63,64].

Bakterilerde MİK değerini saptamada Ledanitrotetrazolium violet metabolizma indikatörü olarak kullanıldı. Bu amaçla well-plate çukurlarına 15 µL Ledanitrotetrazolium violet çözeltisi konuldu ve 3 - 4 saat etüvde 37 °C' de bekletildi. Bekleme sonrasında üremenin olduğu çukurcuklar pembe renge boyandı. Boyanmanın görüldüğü ilk çukurcuktan bir önceki çukurcukta bulunan ekstre konsantrasyonu MİK değeri olarak alındı. Böylece minimum inhibisyon konsantrasyonu tespit edildi.

### **2.8.3 Minimum Bakterisit Konsantrasyonunu (MBK) ve Minimum Fungisit Konsantrasyonunu (MFK) Belirleme**

MİK değeri mikroorganizmaların statik aktivitesini yani mikroorganizmaların üremesini durduran konsantrasyon değerini belirtirken, bakterisit ve fungusit terimleri mikroorganizmaları öldüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilir.

Bu yöntemde üremenin olmadığı well-plate çukurcuklarından 20 µl alınarak küfler için Sabouraud Dekstroz Agar içeren petri plakların üzerine, bakteriler için Nutrient Agar üzerine ekim yapıldı. Yukarıda belirtilen koşullarda inkübasyona tabi tutulduktan sonra üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri bakterilerde Minimum Bakterisit Konsantrasyonunu (MBK) değeri ve funguslarda Minimum Fungisit Konsantrasyonunu (MFK) değeri olarak bulundu [63].

## **2.9 Antioksidan aktivite**

### **2.9.1 DPPH Metodu**

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) çözeltisinin ekstreye karışmasından sonra düşen absorbans değeri, ekstrenin antioksidan aktivitesinin olduğunu gösterir.

Belirlediğimiz IC<sub>50</sub> (inhibisyon konsantrasyonu) değeri, DPPH çözeltisinin absorbansını % 50 düşüren konsantrasyon değeridir. Ekstre örneğinden (0.003 gr) tartılıp 3 mL metanolde çözülerek 1000 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi.

Bu stok çözülden 25, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarında standart dilüsyonları hazırlandı. DPPH çözeltisi ( $1,5 \times 10^{-5} M$ ), 0.0006 gr 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil'in 10 mL metanolde çözülmesiyle hazırlandı.

*Salvia caespitosa* bitki türünün etanol, metanol ve petroleteri ekstrelerinden hazırlanmış dilüsyonlardan 1.5 mL alınıp 0.5 mL DPPH çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımlar 30 dakika karanlık bir odada inkübasyona tabi tutulduktan sonra 517 nm’de absorbans değerleri UV - Vis spektrofotometre ile metanole karşı okundu.

Kontrol grubu olarak DPPH çözeltisi kullanıldı [65]. % inhibisyon değeri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ DPPH İNHİBİSYON DEĞERİ} = [CA - EA] / CA \times 100$$

CA: Kontrol absorbansı

EA: Ekstrenin absorbansı

## 2.9.2 Total Fenol Miktar Tayini

### 2.9.2.1 Folin-Ciocaltaeu Yöntemi

**Ekstrelerin hazırlanışı:** Total fenol yönteminde kullanılmak üzere bitki ekstrelerinden 0.01 gr tartılarak 2 mL saf su içerisinde çözüldü (5mg/mL). Bu stok çözeltiden 1 mg/mL’ lik dilüsyonu hazırlandı.

**Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanışı:** 2 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (%2’ lik) tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü.

**Gallik asit çözeltilerinin hazırlanışı:** 0.25 gr gallik asit % 10’ luk 10 mL etanol içerisinde çözüldü. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak üzere 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/mL’ lik konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlandı.

**Ölçüm işlemi:** 20 µL bitki ekstresi veya gallik asit, 1.58 mL distile su ve 100 µL Folin-Ciocaltaeu çözeltisi ile karıştırıldı ve 2 dk sonunda 300 µL sodyum karbonat çözeltisinden konulup 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Bekletildikten sonra 765 nm’ de absorbans değerleri ölçüldü ve total fenol miktarları eşdeğer gallik asit miktarı olarak verildi [66].

### **2.9.3 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi**

#### **2.9.3.1 Alüminyum Klorür( $AlCl_3$ ) Kolorimetrik Metodu**

Bu metod da referans flavonoid olarak katekol kullanıldı.

**Katekol çözeltilerinin hazırlanışı:** 0.0125 gr katekol 25 mL % 80 etil alkolde çözümlenerek 500 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltilerden kalibrasyon eğrisi oluşturulmak üzere 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/mL’lik dilüsyonları hazırlandı.

**Bitki ekstraktlarının hazırlanışı:** Metanol, etanol ve petrol eteri ekstraktlarının her birinden 0.025 gr tartılarak 10 mL % 80 etil alkolde çözüldü. 2500 mg/mL’ lik konsantrasyonda olan stok çözeltilerden 1250 mg/mL ve 500 mg/mL konsantrasyon değerinde seyreltmeler hazırlandı.

500 µL ekstre ve katekol çözeltisi, 2 mL distile su ve 150 µL % 5’ lik  $NaNO_3$  ile iyice karıştırıldı. 5 dakika bekledikten sonra karışım içerisine 150 µL % 10’luk  $AlCl_3$  eklendi. Altıncı dakikada 1 mL 1M NaOH eklendikten sonra 1.2 mL su ile çözelti 5 mL’ ye tamamlandı ve 510 nm’ de UV-Vis spektrofotometre ile ölçüm alındı. Kör çözelti içerisine ekstre yada referans çözelti yerine aynı miktarda distile su konuldu. Sonuçlar eşdeğer katekol miktarı olarak verildi [67].

## 2.10 HPLC Analizi (YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ)

HPLC; yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak ifade edilir. Kolon kromatografisi çeşitlerinden bir tanesidir. Sıklıkla biyokimya ve analitik kimya alanlarında ayırma, tanımlama ve bileşenlerin miktarını belirleme gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Kolon kromatografisi durgun faz yani paketlenmiş materyal, çözügen olarak ifade edilen hareketli faz, hareketli fazı kolona taşıyan pompa ve moleküllerin tutulma zamanını gösteren dedektör kısımlarından oluşur. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşenlerini tayin etme amaçlı bu yöntem kullanılır.

Bu çalışma için Shimadzu marka HPLC cihazı kullanıldı. Cihaz ile ilgili özellikler aşağıda verilmiştir.

Dedektör: DAD dedektör ( $\lambda_{\max}=278$ )

Auto sampler: SIL-10AD vp

System controller: SCL-10Avp

Pump: LC-10ADvp

Degasser: DGU- 14A

Column oven: CTO-10Avp

Kolon : Agilent Eclipse XDB-C18 (250x4,60 mm) 5 mikron

Mobil faz : A: %3 asetik asit, B: Metanol

Akış hızı : 0.8 mL / dakika

Kolon sıcaklığı : 30 °C

Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre



Numunelerden 10 mg tartılıp 1 mL metanolde çözülerek 20 µL HPLC'ye enjekte edildi.

Pumps	CTO-10Avp	SCL-10Avp	Status Log	Time Program		
#	Time	Module	Event	Value	Comment	
1	3.00	Pumps	B.Conc	7		
2	20.00	Pumps	B.Conc	28		
3	28.00	Pumps	B.Conc	25		
4	35.00	Pumps	B.Conc	30		
5	45.00	Pumps	B.Conc	33		
6	60.00	Pumps	B.Conc	33		
7	62.00	Pumps	B.Conc	42		
8	70.00	Pumps	B.Conc	50		
9	75.00	Pumps	B.Conc	80		
10	80.00	Pumps	B.Conc	100		
11						

## 2.11 Kullanılan Cihazlar

Ekstrelerin antibakteriyel çalışmaları kapsamında Bilser marka W-lamp hepafiltreli laminaflow kullanıldı. Antioksidan çalışmalar sırasında UVWIN 5.0 UV-VIS spektrofotometre ve kuartz küvetler kullanıldı. Bakterilerin uygun sıcaklıklarda inkübasyonu için Elektro-Mag marka etüv kullanıldı. Çeşitli ekstrelerin ve yıkanan malzemelerin kurutulması amaçlı KD 280 Nüve marka kurutma dolabı kullanıldı. Çözeltilerin ve inokulumların homojen karışmasında Elektro-Mag marka vortex kullanıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

##### 3.1.1 Disk Difüzyon Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde 6 mm çapa sahip diskler kullanıldı. Bakteriler için kontrol grubu olarak sulphamethoxazole trimethoprim antibiyotiği içeren diskler kullanılırken, küfler için amphotericin B antibiyotiği kullanıldı. 100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında olan bitki ekstraktları disklere emdirilerek bakteri ve çeşitli küflere karşı denendi. İnkübasyon süresinden sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar metanol ekstresi için çizelge 3.1' de, etanol ekstresi için çizelge 3.2'de, petrol eteri ekstresi için 3.3' te mm cinsinden verildi.

**Çizelge 3.1** *Salvia caespitosa* metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Salvia caespitosa</i> metanol ekstresi	Disk difüzyon zon çapları (mm)		
	1.5mg/disk	0.75mg/disk	Standart (25µg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	8.25±0.95	5.25±0.5	42.5±2.08
<i>Bacillus cereus</i>	11.5±1.73	8.25±0.95	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11±0.81	6.5±1.91	44.25±0.95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.5±1.29	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	10.25±1.25	-	33±2.94
<i>Escherichia coli</i>	-	-	38.5±2.16
<i>Candida albicans</i>	7.25±0.95	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	7.25±0.95	6.25±0.5	12.5±0.57
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	20.25±2.06
<i>Aspergillus flavus</i>	6.5±0.57	-	15.5±0.57
<i>Fusarium proliferatum</i>	8.5±0.57	-	11±0.81

**Çizelge 3.2** *Salvia caespitosa* etanol ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Salvia caespitosa</i> etanol ekstresi	Disk difüzyon zon çapları (mm)		
	1.5mg/disk	0.75mg/disk	Standart (25µg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	9.25±2.06	8±0.81	43.5±1.29
<i>Bacillus cereus</i>	11.25±0.95	10±0.81	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.75±0.95	7.25±1.25	45.25±0.95
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	8±0.81	6.5±0.57	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	8.5±1.29	-	33.75±2.62
<i>Esherichia coli</i>	9.25±0.5	6.75±0.95	37.25±1.25
<i>Candida albicans</i>	10.25±0.5	6.75±0.95	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	9±0.81	7.75±0.5	11.5±1.29
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	16.5±0.57
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	15±0.81
<i>Fusarium proliferatum</i>	7.75±0.5	-	7.75±0.5

**Çizelge 3.3** *Salvia caespitosa* petrol eteri ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Salvia caespitosa</i> petrol eteri ekstresi	Disk difüzyon zon çapları(mm)		
	1.5mg/disk	0.75mg/disk	Standart (25µg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	7.75±0.5	7±0.81	45.75±2.62
<i>Bacillus cereus</i>	11±0.81	9±1.41	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5±1.29	7±0.81	31.75±1.70
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	9.5±0.57	6.5±0.57	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	9.25±0.5	8±0.81	33.25±2.75
<i>Esherichia coli</i>	7±0.81	6.5±0.57	30.25±0.5
<i>Candida albicans</i>	8.5±1.29	6.5±0.57	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	7.25±0.5	-	8.5±0.57
<i>Aspergillus niger</i>	8.75±1.25	-	21±1.63
<i>Aspergillus flavus</i>	9±0.81	6.5±0.57	15.75±0.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	10.5±1.29	6.75±0.95	12±0.81

### 3.1.2 MİK ve MBK/MFK Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri olarak ifade edilen MİK, bitki metanol, etanol ve petrol eteri ekstraktlarının, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden konsantrasyon değeri olarak, MBK ve MFK değerleri ise bakterisit ve fungusit konsantrasyon değeri olarak mg/mL cinsinden sırasıyla çizelge 3.4; 3.5 ve 3.6'da verildi.

**Çizelge 3.4** *Salvia caespitosa* bitkisinin metanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri

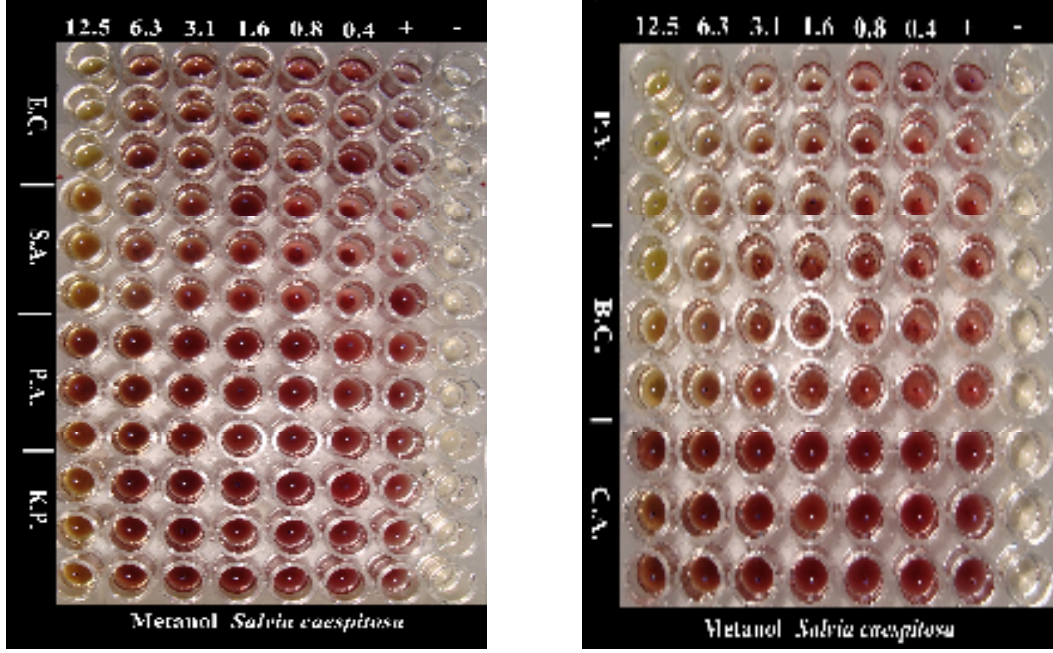
<i>Salvia caespitosa</i>	Metanol	
	MİK(mg/mL)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	12.5	12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	>12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	12.5	>12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>12.5	>12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	>12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus niger</i>	12.5	12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	12.5	12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	6.3	6.3

**Çizelge 3.5** *Salvia caespitosa* etanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri

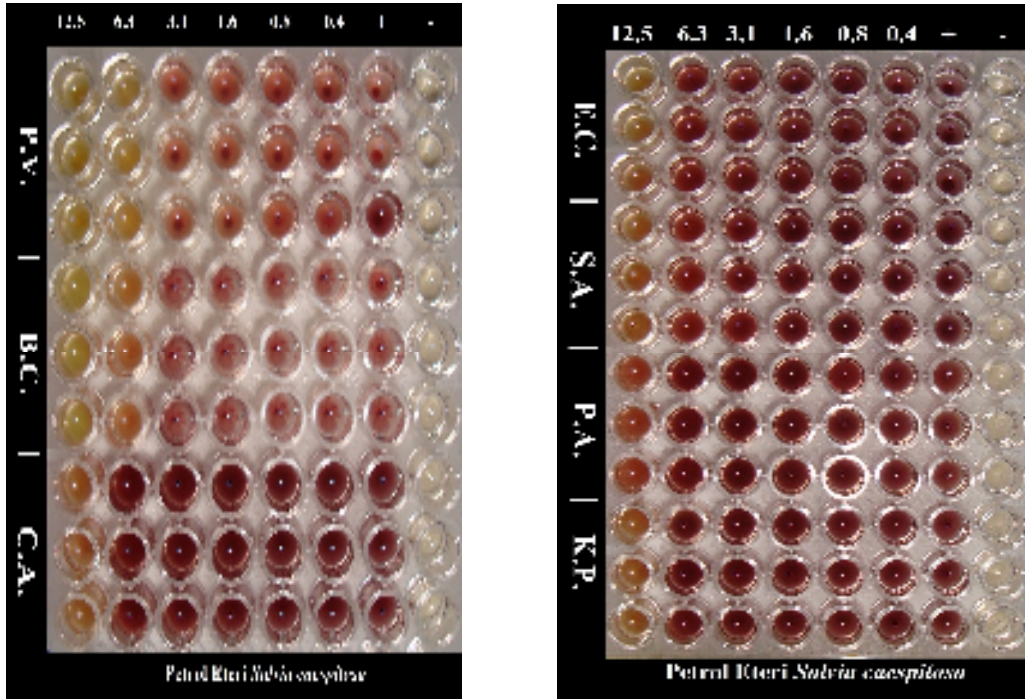
<i>Salvia caespitosa</i>	Etanol	
	MİK(mg/mL)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	>12.5	>12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	>12.5	>12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.3	12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	>12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	12.5
<i>Candida albicans</i>	12.5	12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12.5	12.5
<i>Aspergillus niger</i>	12.5	12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	12.5	12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	12.5	12.5

**Çizelge 3.6** *Salvia caespitosa* petrol eteri ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri

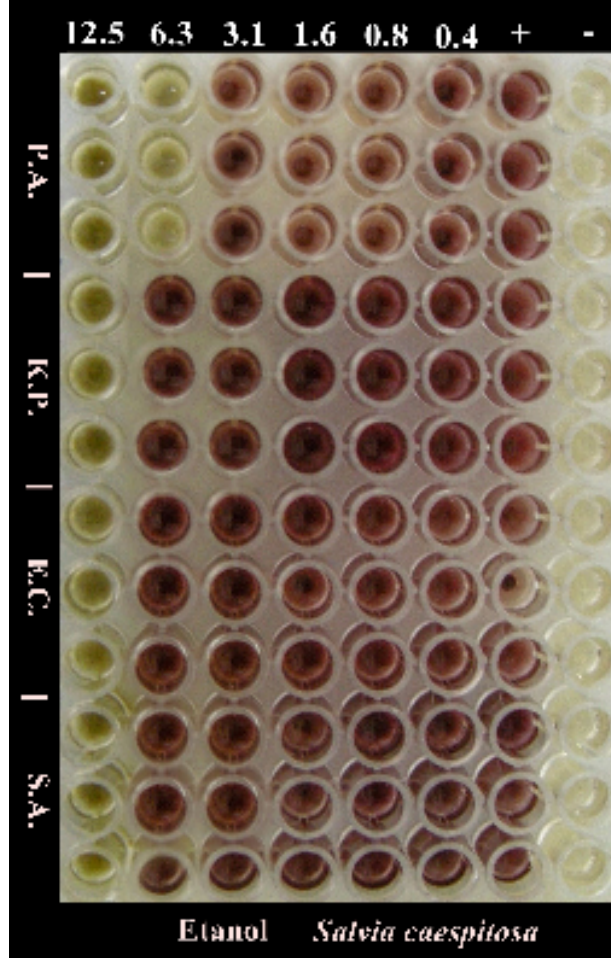
<i>Salvia caespitosa</i>	Petrol Eteri	
	MİK(mg/mL)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	6.3	12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	6.3	12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>12.5	>12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	>12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6.3	6.3
<i>Aspergillus niger</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	12.5	>12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	6.3	12.5



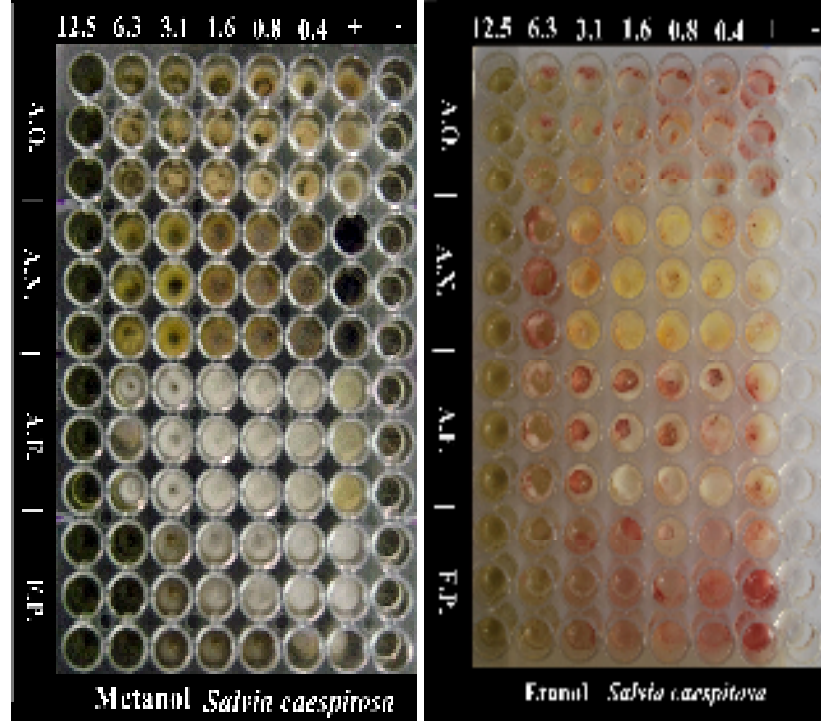
**Şekil 3.1** *Salvia caespitosa* metanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (B.C.:*Bacillus cereus*, P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*, P.V.: *Proteus vulgaris*, K.P.: *Klebsiella pneumonia*, S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.:*Esherichia coli*, C.A.:*Candida albicans*), (Konsantrasyon aralığı 12.5-0.4 mg/mL)



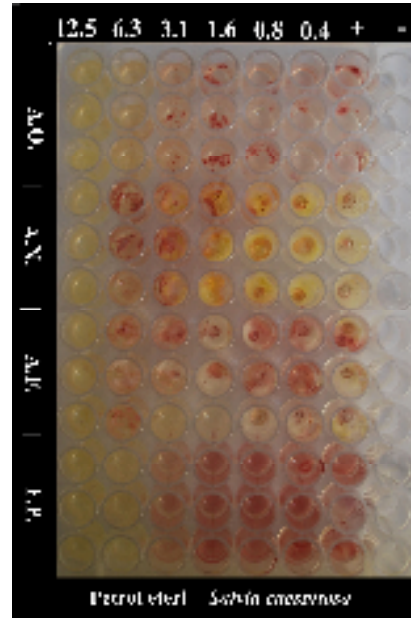
**Şekil 3.2** *Salvia caespitosa* petrol eteri ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (B.C.:*Bacillus cereus*, P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*, P.V.: *Proteus vulgaris*, K.P.: *Klebsiella pneumonia*, S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.:*Esherichia coli*), (Konsantrasyon aralığı 12.5-0.4 mg/mL)



**Şekil 3.3** *Salvia caespitosa* etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*, K.P.: *Klebsiella pneumonia*, S.A.:*Staphylococcus aureus*, E.C.:*Esherichia coli*), (Konsantrasyon aralığı 12.5-0.4 mg/mL)

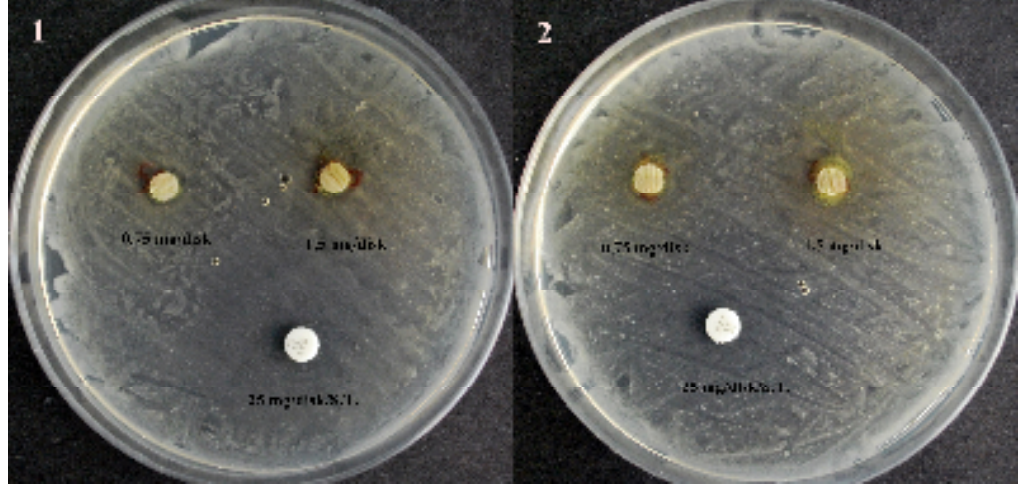


Şekil 3.4 *Salvia caespitosa*'nın metanol ve etanol ekstresinde MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (A.O.: *Aspergillus ochraceus*, A.N.: *Aspergillus niger*, A.F.: *Aspergillus flavus*, F.P.: *Fusarium proliferatum*)



Şekil 3.5 *Salvia caespitosa*'nın petrol eteri ekstresinde MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (A.O.: *Aspergillus ochraceus*, A.N.: *Aspergillus niger*, A.F.: *Aspergillus flavus*, F.P.: *Fusarium proliferatum*)

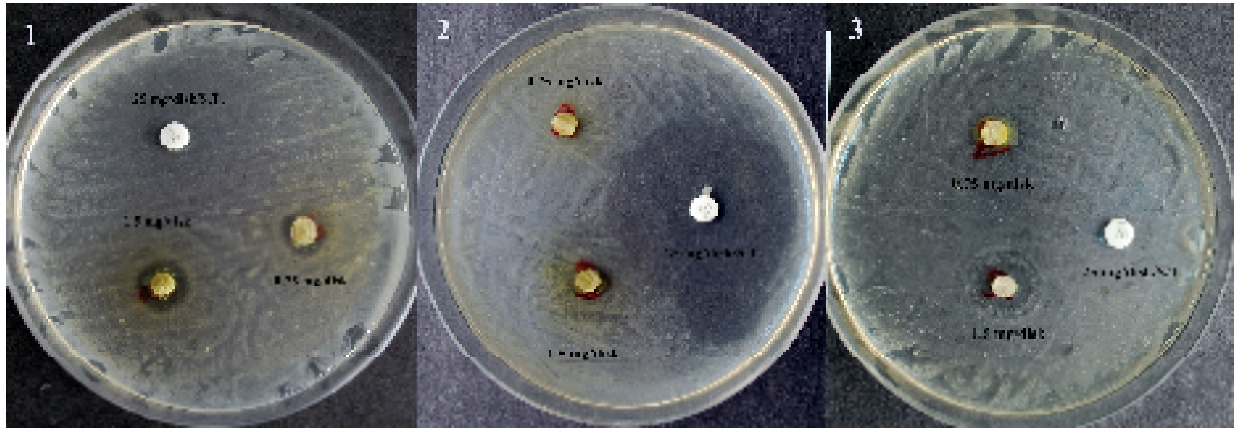




**Şekil 3.6** Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar

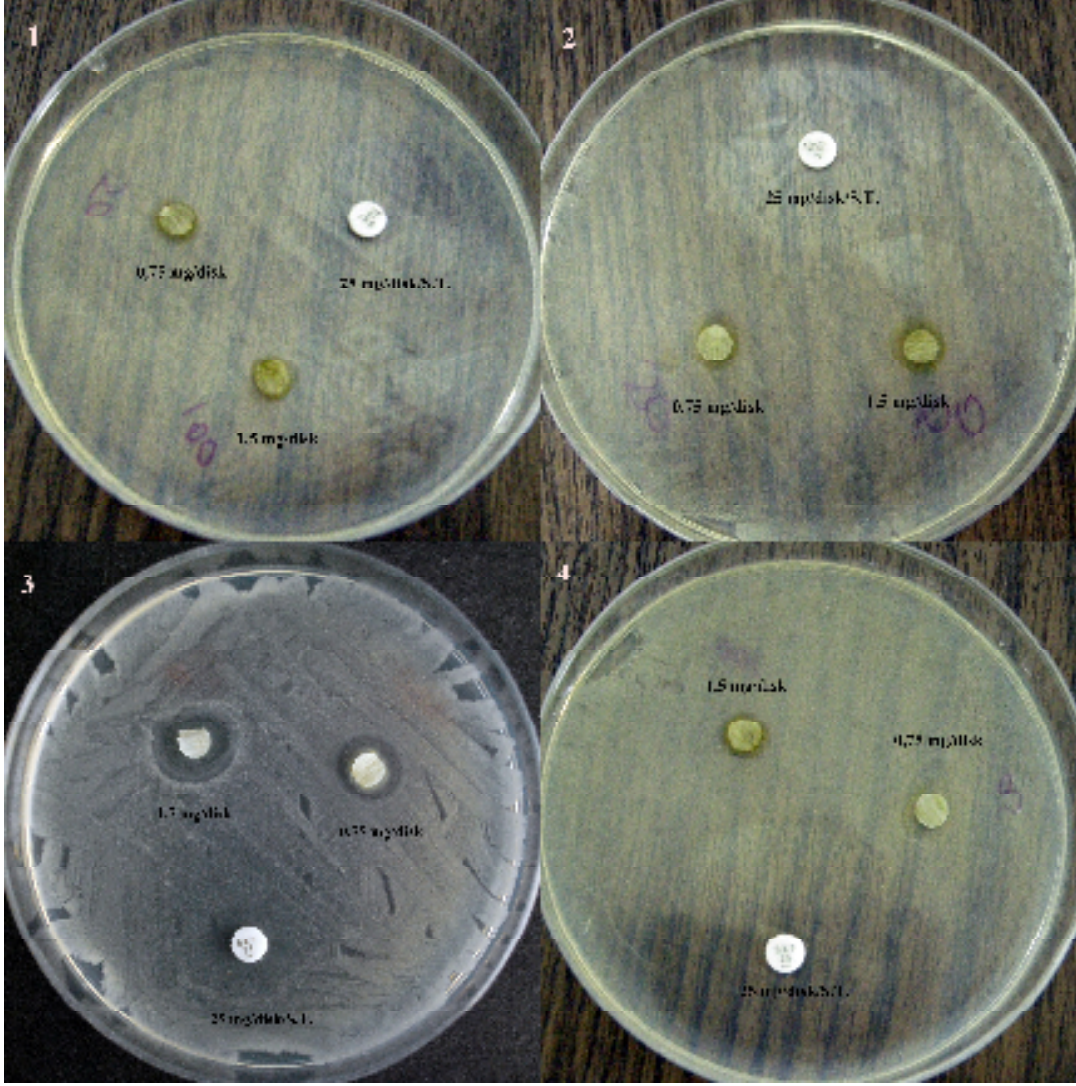
1) *E. coli* 2) *P. aeruginosa*

(Kontrol grubu: 25µg/disk Sulphamethoxazole trimethoprim-S.T.)



**Şekil 3.7** Etanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar

1) *E. coli* 2) *K. pneumoniae* 3) *P. aeruginosa*

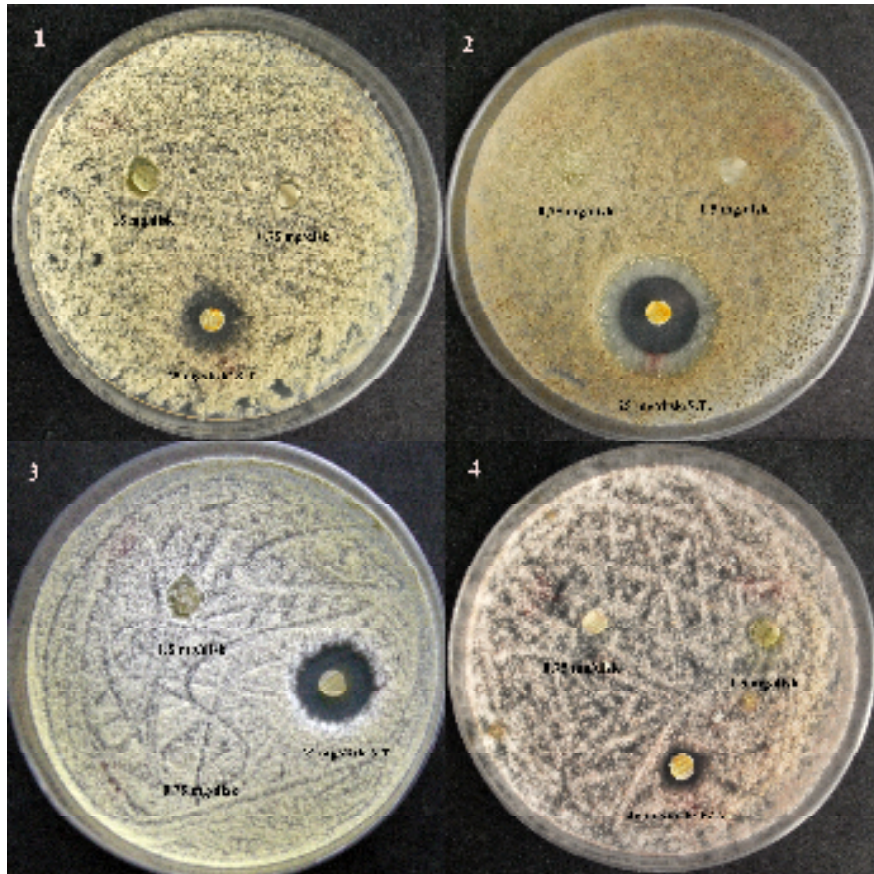


Şekil 3.8 Petrol eter ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar

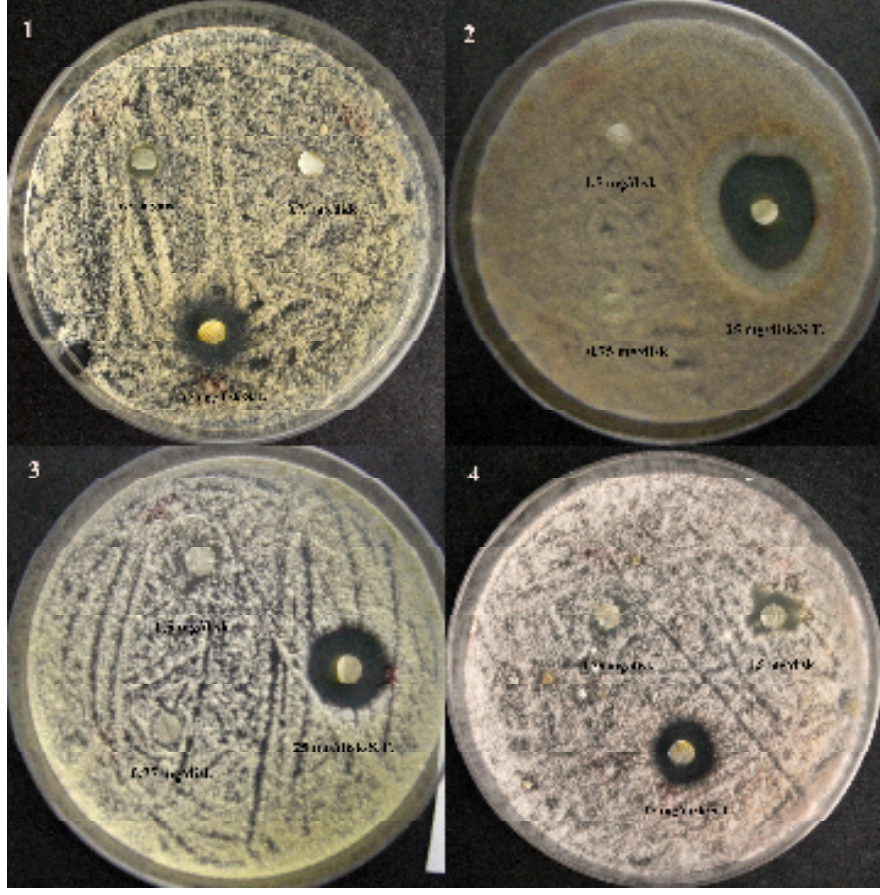
1) *E.coli* 2) *K. pneumonia* 3) *P. aeruginosa* 4) *P. vulgaris*



Şekil 3.9 Metanol ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *Aspergillus niger* 2) *Aspergillus flavus* 3) *Fusarium proliferatum*



Şekil 3.10 Etanol ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *Aspergillus ochraceus* 2) *Aspergillus niger* 3) *Aspergillus flavus* 4) *Fusarium proliferatum*



Şekil 3.11 Petrol eteri ekstresinde küflerin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *Aspergillus ochraceus* 2) *Aspergillus niger* 3) *Aspergillus flavus* 4) *Fusarium proliferatum*

## 3.2 Antioksidan Aktivite Bulguları

### 3.2.1 DPPH Yöntemi Bulguları

DPPH çözeltisi ( $1,5 \times 10^{-5} M$ ) ve ekstrelerle hazırlanan karışımları 30 dakika karanlık odada inkübasyona tabi tuttuk. İnkübasyon sürecinden sonra karışımların UV-Vis spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorban değerleri okundu.

DPPH absorbanını % 50 düşüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilen ekstrelere ait  $IC_{50}$  ve % inhibisyon değerleri sırasıyla çizelge 3.7 ve 3.8’ da verildi.

**Çizelge 3.7** *Salvia caespitosa* metanol, etanol ve petrol eteri ekstrelerinin  $IC_{50}$  değerleri

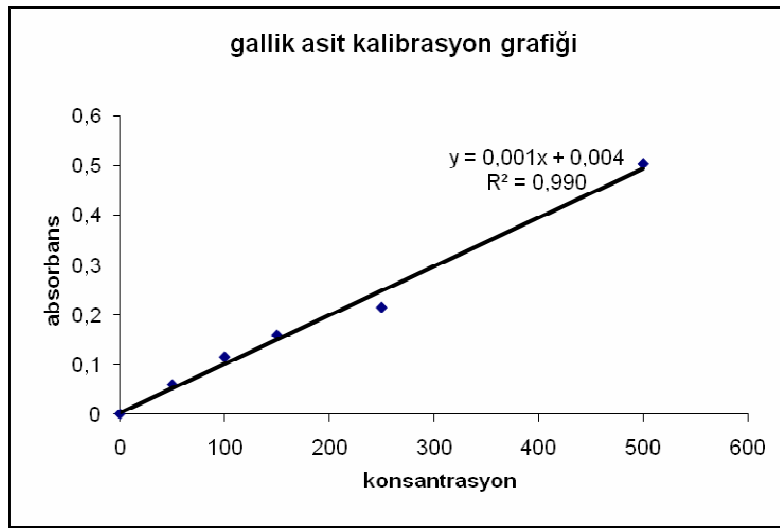
<i>Salvia caespitosa</i>	$IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ )
Metanol	52.35 $\pm$ 0.29
Etanol	30.52 $\pm$ 0.26
Petrol eteri	110 $\pm$ 3.3
Askorbik asit	8.9 $\pm$ 0.1

**Çizelge 3.8** *Salvia caespitosa* bitki ekstrelerinin %inhibisyon değerleri

Konsantrasyon ( $\mu g/mL$ )	Askorbik asit (%inhibisyon)	Metanol ekstresi (%inhibisyon)	Etanol ekstresi (%inhibisyon)	Petroleter i ekstresi (%inhibisyon)
25	62.35	68.62	67.03	51.99
50	97.01	95.51	85.95	47.11
100	97.21	97.50	97.11	51.19
200	96.91	96.81	96.81	52.19

### 3.2.2 Total Fenol Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde referans fenolik madde olarak gallik asit kullanıldı. Gallik asit %10' luk etanolde çözülerek çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler elde edildi ve UV-Vis spektrofotometrede 765 nm' de ölçümler alındı. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden ekstrelerin total fenol miktarları gram ekstrede eşdeğer gallik asit miktarı cinsinden çizelge 3.12' da verildi.



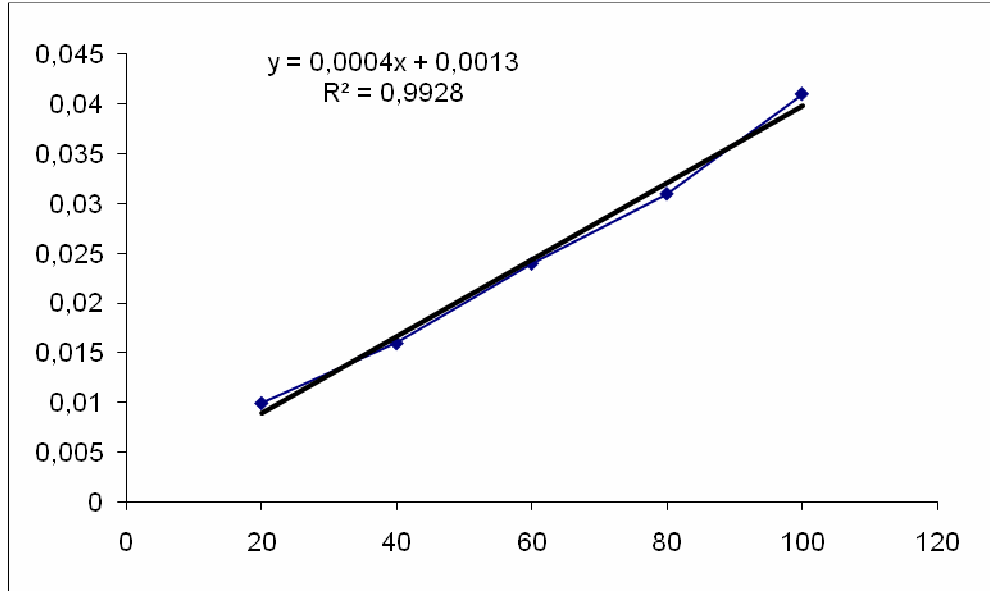
Şekil.3.12 Gallik asit kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.9 *Salvia caespitosa* bitki ekstrelerinin total fenol miktarları

<i>Salvia caespitosa</i>	Total fenol miktarları (1gr/L ekstrede gallik asit)
Metanol ekstresi	193.5
Etanol ekstresi	291.33
Petrol eteri ekstresi	31.66

### 3.3.3 Total Flavonoid Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde referans flavonoid olarak katalol kullanıldı. Katalol, %80 etanolde çözülerek 20, 40, 60, 80, 100 mg/L konsantrasyonlarda dilüsyonları elde edildi. Dilüsyonların UV-Vis spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbansları okunarak şekil 3.13’ de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin total flavonoid miktarları gram ektrede eşdeğer katalol miktarı olarak çizelge 3.10’da verildi.



Şekil 3.13 Katalol kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.10 *Salvia caespitosa* ekstrelerinin total flavonoid miktarları

Bitki ekstreleri	Gram ektrede bulunan eşdeğer mg katalol miktarı
Metanol	26.7
Etanol	17
Petrol eteri	14.7

### 3.3 HPLC Bulguları

Çizelge 3.11 Metanol, etanol ve petrol eteri ekstresinde bulunan fenolik maddeler

NO	Numuneler( $\mu\text{g}/\text{gram}$ )	Metanol ekstresi ( $\mu\text{g}/\text{gram}$ )	Etanol Ekstresi ( $\mu\text{g}/\text{gram}$ )	Petroleteri Ekstresi ( $\mu\text{g}/\text{gram}$ )
1	Gallic Acid	134.4	161.1	*
2	Catechin	*	*	*
3	Chlorogenic acid	752.8	759.3	*
4	Caffeic acid	244.8	952.3	*
5	Epicatechin	*	*	*
6	Syringic acid	399.3	359.9	7.4
7	P-coumaric acid	85.5	150.4	*
8	Ferulic acid	201.0	343.6	*
9	Rutin	*	*	*
10	Hesperidin	5845.3	1417.3	*
11	Apigenin-7-glucoside	898.6	982.4	*
12	Rosmarinic acid	52889.1	50000.9	*
13	Quercetin	*	*	*
14	Naringenin	*	*	*
15	Luteolin	355.9	869.7	*
16	Apigenin	254.5	294.5	*
17	Acacetin	*	*	*



#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında *Salvia caespitosa* türünün metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelendi.

Disk difüzyon metodu sonuçları incelendiğinde etanol ve petrol eteri ekstresi tüm bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluştururken, sadece metanol ekstresi *E. coli* üzerine etki göstermedi. Küflerden *A. ochraceus* ve *F. proferilatam* üzerinde tüm ekstralar etkili oldu. Özellikle *F. proferilatam*' un etanol ekstresine bakıldığında kullanılan standart ile aynı zon çapını verdiği görüldü ( $7.75\pm 0.5$  mm). *A. niger* üzerinde ise sadece petrol eteri ekstresinde ( $8.75\pm 1.25$  mm ) inhibisyon zonu görüldü. *A. flavus* üzerinde petrol eteri ( $9\pm 0.81$  mm) inhibisyon zonu oluştururken, metanol ekstresi ( $6.5\pm 0.57$  mm) inhibisyon zonu oluşturdu.

Tüm ekstraların *Candida albicans* mayası üzerinde inhibisyon zonu oluştuğu görüldü. (Metanol ekstresi:  $7.25\pm 0.95$  mm, Etanol ekstresi:  $10.25\pm 0.5$  mm, Petrol eteri:  $8.5\pm 1.29$  mm).

MİK değerinin, mikroorganizma üremesini inhibe eden, MBK ve MFK değerlerinin ise bakteri ve fungusların ölümünü sağlayan konsantrasyon değeri olarak ifade edildiğini söylemiştik.

*Salvia caespitosa* türünün metanol ekstresi bakterilerden sadece *P. vulgaris* üzerinde bakterisit etki gösterdi (MBK: 12.5 mg/mL). Küflerden *F. proliferatum* üzerinde 6.3 mg/mL konsantrasyon değerinde fungusit etki gösterdi.

Etanol ekstresi *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit etki gösterdi. Etanol ekstresi küflerden *A. flavus* hariç hepsinde fungusit etki gösterdi (12.5 mg/mL).

Petrol eteri ekstresi *P. vulgaris* ve *B. cereus* 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit etki gösterdi. Petrol eteri ekstresi *A. ochraceus* üzerinde 6.3 mg/mL değerinde, *F. proliferatum* üzerinde ise 12.5 mg/mL değerinde fungusit etki göstermiştir.

*C. albicans* mayası ise hem metanol hem etanol ekstresi ile 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde inhibisyon gösterdi.

*Salvia aucheri* var. *aucheri* üzerine yapılan benzer bir araştırmada bu bitkinin ekstresinin *P. vulgaris*, *S. aureus*, *B. subtilis* üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir [68]. Aynı cinsin farklı taksonları üzerindeki bu benzer sonuçlar doğaldır. Çünkü mikroorganizmaların kemoterapötik maddelere karşı duyarlılıklarının suştan suşa farklılık gösterdiği belirtilmektedir [69]. Bizim ekstrelerimizden aldığımız sonuçlar bu çalışma ile korelasyon içindedir.

*Salvia caespitosa* türü ile Ulubelen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yeni izole edilen 6 $\beta$ -hydroxyisopimaric acidin *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *B. subtilis* üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir [62]. Bizim kullandığımız test mikroorganizmalarından *S. aureus* üzerinde etanol ekstresi etkili oldu ve bu çalışma ile paralel sonuçlar elde edildi.

Dülger ve ark. [70], çeşitli bitki yağlarının ve ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir. Bitkinin sahip olduğu kimyasal kompozisyonundan, kullanılan mikroorganizma türünden, bitki ekstraksiyonu yapılıyorsa ekstraksiyonda kullanılan maddeden ve yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtmişlerdir. Mikroorganizmaların çeşitli kemoterapötik maddelere karşı duyarlılıklarının suştan suşa bile farklılık gösterdiği uzun zamandan beri bilinmektedir [71].

Çizelge 3.11' de verilen fenolik madde analiz sonuçları incelendiğinde metanol ekstresinin chlorogenic asit (752.8 µg/gram), syringic (399.3 µg/gram), p-coumaric acid (85.5 µg/gram), ferulic acid (201.0 µg/gram), hesperidin (5845.3 µg/gram); apigenin-7glucoside (898,6 µg/gram), rosmarinic acid (52889,1 µg/gram), luteolin (355,9 µg/gram), apigenin (254,5 µg/gram), gallik asit (134.4 µg/gram), caffeic acid (244.8 µg/gram), etanol ekstresinin chlorogenic acid (759.3 µg/gram), caffeic acid (952.3 µg/gram), syringic (359.9 µg/gram), p-coumaric acid (150.4 µg/gram), ferulic acid (343.6 µg/gram), hesperidin (1417.3 µg/gram); gallic acid (161.1 µg/gram), apigenin-7 glucoside (982.4 µg/gram), rosmarinic acid (50000.9 µg/gram), luteolin (869.7 µg/gram), apigenin (294.5 µg/gram), petrol eteri ekstresi ise sadece syringic acid (7.4 µg/gram) bileşimini içerdiği bulunmuştur.

Çalışmamızda etanol ekstresinin diğer ekstrele nazaran küfler üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Bunun nedenini ise etanol ekstresinde fazla miktarda bulunan rosmarinik asit fenoliğinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Aşkun ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada Lamiaceae familyasına dahil olan *Origanum munitiflorum* (sütçüler kekiği) ve *Tymbra spicata* L. var. *spicata* (Karakekik) bitki türleri ile yapılan antimikobakteriyal aktivite çalışmaları sonucunda *Tymbra spicata* L. var. *spicata* (Karakekik) bitki türünün diğer bitkiye oranla daha iyi aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu bulgularını *Tymbra spicata* L. var. *spicata* (Karakekik) bitkisinin rosmarinik asitçe daha zengin olduğuna bağlamışlardır [79].

Antioksidan çalışmaları DPPH, total fenol miktar tayini ve total flavonoid miktar tayini metodları kullanılarak çalışıldı.

Antioksidan aktivite çalışmamızda; DPPH metoduyla yaptığımız çalışma sonucunda etanol ekstresinin en düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu belirlendi (30.52±0.26). Metanol ekstresinde IC<sub>50</sub> değeri 52.35±0.29 µg/mL, petrol eteri ekstresinde ise 110±3.3 µg/mL konsantrasyon değerinde bulundu. Bunun sonucunda metanol ve petrol eteri ekstralarının serbest radikal süpürücü etkileri etanol ekstresinden daha düşük olduğu görüldü. Ekstrelele ait IC<sub>50</sub> değerleri çizelge 3.7' de verildi.

Özütlerin serbest radikal giderim aktivitesinin, özüt içerisindeki antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini verebilmelerine [72] ve bu bileşenlerin yapısal konformasyonuna bağlı [73] olduğu bilinmektedir. 517' nm de dalga boyu maksimumuna sahip olan DPPH. serbest radikali, kararlı diamagnetik bir molekül olabilmek için antioksidan moleküllerden bir elektron yada hidrojen radikalini kolaylıkla alabilmektedir [74].

Tepe ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada *Salvia caespitosa* bitkisinin metanol ekstresinde IC<sub>50</sub> değeri 41.3 ± 2.14 µg/mL konsantrasyon değerinde bulunmuştur [26]. Bu çalışmadaki değer ile bizim çalışmamızda bulduğumuz değer birbirine çok yakındır. Aradaki farklar için bitkinin ekolojik şartlarına, toplanma zamanlarına bağlı olarak değiştiğini söylemek mümkündür.

Metanol, etanol, petrol eteri ekstraları ve askorbik asit % inhibisyon değerleri çizelge 3.8' de karşılaştırıldı ve 200 µg/mL konsantrasyon değerinde etanol ekstresinin askorbik asite yakın değerde % inhibisyon göstermiş olduğu bulundu (96.83 mg/mL). Petrol eteri ekstresinde antiradikalik aktivite görülmedi.

Fenoller hidroksil grupları bulundurduklarından, serbest radikalleri yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bitki bileşenleridir [75]. Aynı zamanda fenolik bileşikler doğrudan doğruya antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilirler [76]. Polifenolik bileşikler, potansiyel bir antioksidan olduğu için antioksidan aktivite belirlemede, toplam fenolik madde miktarlarının bilinmesi önemlidir.

Yapılan total fenol yöntemi sonucu DPPH yöntemi sonuçlarını doğrulamaktadır. Gallik asit referans madde olarak kullanılmış olup sonuçlar gr/L ekstrede mg gallik asit eşdeğer miktarı olarak verildi. En yüksek fenol miktarı etanol ekstresinde bulundu (391.33 mg GA/gr). Metanol ekstresinde 193.5 mg GA/gr, petrol eteri ekstresinde ise 31.66 mg GA/gr fenolik madde bulunmaktadır. Bu yüzden antioksidan aktivite etanol ekstresinde en iyi sonuçları verdi.

Total flavonoid çalışmamız sonucunda metanol ekstresinin en yüksek değerde flavonoid içerdiği belirlendi ve gram ekstrede bulunan eşdeğer katekol miktarı 26.7 mg olarak bulundu.

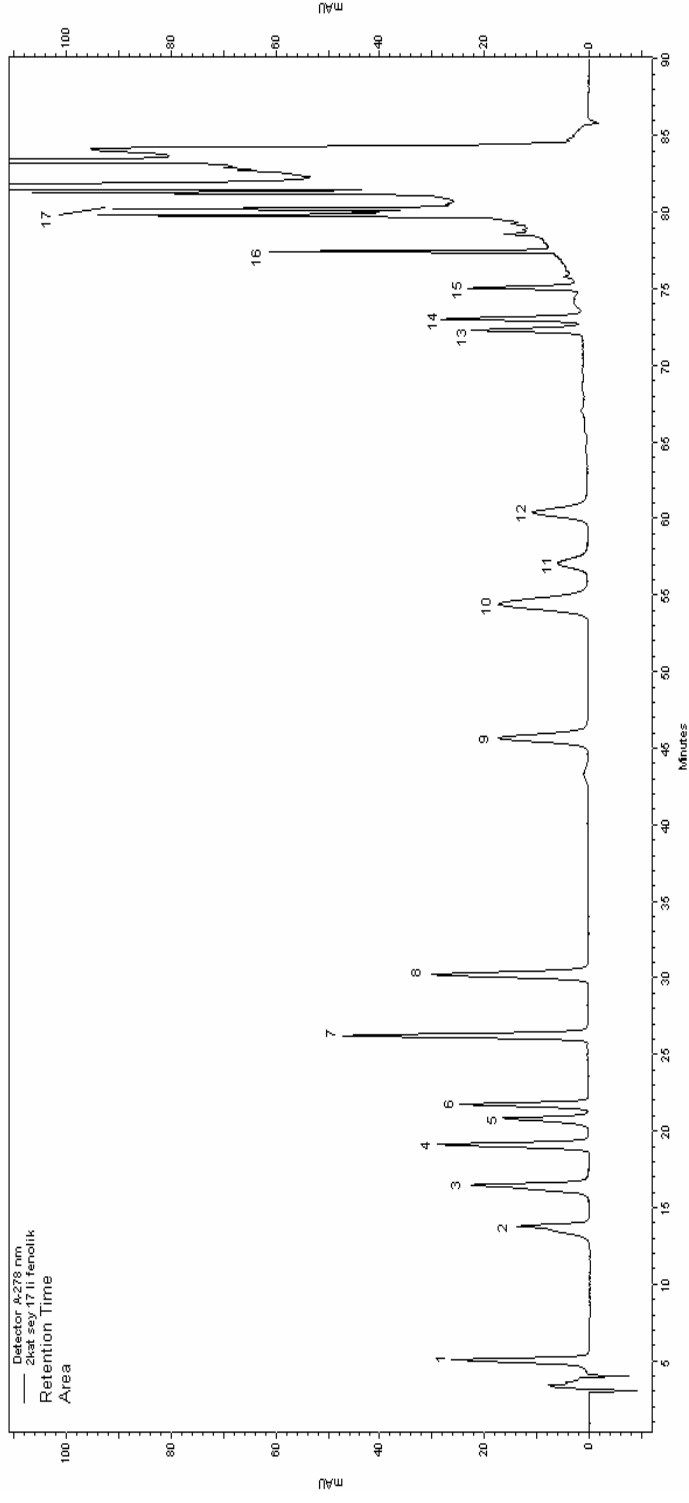
Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile selat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek, ve süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayıp göstermektedirler [77, 78].

Fenolik madde analizi sonuçlarımız antioksidan aktivite çalışmalarımızı doğrulamaktadır. Fenolik maddece fakir olduğu gözlemlenen petrol eteri ekstresinin serbest radikalleri süpürme aktivitesi hiç yok denecek kadar azdır. Buna tezat olarak petrol eter ekstresinin antimikrobiyal aktivitesinin metanol ve etanol ekstrelerinden daha iyi düzeyde olduğu bulunmuştur. Bu sonuçtan apolar ve polar çözücülerin farklı bileşenleri çözmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir

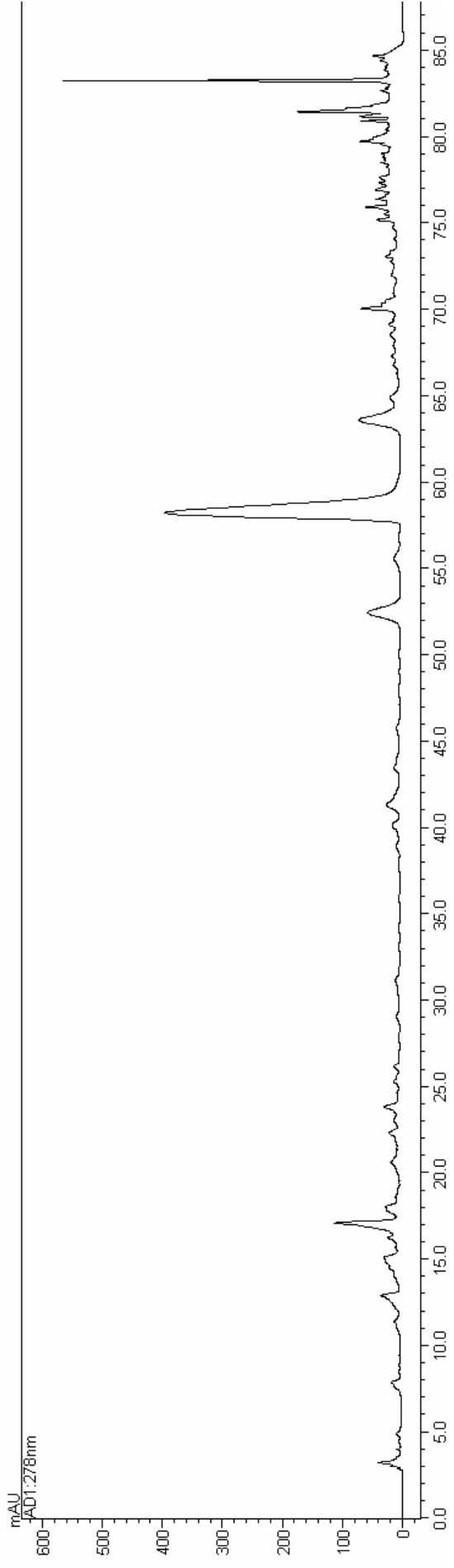
Adaçayı ekstraktlarının daha önce yapılmış olan çalışmalarda birçok fenolik bileşene sahip olduğu açıklanmıştır. Antioksidan özelliği esas olarak, karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asite bağlanmaktadır. Adaçayı ekstraktı aynı zamanda, toplam antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğu düşünülen flavonoid ve diğer fenolik bileşenleri içermektedir. Adaçayı ekstraktının ticari olarak kalitesi bu fenolik bileşen içeriğine bağlıdır [53]. Fenolik madde Analizi sonuçlarımızda çok yüksek oranda bulunan rosmarinik asit antioksidan sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

## 5. EKLER

### EK-A *SALVIA CAESPITOSA* BİTKİ EKSTRELERİNE AİT HPLC KROMOTOGRAMLARI

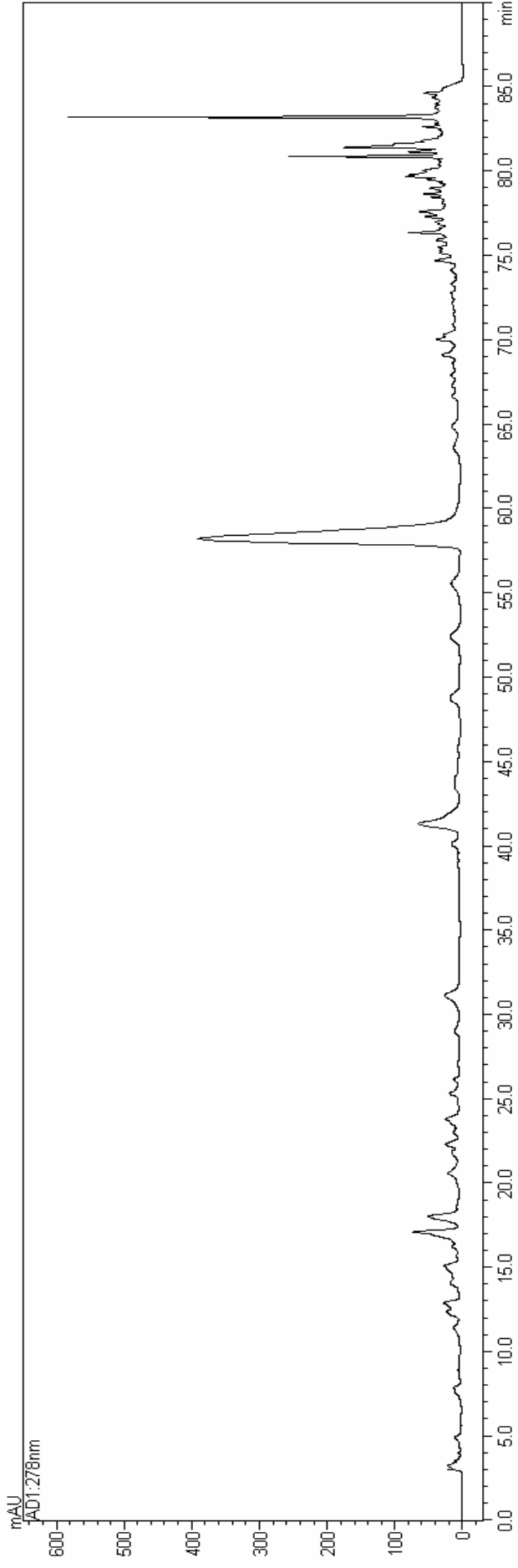


**Şekil A.1** Standart kromotogramı: 1: Gallic acid, 2: catechin, 3: chlorogenic acid, 4: caffeic acid, 5: epicatechin, 6: syringic acid, 7: p-coumaric acid, 8: ferulic acid, 9: rutin, 10: hesperidin, 11: apigenin-7-glucoside, 12: rosmarinic acid, 13: quercetin, 14: naringenin, 15: luteolin, 16: apigenin, 17: acecetin

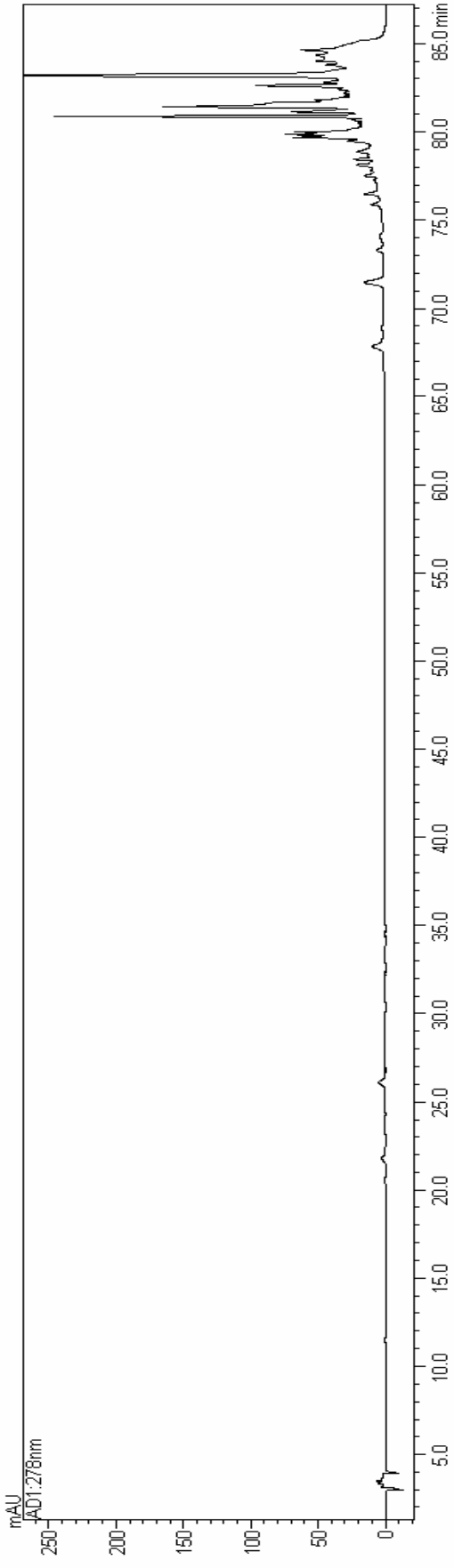


**Şekil A.2** *Salvia caespitosa* 'nın Metanol Ekstresi HPLC Kromatogramı





**Şekil A.3** *Salvia caespitosa* Etanol Ekstresi HPLC Kromotogramı



**Şekil A.4** *Salvia caespitosa* Petr ol Eteri Ekstresi HPLC Kromotogramı

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Hsi-wen, L., Hedge, I. C., “ Lamiaceae”, *Flora of China*, (1993) 17, 50-299.
- [2] Öztekin, N., Başkan, S., Kepekci , S. E., Erim , F. B., Topcu, G., “ Isolation and analysis of bioactive diterpenoids in *Salvia* species (*Salvia chionantha* and *Salvia kronenburgii*) by micellar electrokinetic capillary chromatography”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2009).
- [3] Dirmenci, T., “Türkiye’ de Yetişen *Nepeta L.* (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar”, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (2003).
- [4] Heywood, V. D., *Flowering Plant of the World*, Oxford Univ. Press., Oxford, (1979), p. 39-240
- [5] Davis, P. H.,(ed), “Flora Of Turkey And East Aegean Islands”, Vol. 7, Edinburgh Un. Press., Edinburgh, (1982).
- [6] Amiri, H., “Quantative and qualative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages” *Daru*, (2007) 15 (2): 79-82.
- [7] Bağcı, E., Koçak, A., “*Salvia L.* (*S. ceratophylla L.*, *S. aethiopsis L.*) türü uçucu yağlarının analizi ve değerlendirilmesi üzerine bir çalışma”, *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, (2007) 19(4), 435-442.
- [8] Zutic, I., Putievsky, E. and Dudai, N., “Influences of Harvest Dynamics and Cut Height on Yield Components of Sage (*Salvia officinalis L.*)”, Vol.10(4), *Journal of Herbs, Spices&Medicinal Plants* (2003).
- [9] Ceylan, A., *Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri)* E.Ü.Z.F. Yayınları No:481, Bornova, İzmir, (1996), S. 225-240.

- [10] Zeybek, U., Zeybek, N., Farmasötik Botanik [Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri], E.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:3 Bornova, İzmir, (2002), S.380.
- [11] Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi Geçmişte ve Bugün (II. Basım). Nobel Tıp Kitapevleri, (1999).
- [12] Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H., “Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (1994) 42: 665-669.
- [13] Yılmaz, H. ve Özgüven, M., “Tıbbi Adaçayı’nda (*Salvia officinalis* L.) Ekolojik ve Morfogenik Varyabilite”, *Ç.Ü.Fen BilimLeri Enstitüsü, Fen ve Mühendislik BilimLeri Dergisi*, (1998), 3(2): 115-128.
- [14] Karaaslan, D., *Salvia* Populasyonlarında Farklı Azot Uygulamalarında Drog Verimi ve Kemotaksonomik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilm. Enst., Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, (1994)
- [15] Koç, H., “Tıbbi Adaçayı (*Salvia officinalis* L.)’nda Azotlu Gübrelemenin Verim ve Kalite üzerine Etkisi”, *Gaziosmanpaşa Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, (2000) 17(1): 89.
- [16] Ulubelen, A., Tan, N., Sonmez, U., & Topcu, G., “Diterpenoids and triterpenoids from *Salvia multicaulis*”, *Phytochemistry*, (1998), 47, 899.
- [17] Ulubelen, A., Topçu, G., Bozok- Johansson, C., “Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity”, *J. Nat. Prod.*, (1997), 60, 1275-1280.
- [18] Goren, A.C., Kilic, T., Dirmenci, T., Bilsel, G., “Chemotaxonomic evaluation of Turkish species of *Salvia* : Fatty acid composition of seed oils”, *Biochemical Systematics and Ecology*, (2006) 34, 160-164.

- [19] Morteza-Semnani, K., Goodarzi, A., Azadbakht, M., “The essential oil of *Salvia aethiopsis* L” *Journal of Essential Oil Research*, (2005) 17, 274- 275.
- [20] Catsiotis, S., and Iconomou, N. G.,”Qualitative and quantitative comparative gas-liquid chromatographic analysis of the essential oil of *Salvia triloba* grown in Greece”, *Pharm. Acta Helv.*, (1984) 59, 29–32.
- [21] Matkowski, A., Zielins, S., Oszmians, J., Lamer-Zarawska, E., “Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L” , *Bio Tech.*, (2008) 99, 7892-7896.
- [22]. Ulubelen, A., Cardioactive and Antibacterial Terpenoids from *Salvia* species, *Phytochemistry*, (2003) 64, 395-399.
- [23] Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H., *J Agric Food Chem*, (1994) 42: 665-669.
- [24] Lu, Y. and Foo, L.Y., “Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*)”. *Food Chem.*, (2001) 75, 197-202.
- [25] Lima, C.F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Ferreira, M.F., Wilson, C.P., *Journal of Ethnopharmacology*, (2005) 97: 383-389.
- [26] Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Sökmen, A., *Food Chem*, (2006) 95: 200-204.
- [27] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Bekat, L. ve Leblebici, E., *Tohumlu Bitkiler Sistematığı*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, (1998), No: 116, (İzmir).
- [28] Metcalfe, M. R. and Chalk, L., *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol. 2, Oxford University Press, London, (1950).

- [29] Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., *Food Chem.*, (2005), 90, 333-340.
- [30] Bayram, E., *Turkish Journal of Agricultural*, (1999) 25,351-357.
- [31] Ceylan, A., Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri). Ege üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No.: 481, Bornova-İzmir, (1987).
- [32] Arslan, N., Gürbüz B. ve Yılmaz G., adaçayı (*Salvia officinalis* L.)’Ynda Tohum Tutma Oranı ve Çelik Alma Zamanı ile Indol Butirik Asitin (IBA) Gövde çeliklerinin Köklenmesine Etkileri üzerine Araştırmalar. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, (1995) 19, 83-87,
- [33] Aşkun, T., Başer K.H.C.,Tümen G., Kürkçüoğlu, M., “Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities”, *Turk J Biol*, (2010) 34, 89-95
- [34] Aleksovski, S. A., Sovova, H., “Supercritical carbondioksid Extraction of *Salvia Officinalis* L.”, *The Journal of Supercritical Fluids*, (2006), p.239-245.
- [35] Baydar, H., Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No. 51, Isparta, (2005), S. 77.
- [36] Gabriel, A., Etherischöl-Untersuchungen an *Salvia triloba* L. WindsammLungen aus der Westtürkei. Justus-Liebig Universität Gießen. Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I. Giessen, (1996).
- [37] Bayram, E., “Batı Anadolu Florasında Yetişen Anadolu Adaçayı (*Salvia Fruticosa* Mill.)’nda Uygun Tiplerin Seleksiyonu Üzerinde Araştırma”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, (2001) 25: 351-357.

- [38] Nakipoglu, M., “Türkiye’nin Bazı *Salvia* L. türleri üzerinde karyolojik araştırmalar II. *S. viridis* L., *S. glutinosa* L., *S. virgata* Jacq., *S. verbenaca* L., *S. argentea* L.’”, *Doga Tr. J. of Botany*, (1993) 17, 157-161.
- [39] Nakipoğlu, M., “Türkiye’nin Bazı *Salvia* L. türleri üzerinde karyolojik araştırmalar I. *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill., *S. Smyrnaea* Boiss. (Lamiaceae)”, *Doga Tr. J. of Botany*, (1993) 17, 21-27.
- [40] Nakipoğlu, M., “Bazı Adaçayı (*Salvia* L.) türleri ve bu türlerin ekonomik önemi”, Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları, Eğitim Fakültesi, Eğitim BilimLeri Dergisi, (1993) 6, 45-58.
- [41] Chalchat, J.C., Michet, A., Pasquier, B., “Study of the clones of *Salvia officinalis* L. Yields and chemical composition of essential oil”, *Flav Fragr J*, (1998) 13: 68-70.
- [42] Ozcan., M., Tzakou, O., & Couladis, M., “Essential oil composition of Turkish herbal tea (*Salvia aucheri* Benth var. *canescens* Boiss. Et Heldr.)”, *Flavour and Fragrance Journal*, (2003), 18, 325-327.
- [43] Demirci, B., Baser, K. H. C., Yildiz, B., & Bahcecioglu, Z., “Composition of essential oils of six endemic *Salvia* spp. From Turkey”, *Flavour and Fragrance Journal*, (2003) 18, 116-121.
- [44] Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I. & Bader, A. “Essential oils of the aerial parts of three *Salvia* species from Jordan: *Salvia lanigera*, *spinosa* and *S. Syriaca*”, *Food chemistry*, (2005).
- [45] Imbesi, A., *Index plantarum quae in omnium populorum pharmacopis sunt. Adhuc receptae*, Scilla, Italy, (1964), p.771
- [46] Ulubelen, A., “Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species” *Phytochemisry*, (1964) 64, 395-399.

- [47] Lawless, J., The encyclopedia of essential oils, London, Thorsons,(2002),
- [48] Perry, N., Bollen, C., Perry, E.K., & Ballard, C. “*Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial”, *Pharmacology, Biochemistry and behavior*, (2003) 75, 651-659.
- [49] Şarer, E., Anadolu’da Yetişen Bazı Endemik *Salvia* Türlerinin Uçuşu Yağları Üzerinde Araştırmalar, 4th Symposium on Plant Drugs, Eskişehir 27-29 May (1982), Proceedings of the 4th Symposium on Plant Drugs, 149-151, Eskişehir, (1983).
- [50] Topçu G., Ulubelen A., New diterpenoids from an endemic *Salvia* species, Proceedings of the 9th Symposium on Plant Drugs, 61-71. -Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, (1991).
- [51] Başer, K.H.C., “Essensial Oil of Anatolian Labiatae A profile”, *Acta Horticulturae*, (1993) 333, 217-238.
- [52] Guenther, E., The essential oil. Vol 2, Robert E. Krieger Publishing Company, New York, (1975).
- [53] Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B., “Extraction of phenolics and essential oil from dried sage(*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures” , *Food Chemistry*, (2007) 101: 1417-1424.
- [54] Lu, Y., Leap Foo, L., “Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*)” , *Food Chemistry*, (2001) 75: 197-202.
- [55] Bayrak, A. ve Akgül, A. “Composition of Essential Oils from Turkish *Salvia* Species”, *Phytochemistry*, (1987) 26, 846-847.
- [56] Ceylan, A. Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri). Ege üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, Bornova, İzmir, No: 481, (1997) Pp.:163-175.



[57] Baytop, T., Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, İ.Ü. Yayınları, İstanbul No:1039, Tıp Fakültesi, No:59, (1963), S.351.

[58] Matkowski, A., Zielins, S., Oszmians, J., Lamer-Zarawska, E., “Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L.”, *Bio Tech* (2008) 99, 7892-7896.

[59]. Ulubelen, A., Cardioactive and Antibacterial Terpenoids from *Salvia* species, *Phytochemistry*, (2003) 64, 395-399.

[60] Demirci, B., Başer, H. C. B., Yıldız B., Bahçecioğlu Z., “Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey”, *Flavour Fragr. J.*, (2003) 18: 116–121.

[61] Kılıç, T., Dirmenci T., Gören, C.A., “Chemotaxonomic Evaluation of Species of Turkish *Salvia*: Fatty Acid Composition of Seed Oils”, II. *Rec. Nat. Prod.*,1:1 (2007) 17-23

[62] Ulubelen, A., Öksüz, S., Topçu, G., Gören, A.C., Bozok-Johansson, C., Çelik, C., Kökdil, G., Voelter, W., “A new antibacterial diterpene from the roots of *Salvia caespitose*”, *Nat. Prod., Lett.*, (2001a) 15, 1–8.

[63] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, IV. Ed., Approved Standard M7-A4, Wayne, P.A. (1997).

[64] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A, Wayne, P.A. (1997).

[65] Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B. S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, (2006) 68, 175–180.

[66] Tunalier, Z., Öztürk, N., Koçar, M., Hüsnü, K. Baçer, C., Duman, H., Kırimer, N., “Bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve Fenolik bileşikler yönünden incelenmesi”, Bitkisel İlaç Ham Maddeleri Toplantısı, Eskişehir, (2002), Mayıs 29-31.

[67] Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., “Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 3, (2002), 178-182.

[68] Dığrak M., İlçim A., Alma M. H. And Şen S., “Antimicrobial Activities of The Extracts of Various Plants”, *Tr. J. of Biology*, (1999) 23, 241-248.

[69] Abbasoğlu, U., Şener, B., Günay, Y., Temizer, H., Gürbüz, S., “Bazı Inokulin Alkoloitlerin Antimikrobiyal Aktiviteler”, IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiriler Kitapçığı AÜ Yayınları NO: 64, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi Yayınları No:1 Eskişehir, (1992).

[70] Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Uğurlu, E., “*Artemisia absinthium* L. (Pelin)’un Antimikrobial Aktivitesi”, *Tr. J. Biology*, (1999) 23: 377-384.

[71] Gürgen, A.R., Türkiye’nin Önemli Eterik Yağları Üzerine Araştırmalar. Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü dergisi, (1946) 6(2): 301-303.

[72] Shimada, K. K., Fujikawa, K. Y., Nakamura, T., “Antioxidative properties of xanthan on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin”, *J. Agric. Food Chem*, (1992) 40, 945-948.

[73] Fukumoto, L. R., Mazza, G., “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, *J. Agric. Food Chem*, (2000) 48, 3597-3604.

[74] Soares, J. R., Dins, T. C. P., Cunha, A. P. & Almeida, L. M., “Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*” *Free Radical Research*, (1997) 26, 469–478.

[75] Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E., “Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, (1989) 37, 2016–2021.

[76] Duh, P. D., Tu, Y. Y., & Yen, G. C., “Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)” *Lebnesmittel-Wissenschaft und Technologie*, (1999) 32, 269–277.

[77] Disilvestro, R.A., Flavonoids as Antioxidants. In: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Edit.: R.E.C. Wildman, CRC Press, ISBN: 0 8493 8734 5, USA, (2001), p:127-138

[78] Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., Introducing Natural Antioxidants. In Antioxidants in food. Edit.: J Pokorny, N Yanishlieva and M Gordon, CRC Press, ISBN 1 85573 463, USA, (2001)

[79] Askun, T, Tumen, G., Satil, F., Ates M., “In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria”, *Food Chemistry*, (2009) 116, 289–294.