

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

***LAMIUM PURPUREUM* L. VAR. *PURPUREUM* TÜRÜNÜN FARKLI EKSTRELERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE  
AKTİVİTEDE ROL OYNAYAN FENOLİKLERİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Esra SOLMAZ**

**Balıkesir, Ağustos-2009**

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

*LAMİUM PURPUREUM* L. VAR. *PURPUREUM* TÜRÜNÜN FARKLI EKSTRELERİNİN  
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE  
AKTİVİTEDE ROL OYNAYAN FENOLİKLERİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra SOLMAZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Sınav Tarihi: 06.08.2009

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

Yrd. Doç. Dr. Arzu U. TÜRKER (AİBÜ)

Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN (BAÜ-Danışman)

Balıkesir, Ağustos-2009

**ÖZET**  
**LAMIUM PURPUREUM L. VAR. PURPUREUM TÜRÜNÜN FARKLI**  
**EKSTRELERİNİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN**  
**AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE AKTİVİTEDE ROL OYNAYAN**  
**FENOLİKLERİN BELİRLENMESİ**

**Esra SOLMAZ**  
**Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**

**(Yüksek Lisans Tezi/Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Tülin AŞKUN)**  
**Balıkesir, 2009**

Türkçe adı ‘Balıcak’ olarak bilinen Lamiaceae familyasına dahil *Lamium purpureum* var. *purpureum* bitki türü, yaklaşık 20 cm uzunluğunda, karşılıklı petiolat yapraklara sahip, çiçek durumu: sık vertisillat ve pembemsi, brakte tipik olarak koyu mor çizgi içeren otsu bir bitkidir. Halk arasında bağırsak hareketlendirici ve kuvvetlendirici ilaç olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda *L. purpureum* var. *purpureum* bitkisine ait metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile incelendi ve minimum bakterisit/fungisit konsantrasyonu belirlendi. Antimikrobiyal aktivite sonucunda, bitki metanol ekstresinin en iyi inhibisyonu *B. cereus* (1,56 mg/mL) üzerine ve en iyi fungusit etkiyi *F. proliferatum* üzerine (12,5 mg/mL) gösterdiği, bitki etanol ekstresinin *B. cereus* üzerine düşük konsantrasyonda etkili (1,56 mg/mL) ve 12,5mg/mL konsantrasyon değerinde *P. aeuroginosa* üzerine bakterisit etkili olduğu, petrol eter ekstresinin ise *B. cereus*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *A. niger* ve *F. proliferatum* üzerine aynı konsantrasyon değerinde inhibisyon gösterdiği (6,25 mg/mL) ve 12,5 mg/mL konsantrasyon değeriyle *E. coli* üzerine bakterisit ve *F. proliferatum* üzerine fungusit etki gösterdiği bulundu. Üç ekstreninde 380 µg/mL konsantrasyon değerinde antitüberküloz aktivite göstermiş olduğu tespit edildi.

Antibakteriyal aktivitede *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeuroginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) ve *Bacillus cereus* (CCM 99), antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) suşları ve antifungal aktivitede *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) ve bir maya *Candida albicans* (ATCC 10239) kullanıldı.

Antioksidan aktivite DPPH metodu kullanılarak yapıldı ve IC<sub>50</sub> değerleri metanol, etanol ve petrol eter ekstraları için sırasıyla 111,2±0,2; 148±0,4; 346,25±0,3 µg/mL olduğu tespit edildi. Total fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu metoduyla incelenmiş olup, metanol ekstresinin en yüksek total fenol miktarına sahip olduğu belirlendi (162,8 mgGA/gr). Alüminyum Klorür (AlCl<sub>3</sub>) Kolorimetrik Metodu kullanılarak etanol ekstresinin 32,32 mgCatachol/gr total flavonoid miktarı ile en yüksek konsantrasyonda flavonoid içerdiği tespit edildi. HPLC analizi sonucunda etanol, metanol ve petrol eter ekstralarında bulunan fenolik bileşikler tespit edildi ve elde ettiğimiz sonuçlarla tartışıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Lamium purpureum* var. *purpureum*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite

## ABSTRACT

### DETERMINING ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS OF DIFFERENT SOLVENT EXTRACTS OF *LAMIUM PURPUREUM* L. VAR. *PURPUREUM*

Esra SOLMAZ

Balıkesir University, Institute of Science

Department of Biology

(MSc Thesis/Supervisor : Assis.Prof.Dr. Tülin AŞKUN)

Balıkesir, 2009

*L. purpureum* var. *purpureum* L. (purple dead-nettle) is a herbaceous plant, about 20 cm long, with opposite petiolated leaves, the inflorescence is a dense verticillaster of pinkish flowers; the bracts typically show a dark purple stripe. In local folk medicine, it is used as tonics and for the treatment of constipation.

In our study, we determined antimicrobial activity of methanol, ethanol and petroleum ether extracts of *L. purpureum* var. *purpureum* by using methods to determine MIC and MBC/MFC values against microorganisms. Results of antimicrobial activity, methanolic extract exhibited effective inhibition against *B. cereus* (1,56 mg/mL) and strong fungicide activity against *F. proliferatum* (12,5 mg/mL), ethanolic extract showed inhibition against *B. cereus* (1,56 mg/mL) and bactericidal effect against *P. aeruginosa* significantly, in case petroleum ether extract showed moderate antibacterial activity against *B. cereus*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *A. niger* and *F. proliferatum* (6,25 mg/mL), showed bactericidal effect against *E. coli* and fungicide effect on *F. proliferatum*. All extracts showed antimycobacterial activity at 380 µg/mL concentration.

*Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) and *Bacillus cereus* (CCM 99) for antibacterial activity; *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) for antimycobacterial activity and for antifungal activity *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) and a yeast *Candida albicans* (ATCC 10239) species were used.

Free radical scavenging activity was evaluated using DPPH (2-2 diphenyl-1-picryl hydrazil) free radical. Methanolic extract of *L. purpureum* var. *purpureum* exhibited antioxidant activity significantly. The total phenolic content was determined by using the Folin-Ciocalteu assay. Also the content of total flavonoids was measured spectrophotometrically by using the AlCl<sub>3</sub> colorimetric assay. Methanolic extract of our plant showed the highest total phenolic content (162,8 mgGA/gr). The greatest total flavonoid content was revealed in ethanolic extract (32,32 mgCAT/gr). We determined phenolic compounds of each extracts (methanolic, ethanolic and petroleum ether) with HPLC analyze and discussed with our experimental conclusion.

**Key words:** *Lamium purpureum* var. *purpureum*, 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	Tanım	1
1.2	<i>Lamium</i> L. Cinsi	2
1.2.1	Tanım	2
1.2.2	Türkiye’de Yetişen <i>Lamium</i> Türleri	3
1.2.3	<i>Lamium</i> Cinsinin Kimyasal Bileşenleri	4
1.2.4	<i>Lamium</i> Cinsinin Kullanım Alanları	6
1.3	<i>Lamium purpureum</i> L.	7
1.3.1	Halk Arasında İsimlendirme	7
1.3.2	Yabancı Dillerdeki Adları	7
1.3.3	Tür Özellikleri	7
1.3.4	Yayılış ve Habitat	8
1.3.5	Kimyasal İçeriği	8
1.3.6	Kullanım Alanları	9
1.4	<i>Lamium purpureum</i> L. var. <i>purpureum</i> L.	10
<b>2</b>	<b>ARAÇLAR VE YÖNTEMLER</b>	<b>13</b>
2.1	Bitki Örneğinin Hazırlanışı	13
2.2	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı	14
2.3	Kullanılan Mikroorganizmalar	16
2.4	Kullanılan Besiyerleri	17
2.4.1	Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri	17
2.4.2	Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyeri	18
2.4.2.1	Midllebrook 7h9 Broth Base	18
2.5	Serum Fizyolojik Hazırlanışı	19
2.6	İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanması	19
2.7	Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltisinin Hazırlanması	20
2.8	Antibakteriyal ve Antifungal Aktivite	20
2.8.1	Disk Difüzyon Yöntemi	20
2.8.2	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu belirleme (MIC).	21
2.8.3	Minimum Bakterisit ve Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MBK VE MFK).	22
2.9	Antitüberküloz (Antimikobakteriyal) Aktivite	22
2.10	Antioksidan Aktivite	23

2.10.1	DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) Methodu	23
2.10.2	Total Fenol Miktar Tayini	24
2.10.2.1	Folin-Ciocaltaeu Yöntemi	24
2.10.3	Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	24
2.10.3.1	Alüminyum Klorür (AlCl <sub>3</sub> ) Kolorimetrik Methodu	24
2.11	HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography)	25
2.12	Kullanılan Cihazlar	26
<b>3</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>27</b>
3.1	Antibakteriyal ve Antifungal Aktivite Bulguları	27
3.1.1	Disk Difüzyon Yöntemi Bulguları	28
3.1.2	MIC, MBK ve MFK Bulguları	29
3.2	Antitüberküloz Aktivite Bulguları	36
3.3	Antioksidan Aktivite Bulguları	36
3.3.1	DPPH Yöntemi Sonuçları	36
3.3.2	Total Fenol Yöntemi Bulguları	37
3.3.3	Total Flavonoid Yöntemi Bulguları	38
3.4	HPLC Bulguları	39
<b>4</b>	<b>SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>EKLER</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>51</b>

## ŞEKİL TABLOSU

Şekil No	Şekil	Sayfa
Şekil.1.1	<i>Lamium purpureum</i> var. <i>purpureum</i> L.	10
Şekil 2.1	Bitki örneğinin kurutulma aşaması	14
Şekil 2.2	Bitkinin çeşitli çözücüler içerisinde bekletilmesi	14
Şekil 2.3	Dönerli buharlaştırıcı	15
Şekil 2.4	Malt agar üzerinde <i>Fusarium proliferatum</i> 3 nokta ekimi	17
Şekil 3.1	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> ekstralarının MIC sonuçlarına ait fotoğraflar	31
Şekil 3.2	Etanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	32
Şekil 3.3	Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	33
Şekil 3.4	Petrol eter ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar	34
Şekil 3.5	Antitüberküloz aktivite MIC sonuçlarına ait fotoğraflar	35
Şekil 3.6	Antitüberküloz aktivite MBK sonuçlarına ait fotoğraflar	35
Şekil 3.7	Gallik asit kalibrasyon grafiği	37
Şekil 3.8	Katakol kalibrasyon grafiği	38
Şekil 4.1	Disk difüzyon metodu sonuçları karşılaştırılması	41
Şekil 4.2	Metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının MIC değerlerinin karşılaştırılması	42
Şekil 4.3	Metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının MBK ve MFK değerlerinin karşılaştırılması	43
Şekil 4.4	% İnhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	45
Şekil A-1	HPLC standart kromatogramı	47
Şekil A-2	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol ekstresi HPLC kromatogramı	48
Şekil A-3	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> etanol ekstresi HPLC kromatogramı	49
Şekil A-4	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> p. eter ekstresi HPLC kromatogramı	50

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	<i>Lamium purpureum</i> var. <i>purpureum</i> bitki türüne ait bilgiler	13
Çizelge 2.2	Ekstrasyon işlemine ait bilgiler	16
Çizelge 2.3	Antibakteriyal ve antifungal aktivitede kullanılan besiyerleri	18
Çizelge 3.1	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları	27
Çizelge 3.2	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> etanol ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları	28
Çizelge 3.3	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> petrol eteri ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları	28
Çizelge 3.4	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol ekstresinin MIC,MBK ve MFK değerleri	29
Çizelge 3.5	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> etanol ekstresinin MIC, MBK ve MFK değerleri	30
Çizelge 3.6	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> petrol eter ekstresinin MIC, MBK ve MFK değerleri	30
Çizelge 3.7	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> bitki ekstrelerinin antitüberküloz aktivite sonuçları	36
Çizelge 3.8	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol, etanol ve petrol eter ekstrelerinin IC <sub>50</sub> değerleri	36
Çizelge 3.9	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> bitki ekstrelerinin %inhibisyon değerleri	37
Çizelge 3.10	<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> bitki ekstrelerinin total fenol miktarları	38
Çizelge 3.11	<i>L.purpureum</i> var. <i>purpureum</i> ekstrelerinin total flavonoid miktarları	39
Çizelge 3.12	Metanol, etanol ve petrol eter ekstresinde bulunan fenolik maddeler	39



## KISALTMA LİSTESİ

<b>Kısaltma</b>	<b>Açılımı</b>
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimum Bakterisit Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungusit Konsantrasyonu
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	Ultra viyole-Görünür Bölge

## ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, düzenlenmesi ve deneylerimin yürütülmesi aşamalarında bilimsel desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tülin AŞKUN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Beni dinleyip, tez ile ilgili sorunlarımın çözümünde yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen değerli dekanımız Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a; tür teşhisi aşamasında bana zamanlarını ayıran değerli hocalarım Prof. Dr. Güleendam TÜMEN, Prof. Dr. Bayram YILDIZ ve Doç. Dr. Fatih SATIL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarında laboratuvarlarını kullandığım Araş. Gör. Sema ÇARIKÇI başta olmak üzere Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi(BÜTAM) çalışanlarına ve Mehmet E. DİKEN'e teşekkür ederim.

Tez çalışması sırasında yorgunluklarımızı ve hayatsal çıkmazlarımızı birlikte çekilebilir hale getirip, birlikte neşelendiğimiz değerli dostlarım Cihan BARAK ve Sevilay Azparlak BARAK'a yürekten teşekkürler.

Dün gibi aklımda üniversitemin 1. senesi, dün gibi aklımda geçirdiğimiz tam 6 yıl. Birlikte gülüp birlikte ağladığımız değerli dostum, ev arkadaşım Müge PEHLİVAN'a yürekten teşekkürler.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve bütün sıkıntılarımı paylaşan, desteğiyle bana güç veren, gülümseten Feyzullah TOKAY'a yürekten teşekkürler.

Üniversite hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili babam Nazif SOLMAZ'a, sevgili ağabeylerim Nedim SOLMAZ ve Metin SOLMAZ'a, biricik ablam Arzu PAK ve ikizim Aslı DÖNGEL'e; kardeş kuzenlerim Efsun ZENGİN ve Gizem GEMİCİ'ye, teyzelerim ve anneannem Fatma ALİMANOĞLU'na sonsuz teşekkürler.

İdeallerimin, hayallerimin ve hedeflerimin sahibi, yolumda ışığım kuvvetim, elim, ayağım, her şeyim olan biricik Annem Nevin SOLMAZ'a minnettarım.

**Balıkesir, 2009 Esra SOLMAZ**

## **1. GİRİŞ**

### **1.1 Lamiaceae Familyası**

#### **1.1.1. Tanım**

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].

## 1.2 *Lamium* L. Cinsi

### 1.2.1 Tanım

Tek yıllık ve çok yıllık otsu bitkileri içeren geniş bir cins grubudur. Dünyada Avrupa, Asya ve Afrika Kıtalarına yayılmış 40 türü bulunmaktadır [4]. Türkiye florasında 30 tür ile temsil edilmektedir. Çoğunlukla Batı ve Güney Anadolu'da yaygındır. Bunun yanında diğer bölgelerde de rastlanmaktadır [5].

Yapraklar ovattan reniforma, yaprak kenarları krenattan dentata kadar değişen şekillerde. Brakteoller mevcut, kaliks tüpünden genellikle daha kısa veya eşit uzunlukta. Kaliks tüpsü yada çan şeklinde, 5 damarlı; genellikle 5 eşit dişe sahip; nadiren 3'ü uzun, 2'si kısa dişli.

Korolla mor, açık mor, pembe, krem veya beyaz, 2 dudaklı; tüp iç tarafta halka şeklinde tüylü veya tüysüz, genellikle boğazda seyrelmiş; üst dudak miğferli, tamdan ikiye ayrılmış şekilde değişken şekillerde; alt dudak 3 loblu, yandaki loblar genellikle küçülmüş, bazen küçük ekler taşır. Orta lob daha büyük, emarginat, altta kısa bir sap şeklinde daralmış, küçük oymalı veya tam, genellikle göze çarpan renkte leke ve izlere sahip.

Stamenler 4 adet, alttaki çift üsttekinden daha uzun. Anter tekaları dikey-yatık ve tüylü. Stilus ikiye yarık. Meyveler 3 yüzlü, dar açılı, genellikle tepede az veya çok trunkat, düz, siğilli veya kurtsu kabarcıklı [5].

### 1.2.2 Türkiye’de yetişen *Lamium* türleri

*Lamium lycium* Boiss.

*Lamium cariense* R. Mill

*Lamium pisidicum* R. Mill

*Lamium tenuiflorum* Fisch&Mey.

*Lamium garganicum* L.

subsp. *striatum* (Sm.) Hayek

subsp. *reniforme* (Montbret&Aucher ex Benth)

subsp. *nepetifolium* (Boiss.)

subsp. *laevigatum* Arcangeli

subsp. *rectum* (Scheng)

subsp. *lasioclades* (Staph)

subsp. *pulchrum* R. Mill

*Lamium veronicifolium* Benth

*Lamium microphyllum* Boiss.

*Lamium cymbaleriifolium* Boiss.

*Lamium sandrasicum* P. H. Davis

*Lamium armenum* Boiss.

subsp. *armenum*

subsp. *sintensisii* R. Mill

*Lamium eriocephalum* Benth

*Lamium amplexicaule* L.

*Lamium macrodon* Boiss.&Huet

*Lamium aleppicum* Boiss.&Hauskn.

*Lamium ehrenbergii* Boiss.&Reuter

*Lamium purpureum* L.

var. *purpureum*

var. *aznavourii* Gand. ex Aznav.

*Lamium maculatum* L.

var. *villosifolium* R. Mill

*Lamium gundelsheimeri* C. Koch

*Lamium truncatum* Boiss.

*Lamium album* L.

*Lamium cirinitum* Montbreth&Aucher ex Benth

*Lamium leucolophum* Hausskn. ex R. Mill

*Lamium tomentosum* Wild.

var. *tomentosum* Syn: *L. vestitum* Benth

var. *filicaule* (Boiss. ex Benth) Boiss.

var. *hakkiarense* (Nab.) R. Mill

var. *alpestre* (Trautv.) N. Popova Syn.: *L. alpestre* Trautv.

*Lamium sulfureum* Hausskn.&Sint. ex R. Mill

*Lamium moschatum* Miller

var. *moschatum* Syn.: *L. calycinum* d'Uvr.

var. *rhodium* (Gand.) R. Mill

var. *micranthum* Boiss

*Lamium galactophyllum* Boiss.&Reuter

*Lamium ponticum* Boiss.&Bal. ex Boiss. [6].

### 1.2.3 *Lamium* Cinsinin Kimyasal Bileşenleri

1967'den bu yana *Lamium* türlerinin içeriğinde bulunan bileşikler izole edilerek etnobotanikal ve farmakolojik özellikleri çalışılmaktadır. Bütün bu çalışmaların sonucunda *Lamium* türlerinin iridoidler, sekoiridoidler, fenilpropanoidler, flavonoidler, antosiyaninler, fitoekidsteroidler, betainler, benzoksazinooidler, terpenler ve megastigmen bileşiklerinin yanı sıra az da olsa uçucu yağlarını içerdiği bildirilmektedir [4].

*Lamium* türleri çok az uçucu yağı taşıyan Lamiaceae familyası üyeleridir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bu türlerin toprak üstü kısımlarının ve çiçeklerinin uçucu yağ verimleri % 0,01-0,31 arasında değişmektedir [4]

*Lamium* cinsinin kimyasal içeriği incelendiğinde germacrene D bileşiğinin temel bileşen olarak öne çıktığı görülmektedir. Bunun yanında trans-chrisanthenil asetat,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene, (Z)-ocimene, metil salisilat,  $\beta$ -karyofillen, sabinene ve  $\alpha$ -humulene bu cinste bulunan diğer önemli bileşenlerdir [7,8].

Beyaz ballıbaba olarak bilinen *Lamium album* türünün flavanoidleri, terpenleri ve iridoid glikozitleri içerdiği yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur.

Sarker ve arkadaşları çalışmalarında bu bitki türünün C-13 glikozitlerini bulundurduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda yapraklarının metanol ekstresi kromatografisi sonucunda bitki türünün glukopranosiloksi-5-megastigmen-4-one glikozitini içerdiği bulunmuştur [9]. Yapılan başka bir çalışmada bu bitki türü çiçeklerinin yeni bir fenilpranonoid olan lamalbosid ve bilinen acteosit, *p*-coumaroylglukosit, etilrosit, 5-caffeoylquinik asit (klorojenik asit), rutosit, quersetin ve kaempferol 3-*O*-glukozit bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir [10].

*L. purpureum* ve *L. garganicum* uçucu yağlarının temel bileşenlerinin incelendiği bir çalışma sonucunda *L. purpureum* türünün 1-Octen-3-ol, fenetilalkol, *o*- ve *p*-cresoller, guajakol ve eugenol temel bileşenlerini içerdiği, *L. garganicum* uçucu yağının ise 1,8-sineol (% 47.55 toplam uçucular ),citronelal (% 25.12) ve isoeugenol (% 11.81) bileşenlerini içerdiği tespit edilmiştir [7].

*L. bifidum* türünün uçucu yağı bileşenlerinin belirlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada % 91,4 terpen hidrokarbonlar, % 60,1'nin seskuterpenler, % 31,4'nün ise monotorepenlerden oluştuğu belirlenmiştir [8]. *L. amplexicaule*, *L. purpureum* ve *L. garganicum* etanol ekstrelerinin kimyasal içeriğinin incelendiği bir çalışmada *Lamium* türleri için yeni olan 4 farklı iridoid bileşeni bulunmuştur [11]. Yalçın ve grubunun yaptığı benzer bir çalışmada *Lamium eriocephalum* subsp. *eriocephalum*, *L. garganicum* subsp. *pulchrum*, *L. garganicum* subsp. *laevigatum* ve *L. purpureum* var. *purpureum* türlerinin bütanol ekstrelerinin iridoid bileşenleri incelenmiş ve HPLC-ESI/MS sonucunda *L. garganicum* subsp. *laevigatum* türünün iridoidlerce en zengin tür olduğu tespit edilmiştir [12].

*L. maculatum* bitki türünün kimyasal bileşenlerinin incelendiği bir çalışma sonucunda 20-hidroksi ekidzon, acteoside, 3,7-dihydroxyquercetin, rutin gibi flavonoidler ve steroller içerdiği bulunmuştur [13].

*L. amplexicaule* türünün % 52.6 oranında terpen hidrokarbanları, % 10.3 monoterpenler, % 42.3 sesquiterpenleri içerdiği tespit edilmiştir. Bu türde diğer *Lamium* türlerinde olmayan transcrisantenil asetat yüksek miktarda bulunmaktadır [8].

#### 1.2.4. *Lamium* Cinsinin Kullanım Alanları

Genel olarak bu cins bitkileri gösterdikleri farmakolojik ve çeşitli fizyolojik özelliklerinden dolayı travma, çatlaklar, felç, hipertansiyon rahatsızlıklarının yanında menoraji ve rahim içi kanamaları gibi kadın hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır [4]. İlaç özelliklerinin yanı sıra bu bitki türleri yemeklerde katkı maddesi olarak tüketilmektedirler. Örneğin Japonya'da *Lamium amplexicaule* türü genellikle pirinç ile tüketilen bir bitki türüdür [8].

Bazı *Lamium* türleri antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve antispazmatik özelliklere sahiptirler [14].

Cinsin en fazla kullanılan türü olan *L. album* çiçekleri, kuvvetlendirici, kan durdurucu, kas gevşetici, antiproliferatif ve antiinflamatuvar özellikleri ile bilinir [11]. Astrenjan (kan durdurucu) özelliğinden dolayı kadınların menstrual döngü zamanlarında aşırı kanama durumlarında, uterus kanamalarında, vajinal ve servikal iltihaplı akıntı durumlarında tedavi edici olarak kullanılır ve bu özellikleriyle kadın hastalıklarının iyileştirilmesinde oldukça önemli olan bitki türüdür [15].

Anadolu'da bu cinse ait *Lamium album*, *L. maculatum* ve *L. purpureum* türleri romatizmal ağrıların dindirilmesi ve kabızlığın giderilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca Türkiye florasında bulunan *L. eriocephalum* subsp. *eriocephalum*, *L. garganicum* subsp. *laevigatum*, *L. garganicum* subsp. *pulchrum* ve *L. purpureum* var. *purpureum* türlerinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin varlığı tespit edilmiştir [16].

*Lamium maculatum* türünün toprak üstü kısımları Çin'de çeşitli yaraların iyileştirilmesi, paralizi (felç) ve travma hastalıklarını tedavi edilmesi amacıyla kullanılmaktadır [13].



*L. garganicum* subsp. *laevigatum* uçucu yağının gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı bakteriyostatik etkili olduğu bulunmuştur. *L. eriocephalum* subsp. *eriocephalum* türünün antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir [17].

Mathowski ve arkadaşları (2006), bazı Lamiaceae türlerinin antioksidan ve radikal süpürücü aktiviteleri incelemişler ve bu türler içerisinde bulunan *L. album* ve *L. purpureum* bitki türlerinin çiçeklerinde bulunan flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinde önemli rol oynadıkları kanısına varmışlardır [16].

*Lamium amplexicaule* bitki türünün kabızlığı giderici, uyarıcı, terletici, romatizma ve grip rahatsızlıklarını tedavi edici olarak kullanıldığı bilinmektedir [18].

Dulger ve arkadaşları, *Lamium tenuiflorum* etanol ekstresini *Candida* ve *Cryptococcus* türlerine karşı antifungal aktivitesini çalışmışlar ve sonucunda MIC değerlerini 3.12-25 mg/mL konsantrasyon aralığında bulmuşlardır. Bütün ekstrelerin *Candida*'ya karşı daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir [19].

### **1.3 *Lamium purpureum* L.**

#### **1.3.1 Halk Arasında İsimlendirme**

*Lamium* türleri Türkiye'nin her tarafına yayılmış ve oldukça geniş kullanıma sahip tıbbi bitkilerdendir. *L. purpureum* halk arasında kırmızı ballıbaba, ballıbaba, balıcak ve emzik gibi isimlerle anılmaktadır.

#### **1.3.2 Yabancı Dillerdeki Adları**

Mor ballıbaba, Mor ısırgan otu ve Henbit isimleriyle bilinir.

### 1.3.3 Tür Özellikleri

Tek yıllık, gövde boyu 4-35 cm, yaprakları genellikle ovat, ovat-reniform ya da suborbikular, (3-)5-25 x3-20 mm, obtüs, kordattan trunkata, krenat veya double krenat, pubescent- piloz; petolt (3-)10-25(-40) mm. Brakte yapraklara benzer, vertisillatlar (1-)2-3(-6), (4)6(-10)- çiçekli, az uzaklıkta, üst üste veya sıkışık. Kaliks (4-)6-8(-10) mm; tüp (2-)3-4(-5) mm, glabroustan puberulente; dişler (2-)3-4(-5) mm, pilöz veya plumoz, bazen aristat.

Korolla morumsu pembemsi, beyazımsı tüp, nadiren hepsi beyaz, 10-22 mm; tüp 6,5- 16 mm, düz ya da tabanı genukulat. Üst dudak (2,5)4,5-6,5 mm, tamamı, alt dudak yan loblar 0,2-0,5 mm dişlere indirgenir. Meyveleri 1,9-2,5x1,0-1,5 mm, beyaz noktacıklı, zeytin kahverengindedir.

*Lamium purpureum* iki varyeteye ayrılır.

1. Kaliks dişleri (2-)3-4(-5) mm, aristat ve pulumoz değil.

**var. *purpureum***

2. Kaliks dişleri 4-7 mm, aristat ve pulumoz

**var. *aznavourii* [6]**

### 1.3.4 Yayılış Ve Habitat

30-1700 metre arası yükseltilerde, Kırklareli, Edirne, Çanakkale, İstanbul, Bolu, Sakarya, Kastamonu, Zonguldak, Amasya, Manisa, Samsun, Tokat, Trabzon, Eskişehir illerinde yayılış gösterir.

Meşe ve çam ormanları, eğimli araziler, çakıllı nehir kıyılarında, boş araziler gibi habitatlarda yetişirler [6].

### 1.3.5 Kimyasal İçeriği

Bu bitki türünün uçucu yağları % 43.7 terpen ve % 47.1 sesquiterpen hidrokarbonlarından oluşur. Terpen alkoller (linalool and 4-terpineol), non-terpen alkoller ve ketonlar eser miktarda bulunur. Non-terpen aldehitler bu türlerde % 4,1'lere kadar çıkarken *Lamium* cinsine ait diğer türlerde çok az miktarlarda bulunurlar (% 0,8-1,5). Aynı zamanda bu bitki türünün 6,8 ve 5,6,8 pozisyonlarında hidroksillenmiş lamiol, deoxylamiol, lamioside iridoid bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir [14].

*L. purpureum* tohum yağının %16 oranında octadeca-5,6-trans-16-trienoic asit (lamenallenik asit) içerdiği bulunmuştur [20].

*L. purpureum* uçucu yağının germacrene (% 35,4),  $\beta$ -pinene (% 26,8), ve  $\alpha$ -pinene (% 13,4) bileşenlerini içerdiği tespit edilmiştir.

### 1.3.6 Kullanım Alanları

*Lamium purpureum* bitkisi Anadolu'da bağırsak hareketlendirici ve kuvvetlendirici ilaç olarak kullanılmaktadır [21]. Aynı zamanda prostat tedavisi içinde tüketilmektedir [22].

#### 1.4 *Lamium purpureum* L. var. *purpureum* L.



Şekil 1.1 *Lamium purpureum* var. *purpureum*

*Lamium purpureum* var. *purpureum* antiinflamatuvar ve antinoseptik özelliklere sahiptir. Bu bitki türünün bütanol ekstresi ile yapılan antiinflamatuvar aktivite çalışmaları sonucunda %21.5 ( $p < 0.05$ ) değerinde inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. 200 mg/kg dozda gastrik zarar vermeden farelerde yüksek antiinflamatuvar ve antinoseptik özellik göstermiş olduğu bulunmuştur ve bu aktiviteleri içeriğinde bulunan iridoid ve fenolik bileşiklere bağlanmıştır [17].

*L. purpureum* var. *purpureum* ile yapılan başka bir çalışmada, metanol, diklorometanol, n-butanol ve su ekstraları hazırlanarak bu ekstraların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivitesi iki Gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*), iki Gram negatif bakteri (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve 3 tane mayaya (*Candida albicans*, *C. kruse* ve *C. parapsilosis*) karşı denenmiş olup mayalara bakterilerden daha iyi etki gösterdiği bulunmuştur [21].

Çalışmamızda, *Lamium purpureum* L. var. *purpureum* L. türünün metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının antibakteriyal, antifungal, antitüberküloz ve antioksidan aktivitelerini içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerle inceledik. Bu bitki türünün uçucu yağı bileşenleri verildiği halde metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının fenolik bileşenleri konusunda bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun dışında bitkinin sadece metanol ekstresi çeşitli mayalara ve bakterilere karşı çalışılmış, etanol ve petrol eter ekstralarının küflere, *Candida albicans* mayasına ve diğer bakterilere nasıl etki gösterdiği konusunda makale bulunmamıştır. En önemlisi de antimikobakteriyal aktivitesi hiç bilinmemekte olup bu konuda çalışmamız, çağımızın hastalığı olan tüberküloz sorununa karşı yeni ilaç arayışlarına katkıda bulunmaktadır. Yapılan literatür taraması sonucunda bitkinin yalnızca metanol ekstresinin antioksidan aktivitesi DPPH metoduyla incelenmesine rağmen etanol ve petrol eter ekstralarının antioksidan aktivitesi hakkında çalışma bulunmamaktadır. Biz DPPH metodunun yanı sıra metanol, etanol ve petrol eter ekstralarındaki total fenol ve total flavonoid miktarlarını belirleyerek bitki türünün bilinmeyen özelliklerini açıklamaya çalıştık.

Çalışmamızın amaçlarından bir tanesi her geçen gün antibiyotiklere karşı direnç gösteren patojen bakterilere karşı etkili maddelerin keşfini sağlamaktır. Mikrobiyal aktivite, besinlerin bozulması ve besin değerlerini kaybetmesine neden olan birincil etkindir. Patojenik ve besinlerin bozulmasına sebep olan mikroorganizmaların artması besin kaynaklı hastalıkların çoğalmasına olanak verir. *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* türleri, besin zehirlenmelerinden ve kalp, akciğer, kemik iliği, idrar yolları iltihaplarından sorumlu olan bakteri türlerindedir [23]. Hem besinlerin korunması hem de çeşitli rahatsızlıklara etkili çözüm olması açısından doğal antimikrobiyallerin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmaların aynı zamanda mikotoksin ve aflatoksin üreten funguslar üzerine yapılması da ayrı bir önem arz etmektedir. Çünkü aflatoksin üreten *Aspergillus* türleri de hem ekonomik zarara hemde çeşitli hastalıklara neden olurlar.

Antioksidan aktivite çalışmamızın amacı ise serbest radikallerin indirgenmesini sağlayan doğal antioksidanların keşfedilmesi açısından büyük önem arz etmektedir.

*L. purpureum* var. *purpurem* bitki türünün antitüberküloz aktivitesini çalışarak, çağımızın rahatsızlığı olan Tüberküloz mikrobuna karşı bulunmaya çalışılan yeni tedavi yöntemlerine katkıda bulunmayı amaçladık.

## 2. ARAÇLAR VE YÖNTEMLER

### 2.1 Bitki Örneğinin Hazırlanışı

Balıkesir ilinden toplanan *Lamium purpureum* var. *purpureum* L. bitki türü oda koşullarında ışık almayan alanda 20-25 gün bekletilerek kurutuldu (Şekil 2.1). Bitki türünün identifikasyonu Prof. Dr. Gülendem TÜMEN ve Prof. Dr. Bayram Yıldız tarafından yapıldı. Bitkimiz biyoloji bölümü Balıkesir Üniversitesi herbaryumunda bulunmaktadır. Çizelge 2.1’de bitkinin toplandığı yer, zaman, yükseklik bilgileri ve herbaryum numarası verilmiştir.

Çizelge 2.1 *Lamium purpureum* var. *purpureum* bitki türüne ait bilgiler

Bitkinin adı	Toplandığı yer	Tarih	Herbaryum numarası	Yükseklik(m)
<i>Lamium purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	Toygar Mahallesi/BALIKESİR	22.03.09	FS1510	150



**Şekil 2.1** Bitki örneğinin kurutulma aşaması

## 2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Bitki iyice kurutulduktan sonra belli bir miktar tartılarak yaklaşık 20 gün boyunca çözücü içerisinde bekletildi (Şekil 2.2).



**Şekil.2.2** Bitkinin çeşitli çözücüler içerisinde bekletilmesi



20 günlük bekleme sürecinin ardından vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı kullanılarak ekstre alım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Cihazın sıcaklığı bütün çözücülerin kaynama noktası sıcaklığına bağlı olarak farklı derecelere ayarlandı. Çizelge 2.2’de, kullanılan bitki, çözücü ve elde ettiğimiz ekstre miktarı, cihazın sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi bilgileri verilmiştir.

Elde edilen ekstrede kalan çözücünün uzaklaştırılarak konsantre hale gelmesini sağlamak için 40°C kurutma dolabında 2-3 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 2.3** Dönerli Buharlaştırıcı

**Çizelge 2.2** Ekstraksiyon işlemine ait bilgiler

Çözücü	Bitki miktarı (gr)	Çözücü miktarı (mL)	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (saat)	Ekstre miktarı (gr)
Petrol eter	65	750	55	4	1,4
Metanol	186	1000	55	4	2,5
Etanol	160	1000	75	7	2,9

### 2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

*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. Bitki ekstraktları antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra)'a karşı denendi.

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.



Şekil 2.4 Malt agar üzerinde *Fusarium proliferatum* 3 nokta ekimi

## 2.4 Kullanılan Besiyerleri

### 2.4.1 Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Ticari olarak satın alınan hazır toz besiyerlerinden Çizelge 2.3'te verilen miktarlarda tartım alınarak 1 L distile suda çözüldükten sonra manyetik ısıtıcıda berraklaşınca kadar kaynatıldı.

Agar içeren besiyerleri petri ve tüpte olmak üzere 2 tipte hazırlandı. Kaynatılma işleminden sonra petride besiyeri hazırlamak için öncelikle 15dk 121°C'de sterilizasyon işlemi yapıldı ve beg alevi yanında besiyeri 10 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırıldı.

Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanma işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak yerleştirilerek donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklandı.

Broth besiyerleri kaynatılma işleminden sonra 1,5 atm basınç altında 15 dk 121 °C'de steril edilerek tüplere paylaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklandı.

**Çizelge 2.3** Antibakteriyal ve Antifungal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	Marka	Kullanılan miktar (gr)	Distile su miktarı (lt)	pH	Kullandığımız alan
<b>Nutrient broth</b>	Fluka	8	1	6.8±0.2	Antibakteriyal aktivitede MIC belirleme
<b>Nutrient agar</b>	Fluka	28	1	6.8±0.2	Antibakteriyal aktivitede MBK değeri belirleme ve disk difüzyon yöntemi, yatık agar kültüre alma işlemi
<b>Sabouraud dekstroz broth</b>	Merck	30	1	5.6±0.2	Antifungal aktivitede MIC belirleme
<b>Sabouraud dekstroz agar</b>	Merck	65	1	5.6±0.2	Antifungal aktivitede MFK belirleme ve disk difüzyon yöntemi
<b>Malt ekstrakt agar</b>	Merck	60	1	7.6±0.2	Antifungal aktivitede yatık agarda küflerin kültüre alınması
<b>Patates dekstroz agar</b>	Merck	39	1	5.6±0.27	Antifungal aktivite'de MFK belirleme ve disk difüzyon yöntemi

## 2.4.2 Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyeri

### 2.4.2.1 Middlebrook 7H9 Broth Base

Antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis* kültürü ve pasajı için kullanılan özel besiyeridir. MGIT tüplerin dip kısmına gömülü olan silikon içerisinde oksijene duyarlı floresans sensörleri yer almaktadır. Ortamda bakteri üremeden önce bulunan oksijen varlığı floresansı görmemizi engeller. Ancak bakteri üredikten sonra ortamdaki oksijenin azalması nedeniyle UV ışığında (Wood'un lambası) 365 nm'de floresansın gözlemlenmesine imkan sağlar. Böylelikle üremenin olup olmadığı kontrol edilir.

## **2.5 Serum Fizyolojik Hazırlanışı**

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

## **2.6 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı**

Antibakteriyal 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.

Antifungal aktivitede fungus inokulumu 450 nm’de 0,6 absorbans değeri okunarak ayarlandı.

Antitüberküloz aktivite için Becton ve Dickinson üretici firmasının tavsiyelerine uyularak inokulum hem katı hem de sıvı BACTEC MGIT pozitif tüplerden prosedüre göre hazırlandı. Sıvı kültürden inokulum hazırlanırken BACTEC MGIT tüplerinin okunup pozitif çıkmasından sonraki gün 1. gün olarak kabul edildi. Gün 1 ve gün 2 hemen inokulum olarak kullanılabilirken Gün-3,4 ve 5 kültürlerden 1 ml alınıp 4 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlandı.

Katı kültürden inokulum hazırlanırken Middlebrook 7H9’da süspansiyon edilen örnek vortekslendikten sonra katı parçacıkların çökmesi beklenecek şekilde üstte kalan süpernatant kısmı steril tüpe aktarıldı ve MacFarland 0,5 oluncaya dek gözle ayarlama yapıldı. Daha sonra 1 ml alınıp 4 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlandı.

## **2.7 Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltisinin Hazırlanması**

Bakteri üremesini kontrol amaçlı olarak Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet üreme indikatörü kullanıldı. 0,04 gr Ledanitrotetrazolium violet tartılarak 5 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

## **2.8 Antibakteriyal ve Antifungal Aktivite**

### **2.8.1 Disk Difüzyon Yöntemi**

Bu yöntem ekstrenin mikroorganizma üzerine hangi konsantrasyonlar arasında etkili olduğunu bulmak amacıyla uygulandı.

24-48 saatlik taze bakteri kültürlerinden inokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra Nutrient Agar besiyeri bulunan petri plakları üzerine 100 µl süspansiyon, eküvyon çubuk yardımıyla yayıldı. Petri üzerine steril diskler yerleştirilip, diskler 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.

7-14 günlük taze fungus kültürleri kullanılarak inokulum hazırlandı. Aynı bakterilerde olduğu gibi inokulum Sabouraud Dekstroz Agar içeren petri plaklarına eküvyon çubuk yardımıyla yayıldı. Üzerine ekstre emdirilmiş diskler yerleştirildikten sonra 72-96 saat inkübasyona tabi tutuldu. Kontrol grubu olarak bakteriler için sulphamethoxazole trimethoprim ve küfler için amphotericin B antibiyotigini 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 [24].

### 2.8.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MIC)

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.

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

Bütün kuyucuklara 100 µl besiyeri konulduktan sonra birinci kuyucuğa 100 µl ekstre konuldu ve 6. kuyucuğa kadar bir önceki kuyucukta 100 µl ekstre çözeltisi alınarak seri şekilde seyreltme işlemi yapıldı.

Seyreltme işlemi bittiğinde kuyucuklardaki son ekstre konsantrasyonu 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 ve 1,56 mg/mL’lik olacak şekilde hazırlanmış oldu. Seyreltme işleminden sonra negatif kontrol hariç bütün kuyucuklara 10 µl inokulum süspansiyonu aşılandı. İçerisinde bitki ekstresi, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96-well plateler, 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 MIC değeri olarak alındı [24,25].

Bakterilerde MIC değerini saptamada Ledanitrotetrazolium violet (INT); 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, üreme 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 MIC değeri olarak alındı. Böylece minimum inhibisyon konsantrasyonu tespit edildi.

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

MIC 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 MBK değeri ve funguslarda MFK değeri olarak bulundu [24].

### **2.9 Antitüberküloz (Antimikobakteriyal) Aktivite**

Bu yöntemde, MGIT (Becton Dickinson) içerisinde modifiye edilmiş 4 ml Middlebrook 7H9 Broth Base kullanıldı. Besiyeri içerisine 500 µL OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) ve içeriği oldukça zengin olan besiyerinin, kontaminasyona açık olması sebebiyle 100 µL panta antibiyotiği eklendi. 96 well-plate kullanıldı. İlk kuyucuğa 175 µL, diğer kuyucuklara 100 µL besiyeri konuldu. Ekstreden ilk kuyucuğa 25 µL konularak ilk kuyucuğun konsantrasyonu 12,5 mg/mL olarak ayarlandı ve daha sonra % 50 seyreltilerek kuyucukların konsantrasyonları 12,5, 6,25, 3,12, 1,52, 0,76, 0,38, 0,19, 0,09 ve 0,05 mg/mL olarak hazırlandı. Ekstreler *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra suşuna karşı test edildi. İnokulumdan negatif kontrol hariç her kuyucuğa 10 µL ekildi. 3 seri olarak çalışıldı ve 37°C’de 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı [26].

MIC sonuçlarını belirlemek için ‘Alamar Blue’ isimli kimyasaldan her bir çukurcuğa 15µL konularak bir gün boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Bu süreçten sonra üreme olmayan çukurcuklar mavi renkte kalırken, üremenin gerçekleştiği çukurcuklar pembe rengini aldı.



Bakteri ve funguslarda olduğu gibi üremenin olduğu çukurcuktan bir önceki çukur konsantrasyonu MIC değeri olarak belirlendi. Üremenin gerçekleşmediği çukurlardan 15 µl alınarak 100 µl taze besiyeri içeren çukurlara alındı ve tekrar inkübasyona bırakıldı. 1 gün sonrasında MBK değeri, üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri olarak tespit edildi.

## 2.10 Antioksidan aktivite

### 2.10.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) Methodu

DPPH 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.

0,003 gr ekstre örneğinden tartılıp 3 mL metanolde çözülerek 1000 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltilerden 25, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarında standart dilüsyonları hazırlandı.

1,5x10<sup>-5</sup>M'lık DPPH çözeltisi, 0,0006 gr 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil'in 10 mL metanolde çözülmesiyle hazırlandı.

*Lamium purpureum* var. *purpureum* bitki türünün etanol, metanol ve petroleter ekstraktlarından 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 [27].

% inhibisyon değeri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ DPPH İNHİBİSYON DEĞERİ} = \frac{[CA - EA]}{CA} \times 100 \quad (2.1)$$

CA: Kontrol absorbansı

EA: Ekstrenin absorbansı

## **2.10.2 Total fenol Miktar Tayini**

### **2.10.2.1 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 çözeltilerden 1 mg/mL'lik dilüsyonu hazırlandı.

Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanışı: 20 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözüldü.

Gallik asit çözeltilerinin hazırlanışı: 0,25 gr gallik asit % 10'luk etanol içerisinde çözüldü. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak üzere 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L'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 [28].

## **2.10.3 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi**

### **2.10.3.1 Alüminyum Klorür(AlCl<sub>3</sub>) Kolorimetrik Methodu**

Bu methodta referans flavonoid olarak katekol kullanıldı.

Katekol çözeltilerinin hazırlanışı: 0,0125 gr katekol 25 mL %80 etil alkolde çözülerek 500mg/L konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltilerden kalibrasyon eğrisi oluşturulmak üzere 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/L'lik dilüsyonları hazırlandı.

Bitki ekstrelerinin hazırlanışı: Metanol, etanol ve petrol eter ekstrelerinin her birinden 0,005gr tartılarak 2 mL % 80 etil alkolde çözüldü. 2500 mg/L'lik konsantrasyonda olan stok çözeltilerden 1250 mg/L ve 500 mg/L konsantrasyon değerinde seyreltmeler hazırlandı.

500 µL ekstre yada katekol çözeltisi, 2 mL distile su ve 150 µL % 5'lik NaNO<sub>3</sub> ile iyice karıştırıldı. 5 dakika bekledikten sonra karışım içerisine 150 µL % 10'luk AlCl<sub>3</sub> eklendi. 6. dakikada 1 mL 1M NaOH eklendikten sonra 2,2 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 [29].

### **2.11. HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography)**

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak ifade edilir. Kolon kromatografi 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, çözgen 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.

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<sup>0</sup>C

Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre

Numunelerden 0,5 mg tartılıp 1 mL metanolde çözülerek cihaza verildi.

Pumps	CTD-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						

## 2.12 Kullanılan Cihazlar

Ekstrelerin özellikle antitüberküloz aktivite çalışmaları ve antibakteriyal 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.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1 Antibakteriyal ve Antifungal 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 ekstraları disklerle emdirilerek bakteri ve 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 eter ekstresi için 3.3’te mm cinsinden verildi.

**Çizelge 3.1** *L. purpureum* var. *purpureum* metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol ekstresi	Disk Difüzyon zon çapları(mm)		
	1,5mg/disk	0,75 mg/disk	K (25mg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	40±0
<i>Bacillus cereus</i>	11,5±0,6	8±0,8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,75±0,9	-	35±0
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	9,75±0,5	-	35±0
<i>Esherichia coli</i>	-	-	30±0
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	11±0,8
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	10±0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	14.5±1,7
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	9.25±0,9

**Çizelge 3.2** *L. purpureum* var. *purpureum* etanol ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> etanol ekstresi	Disk difüzyon zon çapları (mm)		
	1,5mg/disk	0,75mg/disk	K(25mg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	7±0	-	40±0
<i>Bacillus cereus</i>	10,3±1,3	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	35±0
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	11,5±1,3	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	13±1,2	-	35±0
<i>Esherichia coli</i>	-	-	30±0
<i>Candida albicans</i>	7,75±0,9	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	11±0,8
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	10±0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	14,5±1,7
<i>Fusarium proliferatum</i>	11±0	-	9,25±0,9

**Çizelge 3.3** *L. purpureum* var. *purpureum* petroleter ekstresi disk difüzyon metodu sonuçları

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> petroleter ekstresi	Disk difüzyon zon çapları(mm)		
	1,5mg/disk	0,75mg/disk	K(25mg/disk)
<i>Proteus vulgaris</i>	15,25±4,35	-	40±0
<i>Bacillus cereus</i>	14,75±3,86	10,25±0,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,0±0,81	-	35±0
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	8,25±0,5	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	9,75±0,5	-	35±0
<i>Esherichia coli</i>	9,0±0	-	30±0
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	11±0,8
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	10±0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	14,5±1,7
<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	9,25±0,9

### 3.1.2 MIC ve MBK/MFK Bulguları

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

**Çizelge 3.4** *L. purpureum* var. *purpureum* metanol ekstresinin MIC ve MBK/MFK değerleri

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> metanol ekstresi	MIC(mg/mL)	MBK/MFK(mg/mL)
<i>Proteus vulgaris</i>	50	>50
<i>Bacillus cereus</i>	1,56	>50
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	>50
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	25	50
<i>Klebsiella pneumonia</i>	25	>50
<i>Esherichia coli</i>	25	50
<i>Candida albicans</i>	50	>50
<i>Aspergillus niger</i>	12,5	25
<i>Aspergillus flavus</i>	25	>50
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12,5	50
<i>Fusarium proliferatum</i>	12,5	12,5

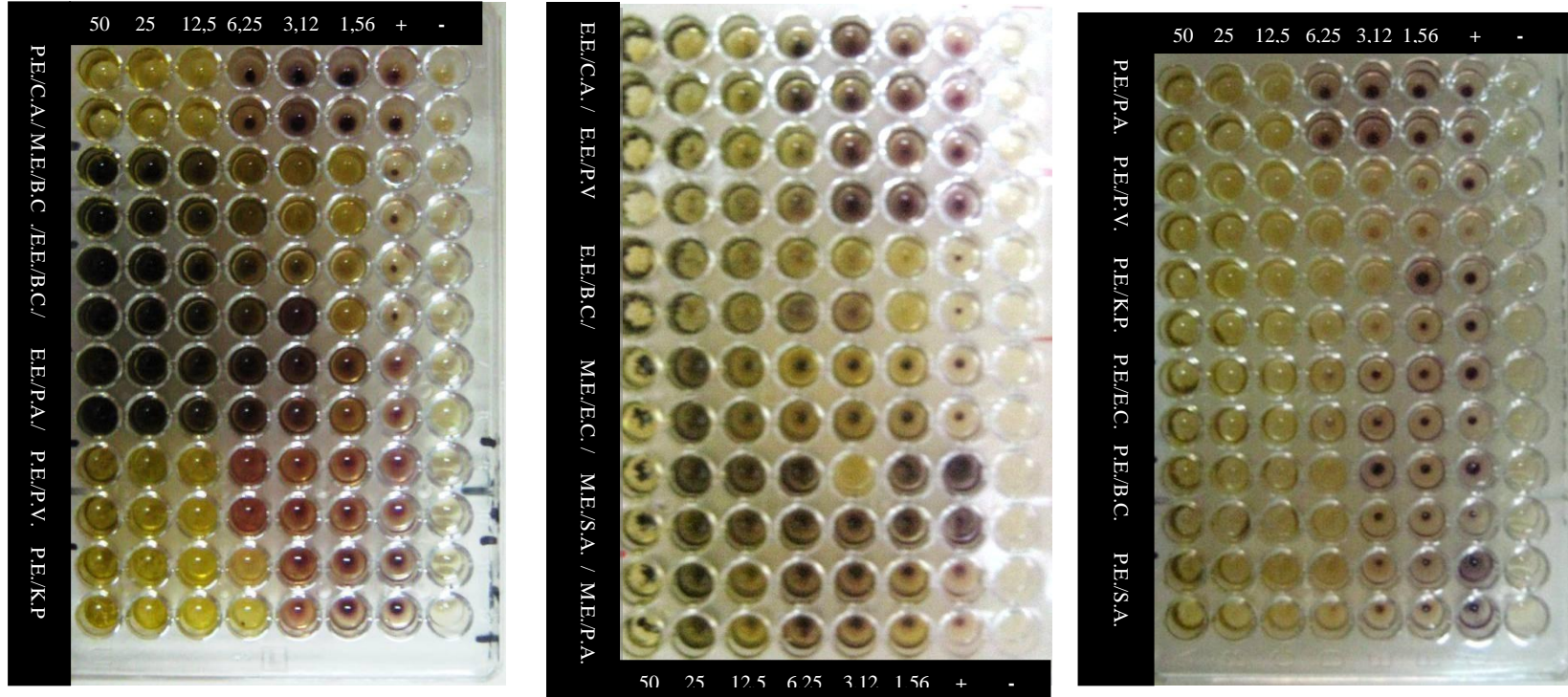
**Çizelge 3.5** *L. purpureum* var. *purpureum* etanol ekstresinin MIC ve MBK/ MFK değerleri

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> etanol ekstresi	MIC(mg/mL)	MBK/MFK (mg/mL)
<i>Proteus vulgaris</i>	6,25	>50
<i>Bacillus cereus</i>	1,56	>50
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	>50
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	12,5	12,5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	25	>50
<i>Esherichia coli</i>	25	>50
<i>Candida albicans</i>	12,5	>50
<i>Aspergillus niger</i>	25	25
<i>Aspergillus flavus</i>	25	>50
<i>Aspergillus ochrceus</i>	25	25
<i>Fusarium proliferatum</i>	25	50

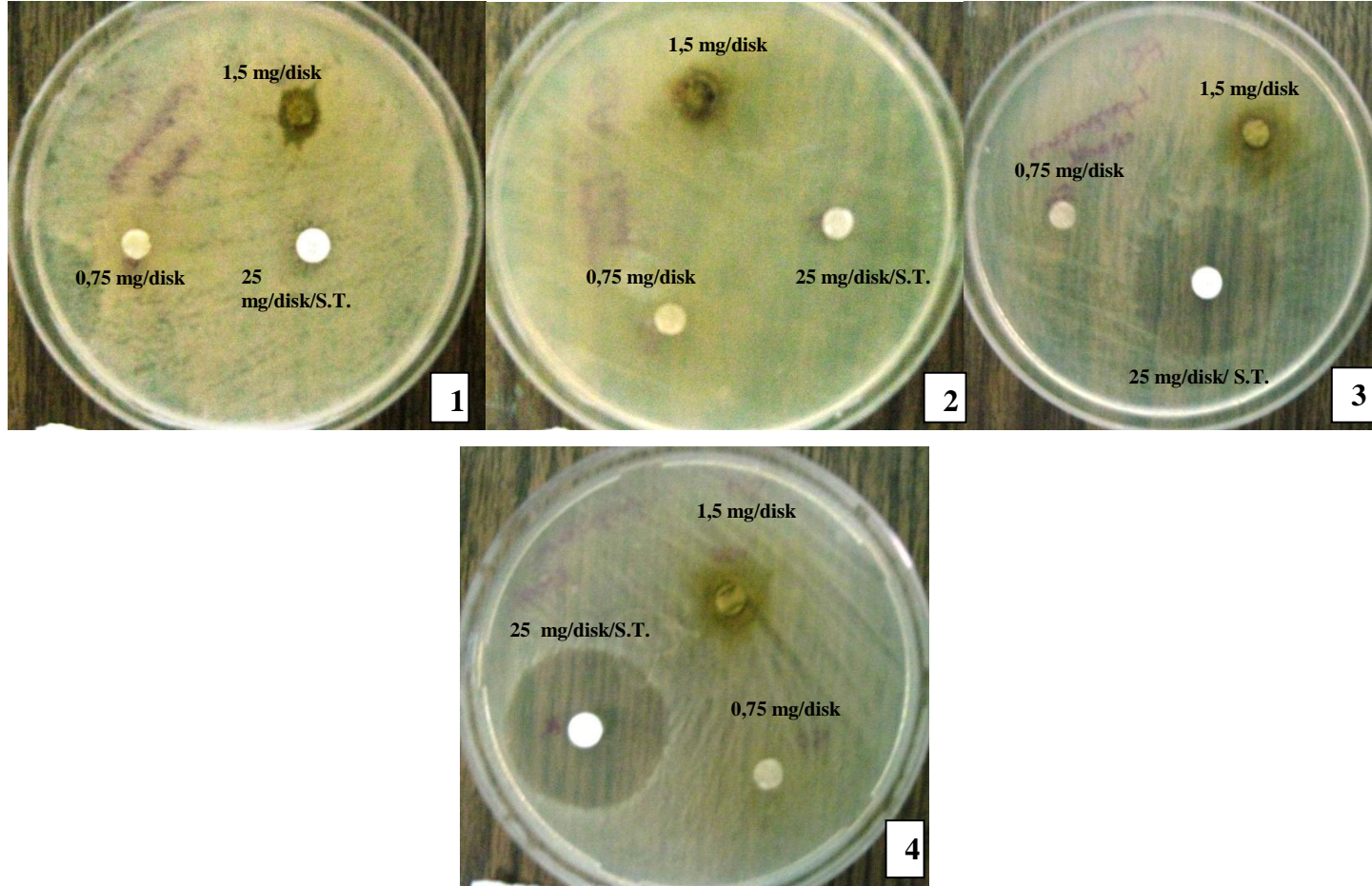


**Çizelge 3.6** *L. purpureum* var. *purpureum* petrol eter ekstresinin MIC ve MBK/MFK değerleri

<b><i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> petroleter ekstresi</b>	<b>MIC(mg/mL)</b>	<b>MBK/MFK (mg/mL)</b>
<i>Proteus vulgaris</i>	12,5	>50
<i>Bacillus cereus</i>	6,25	>50
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25	25
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	12,5	25
<i>Klebsiella pneumonia</i>	6,25	>50
<i>Esherichia coli</i>	12,5	12,5
<i>Candida albicans</i>	12,5	25
<i>Aspergillus niger</i>	6,25	50
<i>Aspergillus flavus</i>	12,5	25
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12,5	50
<i>Fusarium proliferatum</i>	6,25	12,5

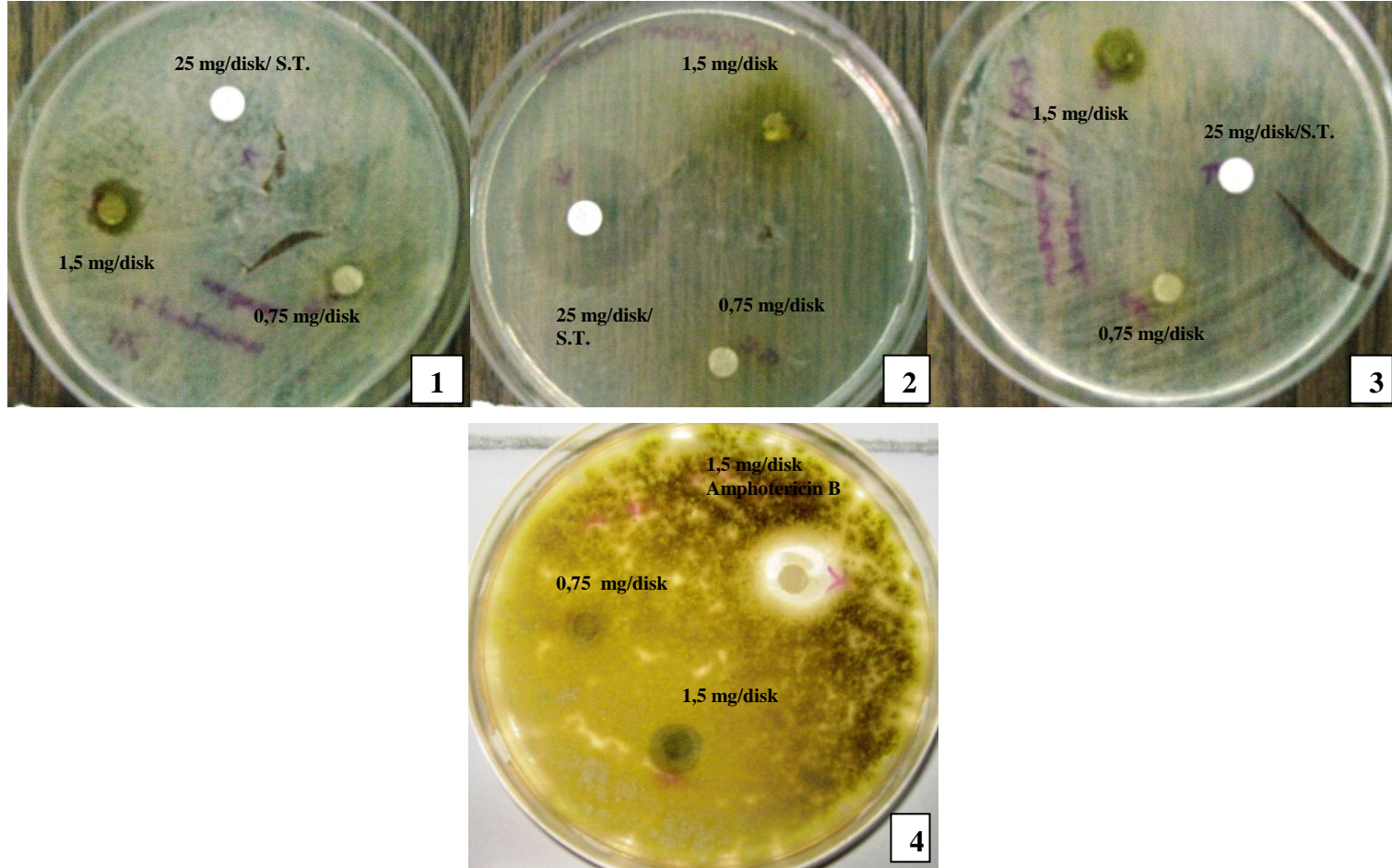


**Şekil 3.1** *L. purpureum* var. *purpureum* ekstralarının MIC sonuçlarına ait fotoğraflar (P.E: petrol eter ekstresi, M.E.: metanol ekstresi, E.E.: etanol ekstresi, B.C.:*Bacillus cereus*, C.A.:*Candida albicans*, P.A.: *Pseudomonas aeuroginosa*, P.V.: *Proteus vulgaris*, K.P.: *Klebsiella pneumonia*, S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.:*Esherichia coli*), (Konsantrasyon aralığı 50-1,56 mg/mL)

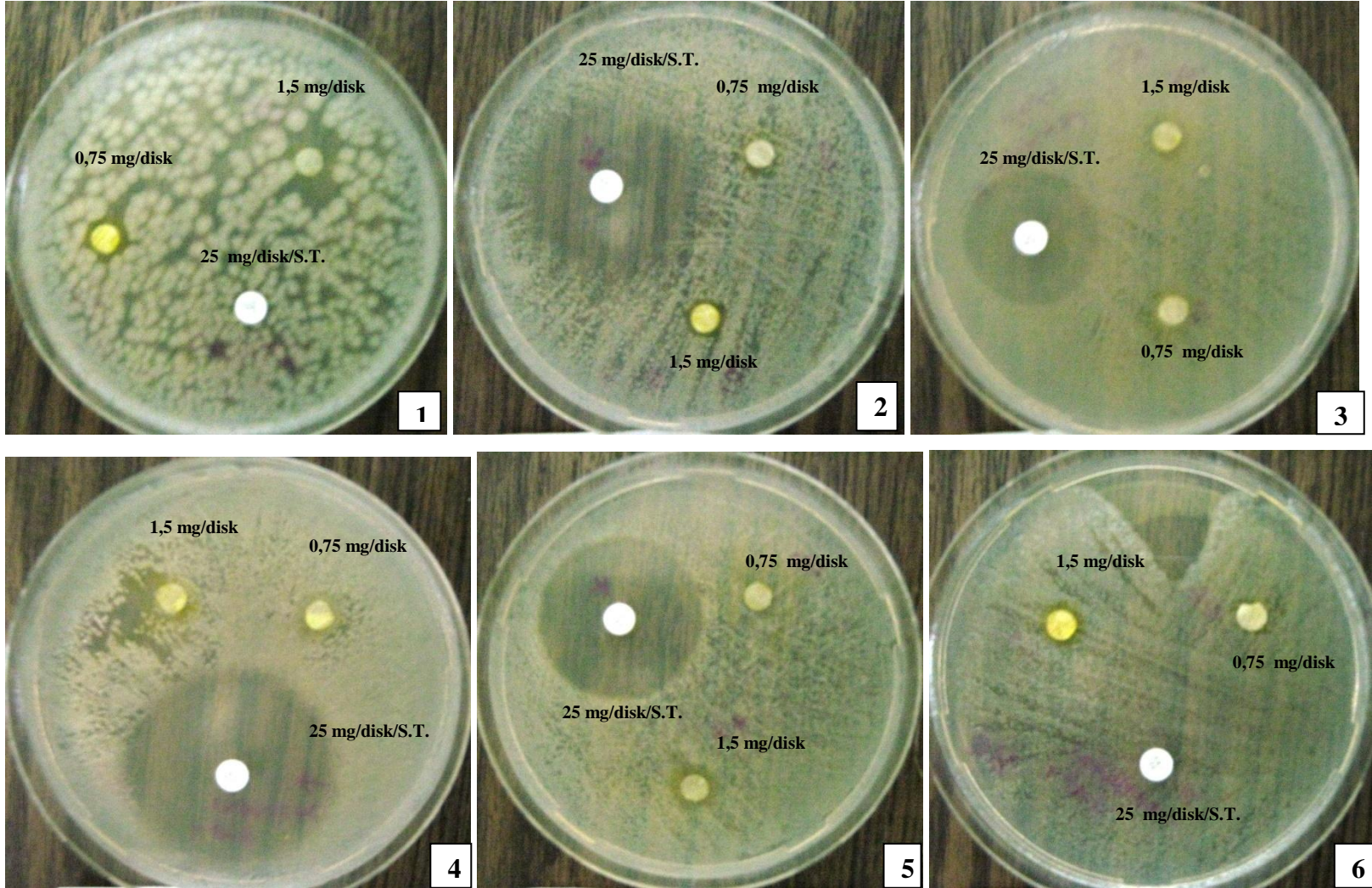


**Şekil 3.2** Etanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *B. cereus* 2) *C. albicans* 3) *E. coli* 4) *S. aureus*  
(Kontrol grubu: 25mg/disk Sulphamethoxazole trimethoprim-S.T.)



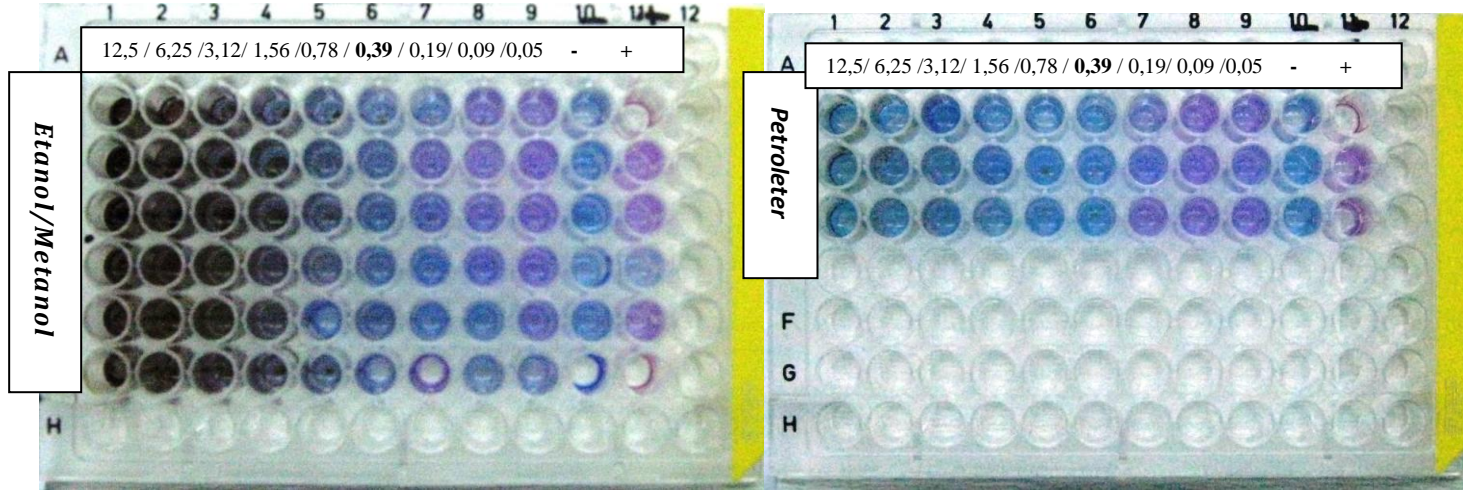


**Şekil 3.3** Metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *B. cereu*, 2) *E. coli* 3) *K. pneumonia* 4) *A. niger*

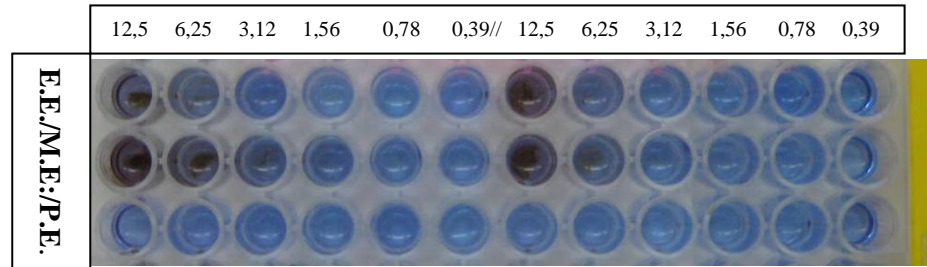


**Şekil 3.4** Petrol eter ekstresinin disk difüzyon sonuçlarına ait fotoğraflar 1) *B. cereus* 2) *K. pneumonia* 3) *E. coli* 4) *P. vulgaris* 5) *S. aureus* 6) *P. aeuroginosa*





Şekil. 3.5 Antitüberküloz aktivite MIC sonuçlarına ait fotoğraflar (Etanol: 0,39 mg/ml, Metanol: 0,39 mg/ml, Petroleter: 0,39 mg/ml)



Şekil 3.6 Antitüberküloz aktivite MBK sonuçlarına ait fotoğraflar (E.E.: etanol ekstresi 0,39 mg/ml, M.E.: metanol ekstresi 0,39 mg/ml, P.E.: petrol eter ekstresi 0,39 mg/ml)

### 3.2 Antitüberküloz Aktivite Bulguları

*L. purpureum* var. *purpureum* metanol, etanol ve petrol eter ekstreleri *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra suşuna karşı denenmiş ve sonuçlar µg/mL cinsinden çizelge 3.7’de verildi.

**Çizelge 3.7** *L. purpureum* var. *purpureum* bitki ekstrelerinin antitüberküloz aktivite sonuçları

<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i> ekstreleri	MIC(µg/mL)	MBK(µg/mL)
Metanol	390	390
Etanol	390	390
Petrol eter	390	390

### 3.3 Antioksidan aktivite Bulguları

#### 3.3.1 DPPH Yöntemi

$1,5 \times 10^{-5}$  M’lık DPPH çözeltisi ve ekstrelerle hazırlanan karışımları 30 dakika karanlık odada inkübasyona tabi tuttuk. İnkübasyon sürecinden sonra karışımların UV-Vis spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. DPPH absorbansını % 50 düşüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilen ekstrelere ait IC<sub>50</sub> ve % inhibisyon değerleri sırasıyla çizelge 3.8 ve 3.9’da verildi.

**Çizelge 3.8** *L. purpureum* var. *purpureum* metanol, etanol ve petrol eter ekstrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri

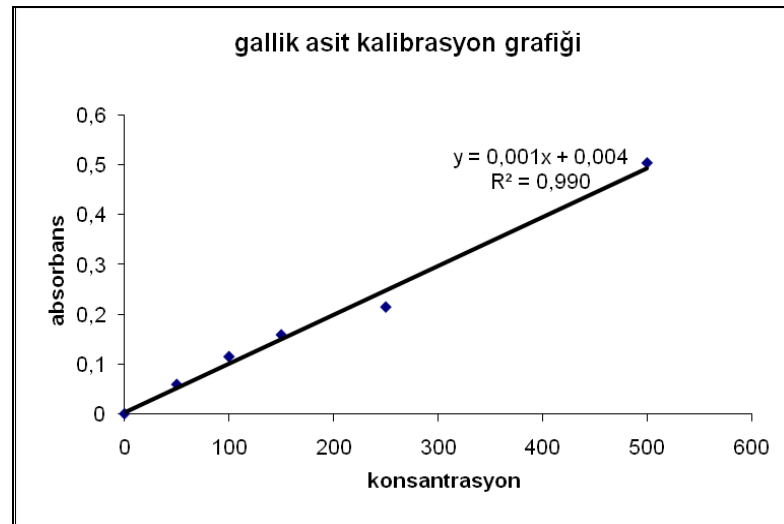
<i>L. purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Metanol	111,2±0,2
Etanol	148±0,4
Petrol eter	346,25±0,3
Askorbik asit	8,9±0,1

Çizelge 3.9 *L. purpureum* var. *purpureum* bitki ekstralarının %inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Askorbik asit (%inhibisyon)	Etanol ekstresi (%inhibisyon)	Metanol ekstresi (%inhibisyon)	Petroleter ekstresi (%inhibisyon)
25	62,35	20,52	4,98	5,31
50	97,01	35,86	13,75	11,56
100	97,21	59,26	56,57	16,72
200	96,91	72,71	90,14	54,37

### 3.3.2 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 spektrofotometrede 765 nm'de ölçümler alındı. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden ekstraların total fenol miktarları gram ekstrede eşdeğer gallik asit miktarı cinsinden çizelge 3.10'da verildi.



Şekil 3.7 Gallik asit kalibrasyon grafiği

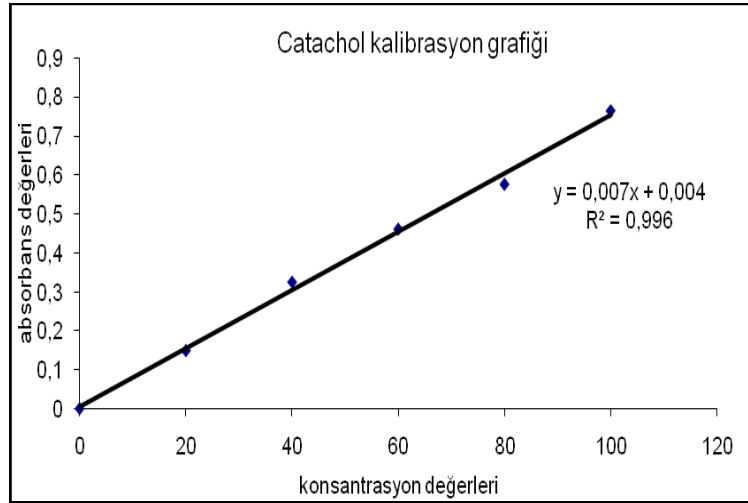


Çizelge 3.10 *L. purpureum* var. *purpureum* bitki ekstralarının total fenol miktarları

<i>Lamium purpureum</i> var. <i>purpureum</i>	Total fenol miktarları (1gr/L ekstrede gallik asit)
Metanol ekstresi	162,8
Etanol ekstresi	110,8
Petrol eter ekstresi	-

### 3.3.3 Total Flavonoid Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde referans flavonoid olarak katekol kullanıldı. Katekol, %80 etanolde çözülerek 20, 40, 60, 80, 100 mg/L konsantrasyonlarda dilüsyonları elde edildi. Dilüsyonların UV-Vis spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanları okunarak Şekil3.8’de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin total flavonoid miktarları gram ekstrede eşdeğer katekol miktarı olarak çizelge 3.11’de verildi.



Şekil 3.8 Katekol kalibrasyon grafiği

**Çizelge 3.11** *L.purpureum* var. *purpureum* ekstrilerinin total flavonoid miktarları

<b>Bitki ekstrileri</b>	<b>Gram ekstrede bulunan eşdeğer mg katekol miktarı</b>
<b>Metanol</b>	25,17
<b>Etanol</b>	32,32
<b>Petrol eter</b>	-

### 3.4 HPLC Bulguları

**Çizelge 3.12** Metanol, etanol ve petrol eter ekstresinde bulunan fenolik maddeler

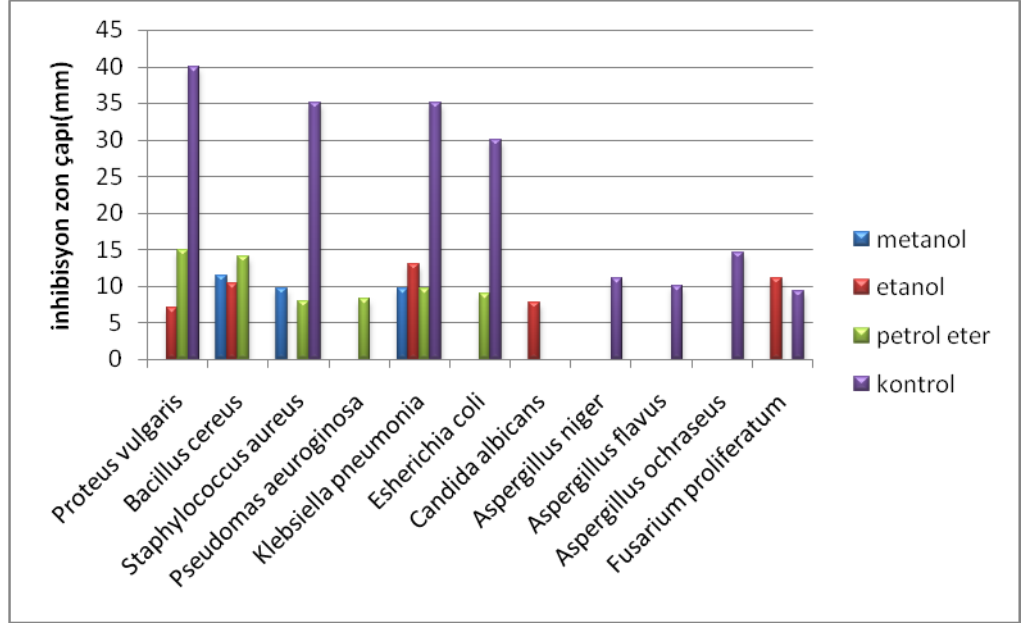
<b>NO</b>	<b>Numuneler(µg/gram)</b>	<b>Metanol ekstresi (µg/gram)</b>	<b>Etanol Ekstresi (µg/gram)</b>	<b>Petroleter Ekstresi (µg/gram)</b>
1	Gallic Acid	-	-	-
2	Catechin	49,3	81,4	-
3	chlorogenic acid	5361,1	3567,3	-
4	caffeic acid	-	52,7	-
5	Epicatechin	-	-	-
6	Syringic	19,2	27,3	-
7	p-coumaric acid	4,0	10,9	-
8	ferulic acid	2,4	9,8	-
9	Rutin	1972,7	3265,6	-
10	Resveratrol	-	-	-
11	Hesperidin	120,0	64,6	18,0
12	apigenin-7-glucoside	-	-	-
13	rosmarinic acid	-	-	-
14	Eriodictyol	-	-	-
15	Quercetin	-	-	-
16	Naringenin	-	-	-
17	Luteolin	-	-	-
18	Apigenin	-	-	-

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında *Lamium purpureum* var. *purpureum* bitki türünün metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelendi.

Disk difüzyon metodu sonuçları incelendiğinde etanol ekstresi sırasıyla *K. pneumonia* (13±1.2 mm), *P. aeuroginosa* (11,5±1,3 mm), *B. cereus* (10,3±1,3 mm), *C. albicans* (7,75±0,9 mm), ve *P. vulgaris* (7±0 mm) mikroorganizmaları üzerinde inhibisyon zonu oluştururken, küflerin içinde ise sadece *F. proliferatum* üzerinde zon oluşturmuş (11±0 mm). Etanol ekstresine tezat olarak petrol eter ekstresi *P. vulgaris* üzerinde iki katı büyüklüğünde (15,25±4,35 mm) inhibisyon zonu oluşturmuş ayrıca *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı da etki göstermiştir (8±0,81 mm, 9±0 mm). *B. cereus* bakterisine 3 ekstre de farklı büyüklükte inhibisyon zonu oluşturmuştur (Metanol ekstresi:11,5±0,6 mm, Etanol ekstresi:10,3±1,3 mm, Petrol eter ekstresi:14,75±3,86 mm).

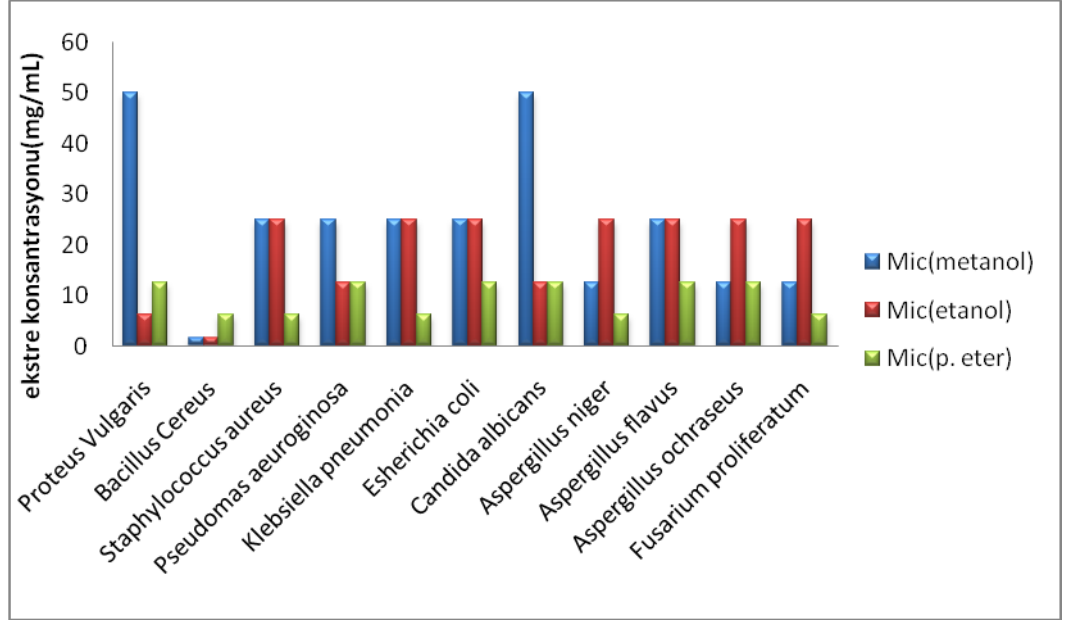
Şekil 4.1’de etanol, metanol ve petrol eter ekstralarının ve kontrol grubunun disk difüzyon sonuçları şematize edilerek verilmiştir. Kontrol olarak kullanılan amphotericin B antibiyotiği ile karşılaştırıldığında etanol ekstresinin *F. proliferatum*’a karşı daha büyük çapta inhibisyon zonu oluşturduğu bulunmuştur.



**Şekil 4.1** Disk difüzyon metodu sonuçları karşılaştırılması

MIC değerinin, mikroorganizma üremesini inhibe eden, MBK ve MFK değerlerinin ise bakteri ve fungusların ölümünü sağlayan konsantrasyon değeri olarak ifade edildiğini yukarıda söylemiştik. Metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının her bir mikroorganizmaya karşı gösterdiği MIC değerleri birbiri arasında karşılaştırılarak şekil 4.2’de verilmiştir. Etanol ve metanol ekstraları *B. cereus* bakterisine en düşük konsantrasyon değerinde (1,56 mg/mL) inhibisyon gösterirken bu bakteriye karşı gerekli olan bakterisit konsantrasyon değeri 3 ekstre ile de sağlanamamıştır (>50 mg/mL). *Bacillus cereus* özelliklerini inceleyen bir makalede bu bakterinin sporlarının oldukça kuvvetli olduğu hatta ısı işleme bile dayanıklı olduğu belirtilmiştir [30]

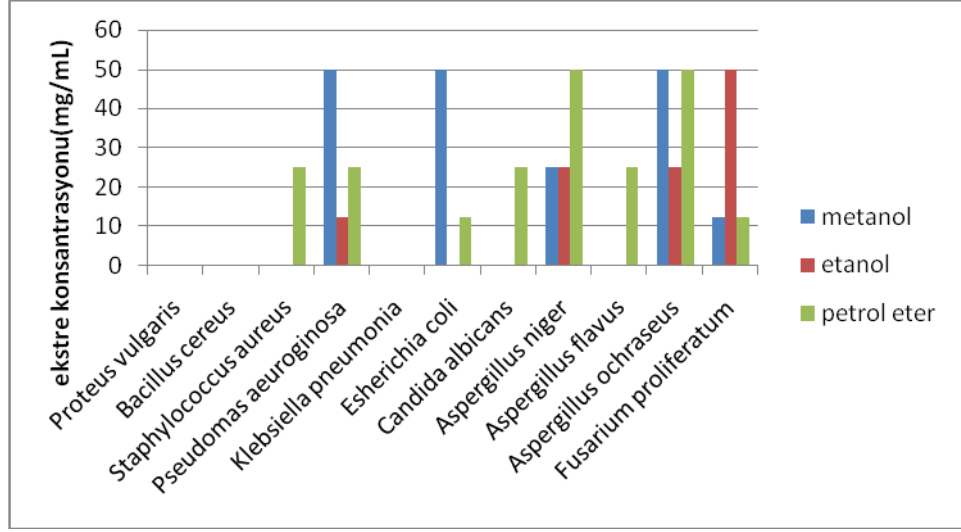
Petrol eter ekstresi 6,25 mg/mL konsantrasyon değeriyle *B. cereus*, *S. aureus* ve *K. pneumoniae* bakterilerine karşı inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2** Metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının MIC değerlerinin karşılaştırılması

Metanol ve etanol ekstraları *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli* ve *A. flavus* üzerine (25 mg/mL), petrol eter ve etanol ekstraları ise *P. aeruginosa* ve *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine aynı konsantrasyon değerinde (12,5 mg/mL) inhibisyon göstermişlerdir. Metanol ekstresi ile petrol ekstresinin aynı inhibisyon değeri gösterdiği mikroorganizma ise *A. ochraceus*'tur (12,5 mg/mL).

Metanol ekstresi iyi bir bakterisit etki göstermediği halde en iyi fungusit etkiyi ise 12,5 mg/mL konsantrasyon değeri ile *F. proliferatum* üzerine göstermiştir. Etanol ekstresinin *P. aeruginosa* üzerine 12,5 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit etkili olduğu bulunmuştur. Petrol eter ekstresi aynı konsantrasyon değeriyle *C. albicans* üzerine bakterisit etkilidir (12,5 mg/mL). Şekil 4.3'te MBK ve MFK sonuçları karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.



**Şekil 4.3** Metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının MBK ve MFK değerlerinin karşılaştırılması

*Lamium purpureum* var. *purpureum* diklorometan, n-butanol, su ve metanol ekstralarıyla yapılan bir çalışma sonucunda ve en iyi mikrobiyal aktiviteyi diklorometan ekstresinin sergilediği bulunmuştur [21]. Mikrodilüsyon metodunu kullanarak *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* mikroorganizmalarına karşı yapılan bu çalışma kapsamında metanol ekstresinin *C. albicans* mayasına daha iyi etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı inhibisyon değerleri bulunması hem inokulum süspansiyonunun hazırlanışı hemde ekstrenin suda çözülmesi gibi farklılıklardan kaynaklanabileceği söylenebilir.

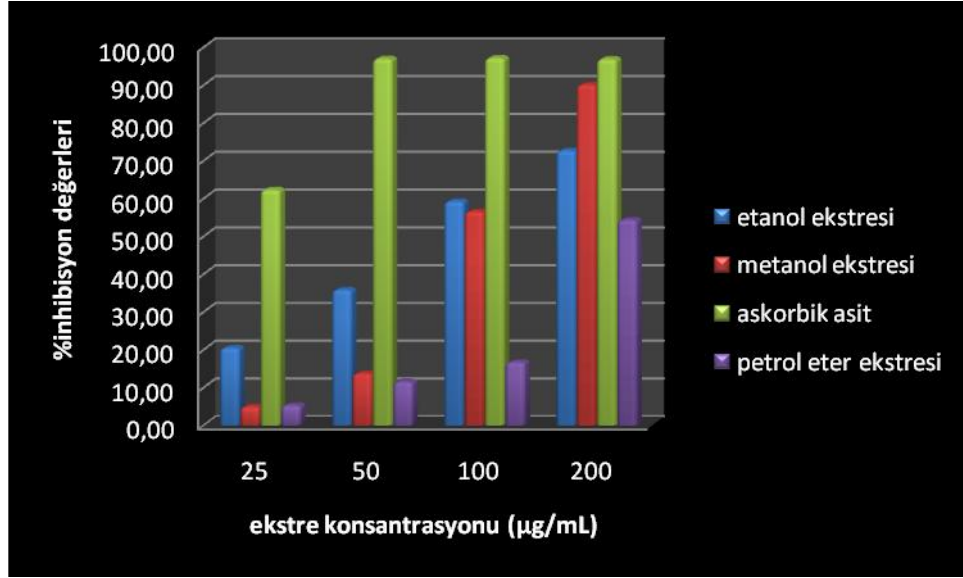
Çizelge 3.12’de verilen fenolik madde analiz sonuçları incelendiğinde metanol ekstresinin catechin (49,3 µg/gram), chlorogenic asit (5361,1 µg/gram), syringic (19,2), p-coumaric acid (4,0 µg/gram), ferulic acid (2,4 µg/gram), rutin (1972,7 µg/gram) ve hesperidin (120,9 µg/gram); etanol ekstresinin catechin (81,4 µg/gram), chlorogenic acid (3567,3 µg/gram), caffeic acid (52,7 µg/gram), syringic (27,3 µg/gram), p-coumaric acid (10,9 µg/gram), ferulic acid (9,8 µg/gram), rutin (3265,6 µg/gram) ve hesperidin (64,6 µg/gram); Petrol eter ekstresinin ise sadece hesperidin (18,0 µg/gram) bileşiğini içerdiği bulunmuştur.

Çeşitli fenolik maddelerin (p-hydroxy benzoic, vanillic, caffeic, protocatechuic, syringic, p-coumaric asit, oleuropein ve quercetin) antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmiş olduğu bir makalede caffeic ve protocatechuic asitlerinin (0,3 mg/ml) *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerine; syringic acid (0,5 mg/ml) *B. cereus* bakterisine; oleuropein, p-hydroxy benzoic, vanillic ve p-coumaric asitlerinin (0,4 mg/ml) *K. pneumoniae* ve *B. cereus* bakterilerine karşı üreme inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur. Çalışmamız bu makale sonuçları ile kıyaslandığında etanol ve metanol ekstralarının *B. cereus* bakterisi üzerine etkisinin bu kadar büyük olması (1,56 mg/mL), içeriğinde bulunan syringic asit ve p-coumaric asitlerine bağlanabilir [31].

Antimikobakteriyal aktivite konusunda hiçbir çalışma bulunmayan *L. purpureum* var. *purpureum* bitki türünün oldukça iyi düzeyde antitüberküloz aktivite gösterdiği çalışmamız sonucunda bulundu. Bütün ekstralarda ortak olarak bulunan hesperidin flavonoidinin bu aktivitede bir rolü olduğu söylenebilir. Çünkü metanol, etanol ve petrol eter ekstralarının MIC ve MBK değeri eşit olup 390 µg/mL'dir. Aynı zamanda Lamiaceae familyasına dahil olan *Origanum munitiflorum* (sütçüler kekiği) ve *Tymbra spicata* L. var. *spicata* (Karakekik) bitki türleri ile yapılan antimikobakteriyal aktivite çalışmaları ümit verici olmuştur. Bu çalışma 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 asitce daha zengin olduğuna bağlamışlardır [32].

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

DPPH metoduyla yapılan çalışma sonucunda metanol ekstresinin en düşük IC<sub>50</sub> konsantrasyon değerine sahip olduğu bulundu. Ekstrelelere ait IC<sub>50</sub> değerleri çizelge 3.8'de verilmiştir. Metanol, etanol, petrol eter ekstraları ve askorbik asit % inhibisyon değerleri şekil 4.4'te karşılaştırılmış ve 200 µg/mL konsantrasyon değerinde metanol ekstresinin askorbik asite yakın değerde % inhibisyon göstermiş olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.4 % inhibisyon değerleri karşılaştırılması

Yapılan total fenol yöntemi sonucu DPPH yöntemi sonuçlarını doğrulamaktadır. Gallik asit referans madde olarak kullanılmış olup sonuçlar gr/L ekstrede mg gallik asit miktarı olarak verilmiştir. En yüksek fenol miktarı metanol ekstresinde bulunmuştur (162,8 mgGA/gr). Petrol eter ekstresinde ise tespit edilemeyecek kadar az miktarda fenolik madde bulunmaktadır. Bu yüzdende antioksidan aktivitesi de yok denecek kadar azdır. Bu sonuçlar yorumlandığında fenolik maddelerin antioksidan aktivitede çok fazla önem arzettiği söylenebilir.

Flavonoidler, fenolik hidroksil grupları ile C6-C3-C6 yapısını barındıran 4000'den fazla tipi olan bileşiklerdir. Flavonoidler chalconelar, flavonlar, flavononelar, flavanollar ve flovonollar olarak gruplandırılır. Bitkilerde bulunan ikincil fenoller olarak ifade edilen flavonoidler, şelatlama ve antioksidan özellikleri ile bilinirler. Total flavonoid miktarının antioksidan aktivite ile bir ilişkisi olduğu bu makalelere dayanılarak söylenebilir [33]. Total flavonoid yöntemini antioksidan çalışmalarımızı desteklemek amaçlı çalışmalarımıza dahil ettik. Çalışmamızın sonucunda petrol eter ekstresinin hem flavonoidçe hem de fenolik maddelerce oldukça fakir olduğunu ve etanol ekstresinin metanol ekstresinden daha fazla flavonoid içerdiğini gözlemledik (32,32 mgCAT/gr). Metanol ekstresinin etanol ekstresinden daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olması, antioksidan aktivitede fenollerin flavonoidlerden daha önemli olduğunu söyleyebiliriz.

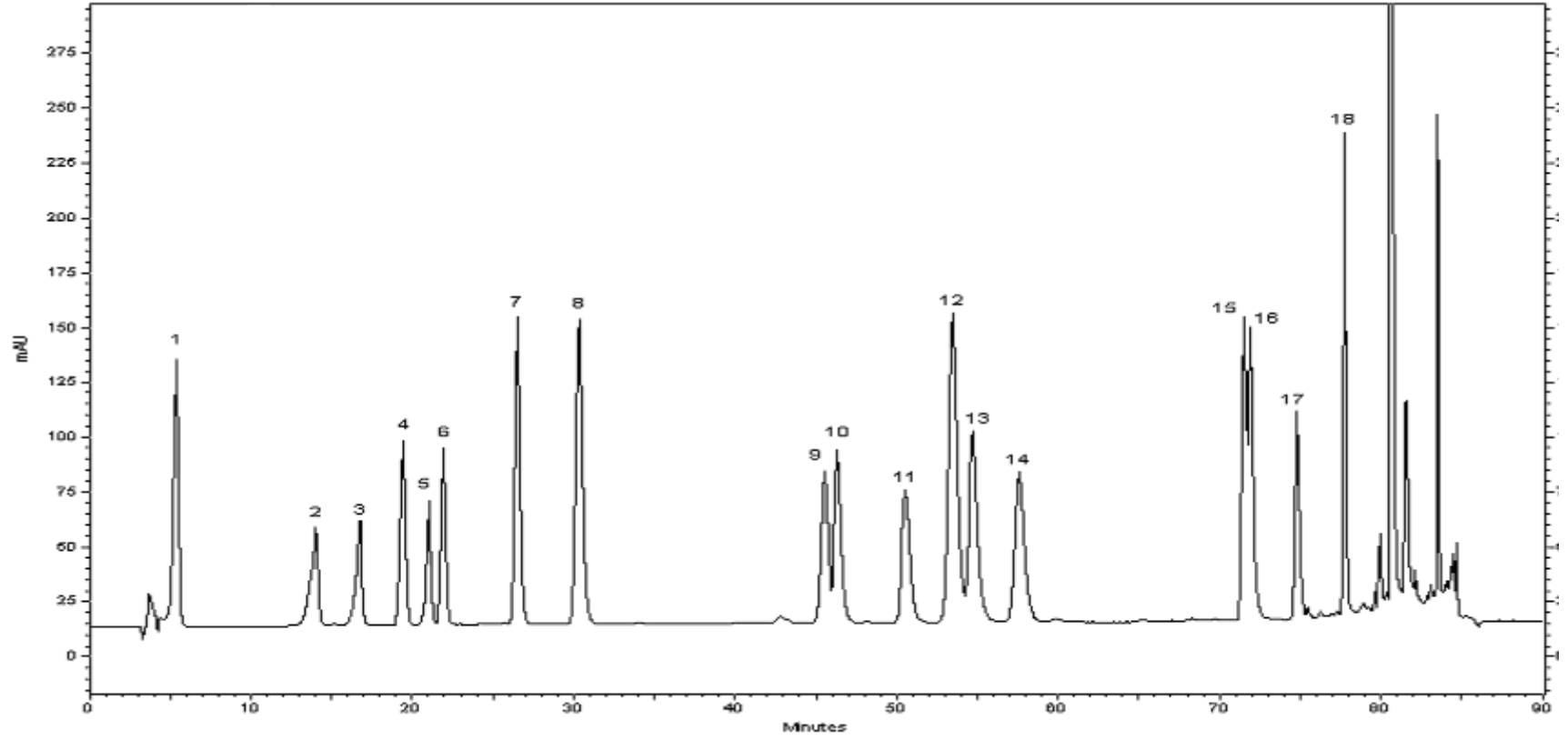


Fenolik madde analizi sonuçlarımız antioksidan aktivite çalışmalarımızı doğrulamaktadır. Fenolik maddece fakir olduğu gözlemlenen petrol eter ekstresinin serbest radikalleri süpürme aktivitesi hiç yok denecek kadar azdır. Buna tezat olarak petrol eter ekstresinin antimikrobiyal aktivitesinin metanol ve etanol ekstrelerinden daha iyi düzeyde olduğu bulunmuştur. Bu sonuçtan fenollerin antibakteriyal aktivitede pekte önemli rolü olmadığı söylenebilir. Ancak daha önce yapılan bir çalışma sonucunda, fenollerce zengin olduğu bilinen taze çay yaprakları, fenol miktarı az olan yeşil çay yapraklarından daha iyi antibakteriyal aktivite gösterdiği ve antibakteriyal aktivitenin fenol miktarıyla bağlantılı olabileceği söylenmiştir. Bizim çalışmamızın sonucu buna tezat oluşturmaktadır. Bununla beraber yapılan başka bir çalışmada *Polygonum cognatum Meissn* eter ekstresinin az fenolik madde içerdiği halde daha fazla fenolik madde içeren su ekstresinden daha iyi antibakteriyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bunun sebebi olarak eter ekstresinin antibakteriyal aktivite gösteren fenolik maddeler dışında bazı başka bileşikler bünyesinde bulundurduğu söylenmiştir. Çaylarda bulunan fenolik maddelerin antibakteriyal aktivitesinin bu kadar iyi olması ise bu maddelerin bakteri yüzeyinde bulunan proteinlerle interaksiyona girmesi özelliğine bağlanmıştır [34].

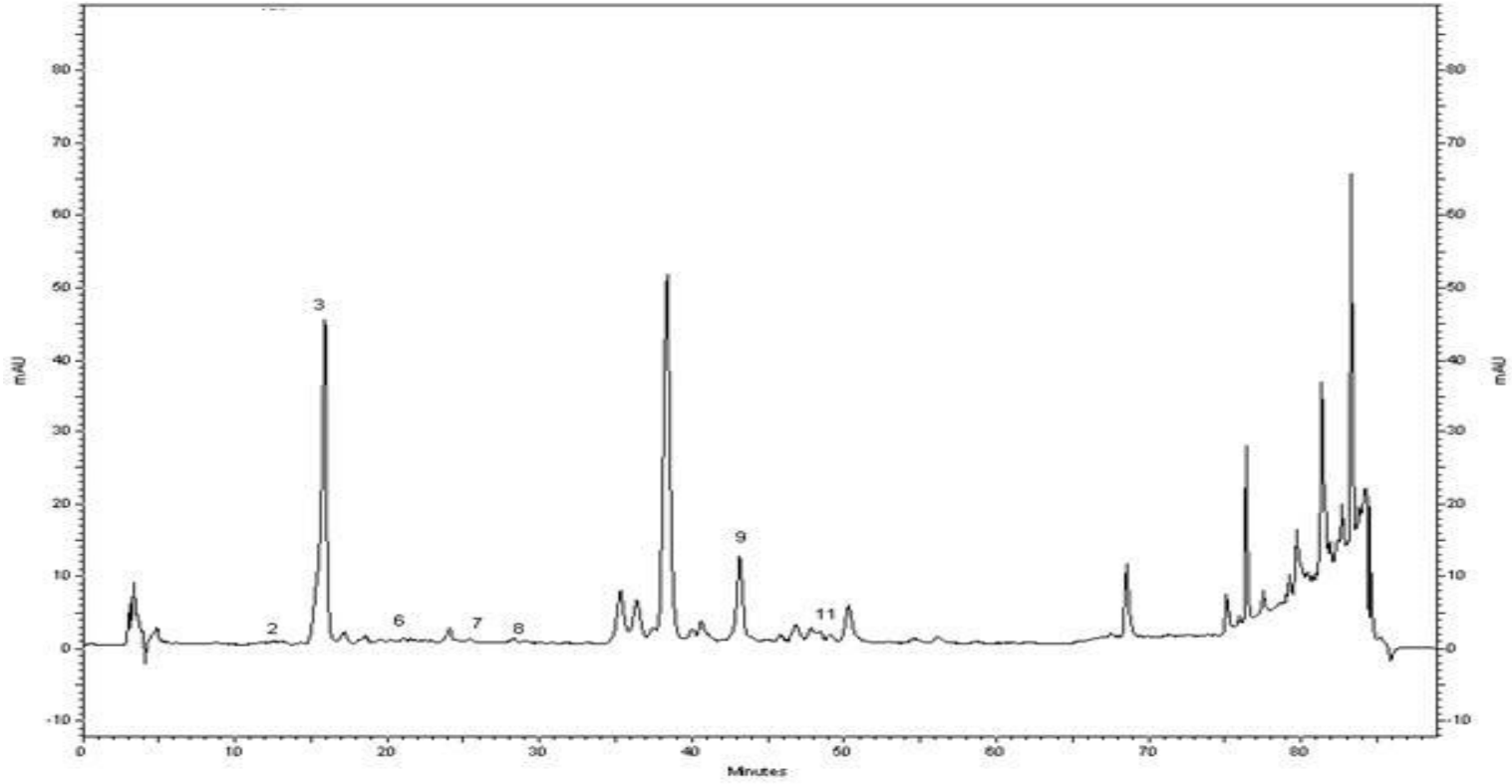
Özetle çalışmamız sonucunda, petrol eter ekstresinin içeriğinde antimikrobiyal aktivitesinin iyi olmasını sağlayan fenolik maddeler dışında bazı başka maddeler bulunduğunu, metanol ve etanol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin yüksek olması sebebiyle fenollerin antioksidan aktivitede değerli olduğunu ve *B. cereus*, *K. pneumonia* ve *E. coli* bakterilerine karşı bulunan yüksek antimikrobiyal aktivitenin p-coumaric asit ve syringic fenolik bileşikleriyle bağlantılı olduğunu söyleyebiliriz.

## 6. EKLER

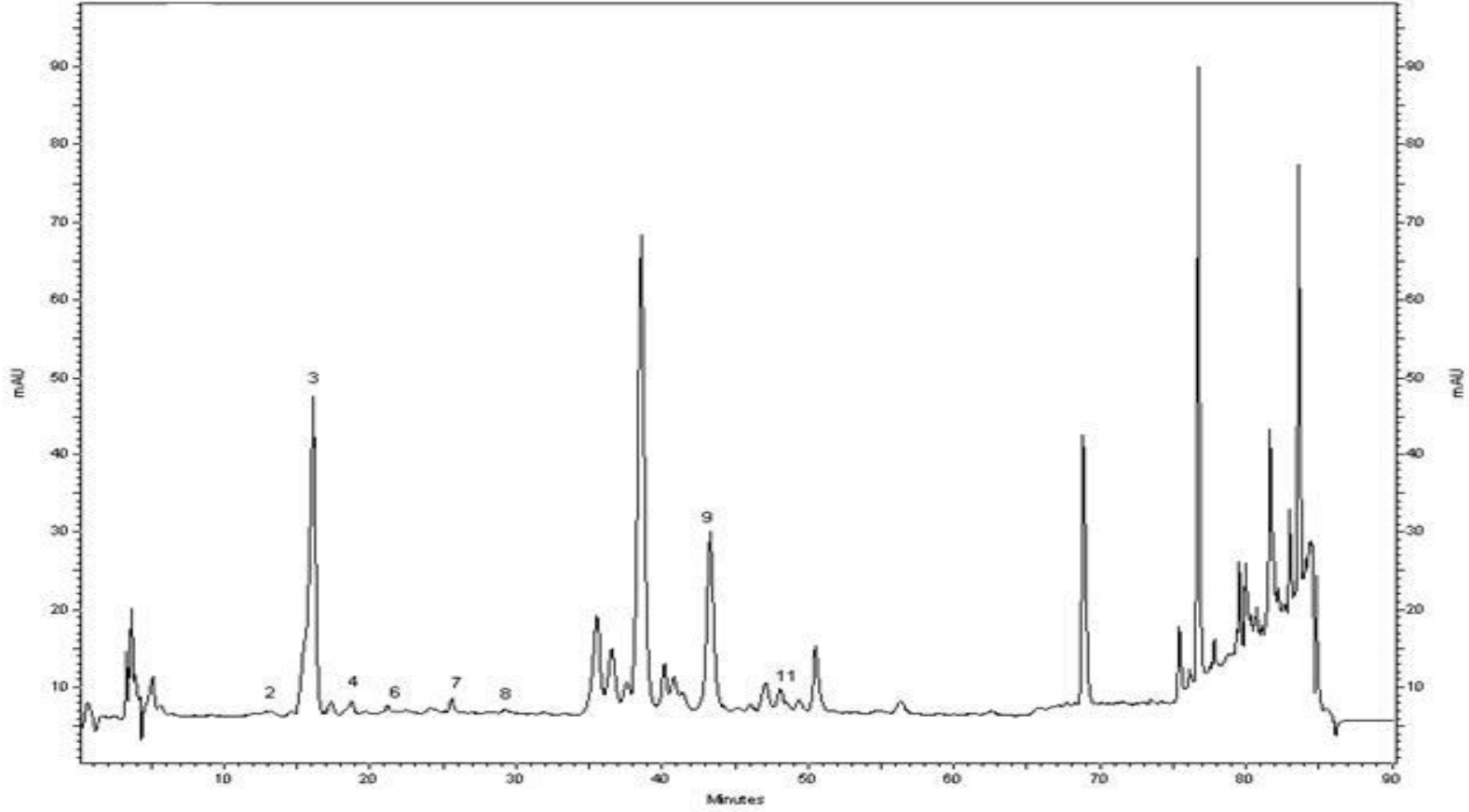
### EK-A LAMİUM PURPUREUM VAR. PURPUREUM BİTKİ EKSTRELERİNE AİT HPLC KROMATOGRAMLARI



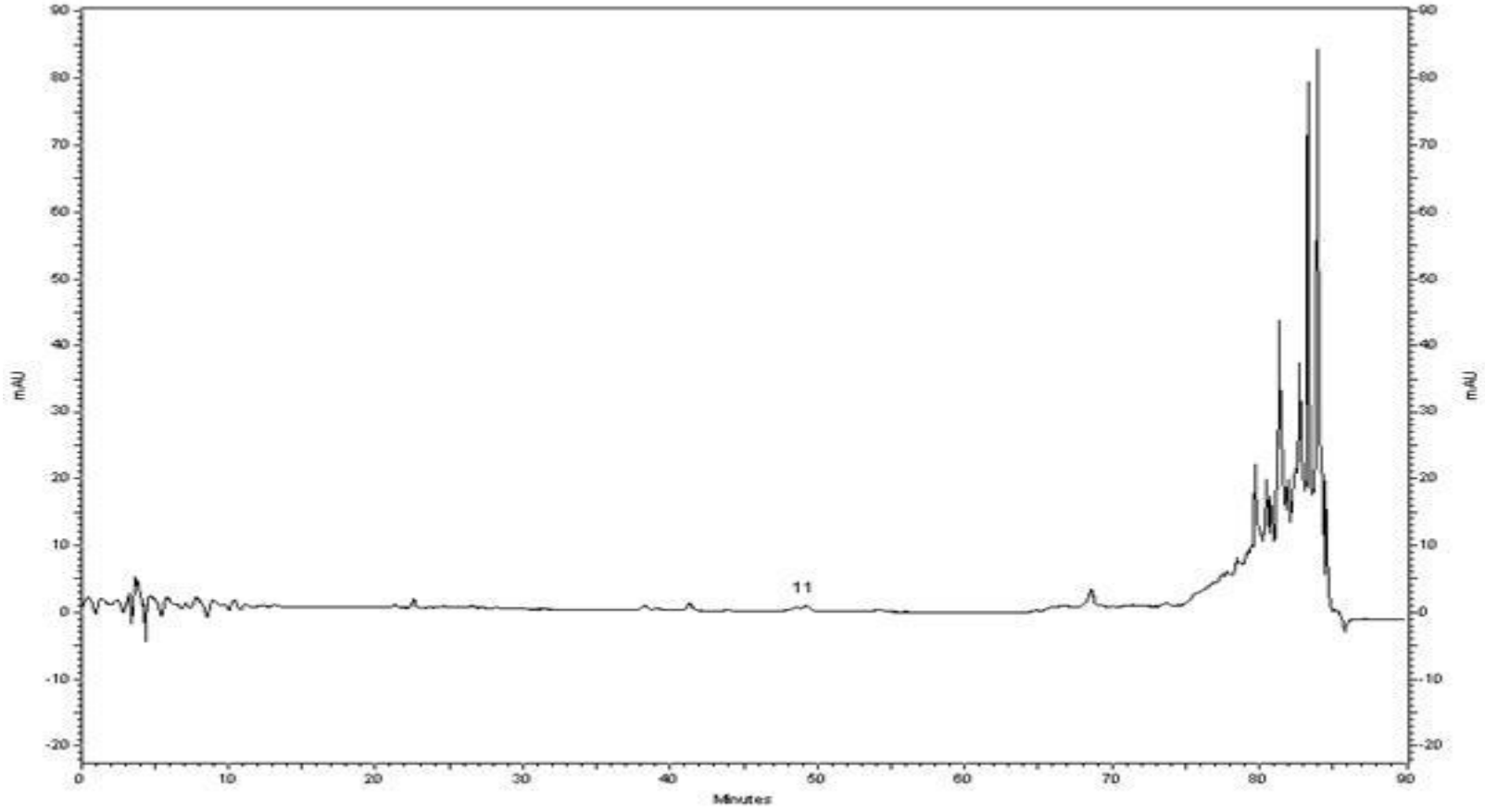
**Şekil A.1** Standart kromatogramı: 1: Gallic acid 2: catechin 3: chlorogenic acid 4: caffeic acid 5: epicatechin 6: syringic 7: p-coumaric acid 8: ferulic acid 9: rutin 10: resveratrol 11: hesperidin 12: apigenin-7-glucoside 13: rosmarinic acid 14: eriodictyol 15: quercetin 16: naringenin 17: luteolin 18: apigenin



Şekil A.2 *L.purpureum* var. *purpureum* Metanol Ekstresi HPLC Kromatogramı



Şekil A.3 *L.purpureum* var. *purpureum* Etanol Ekstresi HPLC Kromotogramı



Şekil A.4 *L.purpureum* var. *purpureum* Petrol eter Ekstresi HPLC Kromotogramı

## 5. KAYNAKÇA

- [1] Hsi-wen, L., Hedge, I. C., “Lamiaceae”, *Flora of China*, (1993), 17, 50-299.
- [2] Öztekin, N., Baskan, 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] Yalçın, F. N. ve Kaya, D., “Ethnobotany, Pharmacology and Phytochemistry of the Genus *Lamium* (Lamiaceae)”, *FABAD J. Pharm. Sci.*, (2006), 31, 43-52.
- [5] Kaya, D., “*Lamium garganicum* sobs. *leavigatum* Arcangeli Üzerinde Taksonomik Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
- [6] Davis, P. H.,(ed), “Flora Of Turkey And East Aegean Islands”, Vol. 7, Supplement. Edinb. Un. Press., Edinburgh, 2000.
- [7] Alipievaa, K., Evstatievab, L., Handjievaa, N. ve Popov, S., “Comparative Analysis of the Composition of Flower Volatiles from *Lamium L.* Species and *Lamiastrum galeobdolon* Heist. ex Fabr.”, *Z. Naturforsch.*, (2003), 58c, 779-782.
- [8] Flamini, G., Cioni Pier, L., Morelli, I., “Composition of the essential oils and in vivo emission of volatile of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*”, *Food Chemistry*, 91 ,(2005) ,63–68.
- [9] Sarker S. D., Dinan, L., Sikh, V., REES, H. H., “9 $\xi$ 0- $\beta$ -D-Glucopyranosyloxy-5-Megastigmen-4-one From *Lamium album*”, *Phytochemistry*, (1997),45,7, 1431-1433.

- [10] Budzianowski, J. Skrzypczak, L., “Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers”, *Plant chemistry*, (2000), 1,61-712.
- [11] Alipieva, K. I., Taskov, R. M., Evstatiev, L. N., Handjieva, N. V., Popova, S. S. “Benzoxazinoids and iridoid glucosides from four *Lamium* species”, *Phytochemistry*, (2003), 64,1413–1417.
- [12] Yalcın, F. N., Kaya D., Çalış, İ., Ersöz, T., Palaska, E., “Determination of Iridoid Glycosides from Four Turkish *Lamium* Species by HPLC-ESI/MS”, *Türk J Chem*,(2008), 32, 547-467.
- [13] Shuya, C., Xingguo, C., and Zhide, H., “Identification and determination of ecdysone and phenylpropanoid glucoside and flavonoids in *Lamium maculatum* by capillary zone electrophoresis”, *Biomed. Chromatogr.*, 17, (2003),477–482.
- [14] Alipieva, K., Kokubun, T., Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva N., “LC-ESI-MS analysis of iridoid glucosides in *Lamium* species”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 ,(2007), 17-22.
- [15] Çelik, E., Yuvalı Çelik, G., “Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri”, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* ,05, 2,(2007), 1-6.
- [16] Matkowski, A., Piotrowska, M., “Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae”, *Fitoterapia* ,(2006), 77, 346–353.
- [17] Akkol, K. E., Yalçın, F. N., Kaya, D., Çalış, İ., Yeşilada, E., Ersöz, T., “In vivo anti-inflammatory and antinociceptive actions of some *Lamium* species” *Journal of Ethnopharmacology*, (2008), 118 ,166–172
- [18] R., Saklani, A. ve Jachak, S. M., “Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents”, *Journal of Ethnopharmacology*, (2007), 110, 200–234.
- [19] Dulger, B., “Antifungal activity of *Lamium tenuiflorum* against some medical yeast *Candida* and *Cryptococcus species*”, *Pharmaceutical biology*, (2000), 47, 5, 467-470.)

- [20] Mikolajczak, K. I., Rogers, M. F., Smith C. R., and Wolff I.A, “An Octadecatrienoic Acid from *Lamium purpureum* L. Seed Oil Containing 5,6-Allenic and trans-16-Olefinic Unsaturation”, *Biochem. J*,105,(1967), 1245.
- [21] Yalçın, F. N., Kaya, D., Kılıç, E., Özalp, M., Ersöz, T., Çalış, İ., “Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of Some *Lamium* Species from Turkey”, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, [2007], 27,111-22.
- [22] Uzun, E., Sarıyar, G., Adsersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoglu, E., Pırıldar, S., “Traditional Medicine İn Sakarya Province (Turkey) And Antimicrobial Activities Of Selected Species”, *Journal Of Ethnopharmacology*, (2004),95, 287–296.
- [23] Rahman, A., Kang,S. C., “In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb”, *Food Chemistry*, 116 ,(2009), 670–675.
- [24] 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).
- [25] 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).
- [26] Becton, Dickinson and Company Newsletter, “BD Bactec MGIT 960 SIRE kit now FDA-cleared for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*” *LAB O Microbiology News & ideas* ,13, (2002), 4-4.
- [27] Milardovic, S., Ivekovic, D.,Grabaric, B. S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, 68 ,(2006), 175 – 180.
- [28] Tunalier, Z.,Öztürk ,N., Koşar ,M.,Hüsnu, K. Başer, C.,Duman, H.,Kırimer, N., “Bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve Fenolik bileşikler yönünden incelenmesi”, ISBN,975-94077-2-8.



- [29] 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.
- [30] Kotirantaa, A., Lounatmaa, K., Haapasalo, M.,“Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections”, *Microbes and Infection*, 2, (2000), 189–198.
- [31] Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo-Zaid, M.A., “Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds”, *Microbios*, 93, 374,(1998),43-54.
- [32] 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* ,116, (2009), 289–294.
- [33] Catherine, R., “Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity” ,*Antioxidant Food Supplements in Human Health*, (1999), 239-253.
- [34] Prof. Dr. Sedat Velioğlu, “Farklı Çay Ekstraktlarının Antioksidan, Antibakteriyal Etkileri ve Fenolik madde dağılımının HPLC ile belirlenmesi”, T.C. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi,2007.