



**MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze BİTKİ EKSTRAKTININ**  
**ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**MARİ ESEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Antakya/HATAY**

**ŞUBAT 2008**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	III
ABSTRACT .....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Bitkilerin Sekonder Metabolitleri.....	6
2.2. Bitkilerin <i>In Vitro</i> Biyolojik Aktiviteleri.....	7
2.3. Bitkilerin <i>In Vitro</i> Antioksidan Özellikleri .....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. <i>Verbascum pinetorum</i> (Boiss.) O. Kuntze Bitkisinin Toplanması ve Teşhisi.....	15
3.1.2. Mikroorganizmalar.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Bitkinin Kurutulması ve Özütleme İşlemleri.....	16
3.2.1.1. Artan Polariteye Göre Özütleme.....	16
3.2.1.2. Direkt Metanol Özütlemesi.....	17
3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri.....	17
3.2.2.1. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması.....	17
3.2.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	17
3.2.3. Antioksidan Aktivite Deneyleri.....	18
3.2.3.1. Bitki Özütlerinin Antioksidan Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması.....	18
3.2.3.2. DPPH Yöntemi.....	18
3.2.3.3. Beta-Karoten Renk Açılım Testi.....	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	21

4.1. Özüt Verimleri.....	21
4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	22
4.2.1. Antifungal ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	22
4.2.2. Artan Polarite Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	22
4.2.3. Direkt Metanol Özütünün Antimikrobiyal Aktivitesi.....	25
4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	29
4.3.1. DPPH Yöntemi.....	29
4.3.2. Beta-Karoten Renk Açılım Testi.....	32
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR.....	36
TEŞEKKÜR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	42

**ÖZET*****Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze BİTKİ EKSTRAKTININ  
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

*Scrophulariaceae* familyasına ait Hatay endemiği *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze'den elde edilen 5 farklı özütünün antimikrobiyal ve metanolik özütünün antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Artan polarite özütleme ve direkt metanol özütleme yöntemleri sonrasında elde edilen non-polar ve polar özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak sekiz adet gram pozitif, altı adet gram negatif bakteri ve bir adet fungus üzerinde test edilmiştir. Direkt metanolik özütün antioksidan aktivite kapasitesi DPPH ve beta-karoten renk açılım yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. Non-polar özütlerden hekzan, diklorometan ve methanol/kloroform özütlerinin, polar methanol/su özütünün ve direkt methanol özütünün toplam olarak üç adet gram pozitif, iki adet gram negatif ve maya suşları üzerinde çeşitli düzeylerde antimikrobiyal etkileri gözlenmiştir. Özüt ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve askorbik asitin DPPH radikalinin %50 inhibisyonunu sağlayan IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 14,35 mg/ml, 2,25 mg/ml ve 0,45 mg/ml olarak bulunmuştur. Beta-karoten renk açılımına göre 50. saatin sonunda özütün linoleik asit oksidasyonunu %82, BHT'nin ise %85 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Buna göre *V. pinetorum* bitkisinden elde edilen özütlerin genel olarak bazı patojen mikroorganizmaların üremesini engellediği ve antioksidan aktivite kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

2007, 42 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Verbascum pinetorum*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, tıbbi bitkiler

**ABSTRACT****DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze EXTRACTS**

The antimicrobial activities of five different extracts (hexane, dichloromethane, methanol/chloroform, methanol/water and direct methanol) and antioxidant activity of methanolic extract obtained from *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze which is a Hatay endemic and belongs to *Scrophulariaceae* family was determined. The extracts obtained from *Verbascum pinetorum* by increased polarity and direct methanol extraction were tested by using the disc diffusion method against eight gram positive bacteria, six gram negative bacteria, and one fungus. Non-polar extracts including hexane, dichloromethane and methanol/chloroform extracts, polar methanol/water extracts and direct methanol extracts exhibited antimicrobial activities on three gram positive, two gram negative and one fungal strains at various degrees.

The antioxidant activities of methanolic extract of *Verbascum pinetorum* was determined with DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazil) and beta-carotene bleaching test system. The 50% (IC<sub>50</sub>) inhibition of the methanolic extract, and positive control, BHT (Butylated Hydroxytoluene), and ascorbic acid, on the free radical DPPH was calculated according the results of DPPH method. IC<sub>50</sub> of extract, BHT and ascorbic acid were determined as 14.35 mg/ml, 2.25 mg/ml and 0.45 mg/ml, respectively. The % inhibition of linoleic acid oxidation taken on depending on time was evaluated according to blank. At the end of the fiftieth hours, while the methanolic extract of *Verbascum pinetorum* inhibited the linoleic acid oxidation by 82%, BHT, positive control, inhibited by 85% according to beta-carotene bleaching test. As a result, in the current study it was determined that the extracts obtained from *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze have some antimicrobial and antioxidant activities.

2007, 42 pages

**Key Words:** *Verbascum pinetorum*, antimicrobial activity, antioxidant activity, medicinal plants.

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Difenilpikrilhidrazil
OH·	Hidroksil Radikali
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
NCTC	The National Collection of Type Cultures
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SDA	Saboroud Dekstroz Agar
SDB	Saboroud Dekstroz Broth
IC <sub>50</sub>	%50 İnhibisyon Değeri

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. <i>V. pinetorum</i> bitkisinin özüt verimleri.....	21
Çizelge 4.2. Disk Difüzyon Yöntemiyle belirlenen antifungal ve antibiyotik duyarlılık testleri.....	23
Çizelge 4.3. <i>V. pinetorum</i> 'un hekzan, diklorometan, metanol/kloroform ve metanol/su (artan polariteye göre) özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi.....	24
Çizelge 4.4. <i>V. pinetorum</i> 'un direkt metanol özütünün disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivitesi.....	26

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. <i>Verbascum pinetorum</i> (Boiss.) O. Kuntze bitkisinin fotoğrafı.....	15
Şekil 4.1. <i>V. pinetorum</i> 'dan elde edilen özütlerin <i>S. aureus</i> ATCC 29213 bakterisi üzerinde disk düfüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivitesi.....	25
Şekil 4.2. <i>V. pinetorum</i> 'un metanolik özütünün çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği.....	29
Şekil 4.3. BHT'nin çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği.....	30
Şekil 4.4. Askorbik asitin çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği.....	31
Şekil 4.5. BHT, <i>V. pinetorum</i> ve askorbik asitin DPPH testinde %50 İnhibisyon sağlayan derişimleri.....	31
Şekil 4.6. <i>V. pinetorum</i> ve BHT'ye ait beta-karoten linoleik asit test sistemindeki linoleik asitin zaman bağlı olarak % inhibisyonu.....	32



## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu tarihi boyunca bitkileri barınak, giyecek, yiyecek, baharat, parfüm ve ilaç olarak kullanmıştır. Bitkiler aynı zamanda sahip oldukları kompleks kimyasal yapılarından dolayı geleneksel tedavinin temelini de oluşturmuşlardır.

Yeryüzünde 750.000 ile 1.000.000 arasında bitki türünün olduğu tahmin edilmektedir (Baytop, 1999). Bu bitki türlerinin %1-10'u kadarının insanlar ve diğer hayvanlar tarafından besin olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir. Fakat bu orandan çok daha fazlasının ise tıbbi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir (Cowan, 1999).

Bitkilerin tedavi edici güçlere sahip olduğu bilgisi antik zamanlara kadar uzanmaktadır. Tarih boyunca tüm anakaralarda yaşayan insanlar yüzlerce yerli bitkinin lapasını ve çayını tedavi amacıyla kullanmışlardır. Bugünkü Irak sınırları içerisinde 60.000 yıl önce yaşamış olan Neanderthallerin gülhatmi gibi bitkileri kullanmış olduklarına dair kanıtlar bulunmuştur. Bu bitkiler dünyanın pek çok yerinde halen yaygın bir şekilde tedavi aracı olarak kullanılmaktadır (Cowan, 1999). Anadolu'da ise bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı yüzyıllar öncesine, hatta Hitit uygarlığından da öncesine dayanmaktadır (Başer, 2000). Bu konuyla ilgili Şanidar mağarasındaki (Hakkari'nin güneyinde) yontma taş dönemine ait mezarlarda bulunan bitki türleri bunun kanıtlarından biridir. Bu konuyla ilgili diğer bir kanıt ise son yıllarda Ebla (Halep'in güneyinde) yakınında bulunan kraliyet arşivindeki tabletlerdir. Çivi yazısı ile yazılmış bu tabletlerden, bitkilerin en az 5.000 yıldan beri Anadolu'da tedavi amacıyla kullanıldığı anlaşılmaktadır (Kefser ve ark., 2002). Tarih öncesi dönemin yanı sıra Asur, Sümer ve Akad medeniyetlerinde de bitkiler tedavi amacıyla kullanılmıştır. M. Ö. 3000 yıllarına kadar uzanan tabletlerdeki yazılardan bu medeniyetler döneminde sihir ve bitkisel ilaçlar yardımıyla tedavinin yapıldığı belirlenmiştir. Adamotu, banotu, haşhaş, kekik, nane, nar kabuğu ve safran gibi 250 kadar bitkinin bu dönemde kullanıldığı bilinmektedir (Baytop, 1999). Anadolu'da tarih boyunca bitkilerin yaygın kullanımının nedeni şüphesiz ki bu bölgenin sahip olduğu fitocoğrafik özelliklerin bir sonucudur. Çeşitli iklim tiplerinin etkisinde bulunması ve sahip olduğu coğrafik konum, Anadolu'daki flora çeşitliliğinin oluşumunda en önemli etkenlerdir (Başer, 2000). 11.000'in üzerindeki bitki türüyle zengin bir floraya sahip olan Anadolu'da yaklaşık 3000 adet endemik bitki türü bulunmaktadır (Coşkun ve Özkan, 2005). Endemik

oranının Avrupa'ya kıyasla fazla olması Anadolu'nun ekolojik önemi ve flora zenginliğinin bir göstergesidir.

Tıbbi bileşiklerin kaynağı olan bitkiler, antik çağ uygarlıklarından, günümüzün gelişmiş modern toplumlarına kadar pek çok insan tarafından sağlığın korunmasında önemli bir araç olarak kullanılmıştır. Modern ilaçların %50'den fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun günümüzde de etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Örneğin, gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun %64'ünün bitkileri tedavi amaçlı olarak kullandığı anlaşılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık %25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Babaoğlu, 2002). Avrupa Birliği üyesi ülkelerin son araştırmalarına göre, yaklaşık olarak 1400 adet bitkisel preparat özellikle Almanya, Fransa, Belçika ve Hollanda'da temel sağlık hizmetlerinde kullanılmaktadır (Hoareau ve Da Silva, 1999).

Bitkilerden elde edilen bu doğal ürünler farmasötik endüstrinin ilaç geliştirme programlarında ciddi bir öneme sahiptir (Nair ve ark., 2005). Günümüzde bitkilerden özütlenerek tüm dünyada tıbbi tedavide kullanılan 119 adet ilaç bulunmaktadır. Bu nedenle ilaç geliştirme çalışmalarının birinci basamağı olarak bitkilerin araştırılması mantıklı bir gerekçe olarak görülmektedir (Farnsworth, 1990).

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasalların ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır. Boyadan gıda endüstrisine kadar çeşitli alanlarda kullanılan bu aktif doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle *in vitro* antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, yeni antimikrobiyal ajan ve doğal antioksidan madde geliştirme çalışmaları için bitkilerin yeni ve zengin birer araştırma kaynağı olarak görülmelerine neden olmaktadır.

Antibiyotiğin 1940'larda ortaya çıkışından sonra, bitkisel maddelerin antibiyotik olarak kullanımında düşüş gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite açısından bakteriyel ve fungal kaynaklı antibiyotiklere daha çok güvenildiğinden dolayı bitkisel ürünlerin çok az bir kısmı antimikrobiyal madde olarak tercih edilmiştir (Cowan, 1999). Ancak penisilinin bulunuşunun hemen ardından *Staphylococcus aureus*'un direnç gösterdiği

rapor edilmiş ve 1960'lerden itibaren bakterilerde gözlenen antibiyotik direnci yaygın bir sorun haline almıştır. Bugün gelinen son noktada, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* gibi pek çok patojen mikroorganizma sahip oldukları çoklu direnç mekanizmalarından dolayı "süper mikroplar" olarak adlandırılmaktadırlar. Bunun paralelinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve bazı profesyonel organizasyonlar tarafından global bir sorun haline gelen bakteriyel direnç konusunda halkın bilincini yükseltmek için çeşitli koalisyon ve eylem planları geliştirilmiştir (Biletler, 2000). Öte yandan bilim adamları da direnç geliştiren bakterilere karşı koyabilmek için alternatif antibiyotik ajan üretme çalışmalarını hızlı bir şekilde sürdürmektedirler. Bu aşamada tıbbi bitkiler sahip oldukları fitokimyasallardan dolayı önemli birer araştırma kaynağı haline gelmişlerdir. *In vitro* koşullarda yapılmış olan pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Okeke ve ark., 2001; Rios ve Recio, 2005; Canales ve ark., 2007).

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antioksidan özellikleri de yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Eryılmaz, 2001; Tepe ve ark., 2004; Harput ve ark., 2006). Hücrelerdeki oksijenli solunumun doğal bir sonucu olarak serbest radikaller oluşabilmektedir. Serbest radikaller reaktif oksijen türevleridir ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein ve karbonhidratların oksidasyonuna yol açacak hücresel yaşlanma, kanser ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedirler. Bununla birlikte hücreler reaktif oksijen türlerini ortadan kaldıracak çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Ancak bu savunma mekanizmaları yetersiz kaldığı zamanlarda oksidatif stres canlı bünyesinde kanser, inflamasyon, romatoid artrit gibi çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabilmektedirler (Mantle ve ark., 1998; Eryılmaz, 2001). Günümüzde besin endüstrisinde ticari olarak kullanılan çeşitli sentetik antioksidan maddeler mevcuttur. Ancak bu sentetik antioksidanların olumsuz sağlık sorunlarını tetikleyeceğine dair bilgiler bulunmaktadır (Koleva ve ark., 2002). Örneğin bu kimyasalların farelerde akciğer harabiyeti, karaciğerde nekroz ve kanamaya bağlı ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Candan ve Sökmen, 2004). Bu kısıtlayıcı nedenlerden dolayı sentetik antioksidan ajanların yerini alabilecek doğal antioksidan madde araştırmalarında bitkiler çok önem kazanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışma ile, *Scrophulariaceae* familyasına ait iki yıllık bir Hatay endemiği olan *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze bitkisinden çeşitli özütlerin elde edilmesi, bu özütlerin çeşitli gram pozitif, gram negatif bakteriler ve bir adet fungusun dahil olduğu 15 farklı mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi ve iki farklı yöntemle bitki ekstraktının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

İnsanoğlu tarihi boyunca bitkilerden ilaç, parfüm, yiyecek olarak faydalanmıştır. M.Ö. 2600 yılında yazılmış ve tedavinin bitkilerle yapıldığına dair ilk kanıtlar Mezopotamya’da bulunmuştur. Toprak tabletler üzerine çivi yazısı ile yazılmış bu ilk kanıtlarda, yaklaşık olarak 1000 adet bitkinin içeriğinin geleneksel tedavide kullanıldığı belirtilmiştir. *Cedrus* L. (sedir) türleri, *Cupressus sempervirens* (mazı), *Glycyrrhiza glabra* (meyan kökü), *Papaver somniferum* (haşhaş) gibi bitkiler tabletler üzerinde adları bulunan bitkilerdendir. Bu bitkileri bugün de öksürükten soğuk algınlığına kadar pek çok rahatsızlığın tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir (Newman ve ark., 1999).

Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı antik çağlardan bu yana bir artış göstermektedir. Örneğin Mezopotamya uygarlığı döneminde kullanılan bitkisel drog sayısı 250, Grekler döneminde 600, Arap Fars uygarlığı döneminde ise 4000 kadardır. 19. yüzyılın başlarında ise bilinen tıbbi bitki sayısının 13.000’e ulaştığı bildirilmiştir (Baytop, 1999).

Son yıllarda bitkiler kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel tedavi yöntemlerine adeta bir geri dönüş yaşanmış ve bu alan oldukça popüler hale gelmiştir. Örneğin Amerika’da 1996 yılında, bir önceki yıla göre %37 oranında daha fazla bitkisel ilaç satıldığı rapor edilmiştir (Cowan, 1999). Baytop’a (1999) göre; tıbbi bitkilere olan ilginin bu denli artmasının başlıca sebepleri şunlardır;

- 1- Yeterli kimya endüstrisine sahip olmayan kalkınma yolundaki ülkelerin bu bitkileri kullanarak olumlu sonuçlar almaları;
- 2- Tedavide kullanılan sentetik bileşiklerden bazılarının yan etkilerinin bulunması,
- 3- Bazı ilaç etken maddelerinin bitkisel droglardan sentetik olanlara göre daha ucuza elde edilmeleri,
- 4- Bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları
- 5- Enfeksiyon hastalıklara neden olan mikroorganizmaların direnç geliştirmesi.

Bakterilerin genetiksel yolla birbirlerine aktardıkları antibiyotik direnç mekanizması, son elli yıl içerisinde önemli bir problem haline gelmiştir. Özellikle günümüzde yaygın hale gelen ve ciddi bir tehdit oluşturan çoklu antibiyotik direncine karşı, hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotik sayısı giderek azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen kimyasalların dirençli bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivite göstermesi, bitkilerin bakteriler üzerinde sentetik

antibiyotiklerden farklı bir etki mekanizması ile inhibisyon gerçekleştirdiği fikrini desteklemektedir. Bu nedenlerden dolayı bitkiler ilaç geliştirme endüstrisinin başlıca araştırma kaynağı haline gelmiştir (Çöleri, 2001 ).

Tıbbi bitkilerin halk arasında ne tür hastalıkların tedavisinde kullanıldığını belirlemek için gerek ülkemizde, gerekse Dünya'nın pek çok yerinde etnofarmakolojik araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmaların ışığında; *Teucrium polium*'un romatizma tedavisinde, *Rhus coriaria*'nın gastrik ülser ve böbrek ağrılarının giderilmesinde, *Ranunculus ficaria* ve *Centaurea drabifolia*'nın hemoroid tedavisinde, *Helichrysum melanacme*'nin baş ağrısı, ateş ve göğüs ağrısı hastalıklarında kullanıldığı belirtilmiştir (Yeşilada ve ark., 1993; Gürhan ve Ezer, 2004; Lall ve ark., 2006). Ayrıca, *Melissa officinalis*, *Allium sativum* ve *Melaleuca alternifolia*'nın antibakteriyel ajan olarak, *Rubus canescens*'in antipiretik olarak, *Mentha longifolia*'nın antihelmintik, *Plantago major*'un malarya hastalığına karşı, *Asparagus acutifolius*'un öksürüğe karşı kullanıldığı rapor edilmiştir (Yeşilada ve ark., 1993; Rios ve Recio, 2005).

Bitkilerin iyileştirici etkisi sahip oldukları sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Özellikle bitki savunma sisteminde önemli görevler üstlenen sekonder metabolitlerin, yapılan *in vitro* çalışmalarda çeşitli patojen mikroorganizmaların büyümelerini inhibe ettikleri ve antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

## 2.1. Bitkilerin Sekonder Metabolitleri

Bitkiler primer metabolitlerin aksine; besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşımayan ve bitki büyüme, gelişiminde doğrudan görev almayan organik maddeler üretirler. Bu maddeler “**sekonder metabolitler**” olarak isimlendirilir ve sekonder metabolizma süreci sonucunda üretilirler.

Sekonder metabolitler, bitki hücresinin yapısında bulunan ve devamlılığın sağlanmasında temel göreve sahip olan karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit gibi birincil metabolizma ürünlerinden farklılık gösterirler (Briskin, 2000).

Sekonder metabolitler kimyasal olarak 3 farklı grupta toplanırlar. Bunlar terpenler, fenolikler ve alkaloidlerdir. Fitokimyasallar olarak da adlandırılan sekonder metabolitler ilk keşfedildiklerinde bugün hak ettikleri üne kavuşmuş değillerdi. Çünkü sekonder metabolitler, kimyasal yapılarının ve çeşitliliğinin bilinmesine rağmen pek çok

botanikçi tarafından, bitkiler için önemsiz ve hatta atık metabolitler olarak kabul edilmişti (Hartmann, 1996). Fakat organik kimyacılar, 1850'lerden beri yaygın bir şekilde bu ürünlerin kimyasal özelliklerini araştırmış ve her geçen gün bu yeni fitokimyasal ürünlere karşı gösterdikleri ilgiyi arttırmışlardır. Bugünkü çağdaş organik kimyanın temelini teşkil eden ayrıştırma tekniklerinin gelişmesi, bu doğal ürünler üzerine yapılmakta olan çalışmaları da teşvik etmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sekonder metabolitlerin bitki bünyesindeki önemli ekolojik işlevi de yavaş yavaş aydınlatılmaya başlanmış ve bu kimyasalların bitkinin çevresiyle olan etkileşiminde oldukça önemli rolleri olduğu saptanmıştır. Geline son noktada, sekonder metabolitlerin bitkiyi herbivor ve patojen saldırılarına karşı koruduğu, allelopatide aktif rol oynadığı ve palinatörleri cezp etmede önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Babaoğlu, 2002). Organik Kimya alanındaki gelişmelerin ışığında sekonder metabolitler üzerine oluşan ilgi sadece akademik boyutta kalmamıştır. Bu kimyasalların aynı zamanda boya, zambak, tutkal, parfümeri, tatlandırıcı ve polimer sanayinde kullanılması, onları endüstriyel alanda da önemli kılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda sekonder metabolitlerin biyolojik etkilerinin aydınlatılmasıyla birlikte bu kimyasallar bugün herbisit, insektisit, ilaç ve alternatif antibiyotik ajan araştırmalarının odağında yer almaya başlamıştır (Buchanan, 2000). Bitkilerden elde edilen bu aktif doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması bu alanla ilgili pek çok çalışmaya ön ayak olmuştur.

Etnofarmakolojik araştırmaların sonuçlarına dayanılarak yapılan çalışmalarda, bitkilerden elde edilen özütlerin çeşitli biyolojik aktiviteler ile antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur.

## 2.2. Bitkilerin *In Vitro* Biyolojik Aktiviteleri

Gerek aromatik gerekse tıbbi bitkilerin çeşitli yöntemlerle elde edilen özütlerinin antibakteriyel etkilere sahip oldukları bilinmektedir (Dorman ve Deans, 2000). *In vitro* ortamda yapılmış olan pek çok çalışmada da çeşitli bitkilerden elde edilmiş özütlerin antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Sökmen ve ark., 1999; Nascimento ve ark., 2000; Tepe ve ark., 2004; Uysal ve ark., 2005; Sagdic ve ark., 2008). Özellikle bitkisel kaynaklı uçucu yağlarda bulunan  $\alpha$ -pinen, eucalyptol, camphor, camphene ve borneol gibi terpenlerin *in vitro* ortamda *Staphylococcus aureus*,

*Moraxella catarrhalis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis* gibi patojen mikroorganizmalara karşı önemli derecelerde inhibisyon zonları oluşturdıkları gözlenmiştir (Tepe ve ark., 2004). Ayrıca *Iris germanica* L. bitkisinin rizomlarından elde edilen izoflavonoidlerin (5,7,3'-trihidroksi-6,4',5'- trimetoksiflavon ve 5-hidroksi-4'-metoksi, 6,7-metilendioksiflavon) *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde etkili oldukları belirlenmiştir. *Buxus longifolia* L. bitkisi ile yapılan antibakteriyel aktivite incelemeleri sonucunda *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri üzerinde etkili buxamarine, (+)-siklovirobuxeine-F bileşikleri izole edilmiştir. Bu bileşiklerin azot ihtiva eden ve steroidal yapıya sahip oldukları saptanmıştır (Şener, 2004). Ayrıca Sakarya yöresinde halk tarafından antifungal olarak kullanılan *Arum maculatum*, bronşit, akne ve egzema için kullanılan *Datura stramonium*, yaralanmalarda kullanılan *Geranium asphodeloides* ve romatizma ağrılarında kullanılan *Equisetum telmateia* bitkilerinin petrol eteri ekstraktlarının patojen mikroorganizmalar üzerinde önemli antibakteriyel etki gösterdikleri belirtilmiştir (Uzun ve ark., 2004). Yine 2000 yılında İsrail'de yapılan benzeri bir çalışmada Filistin halkı tarafından etkin bir şekilde kullanılan 15 tıbbi bitkinin, patojen organizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. İnceleme sonucunda *Thymus vulgaris* ve *Thymus origanum* bitkilerinin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel etki gösterdikleri açıklanmıştır (Essawi ve Sour, 2000). Pereira ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Salvia officinalis*'ten elde edilen uçucu yağın üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilmiş patojen mikroorganizmaları %100 inhibe ettiği belirtilmiştir.

Antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra bitki özüt ve uçucu yağlarının antifungal aktivite gösterdikleri ortaya konmuştur. Çeşitli bitkilerden elde edilen uçucu yağların *Candida albicans* gibi mayalar üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu belirtilmiştir (Tepe ve ark., 2004). Bitki özütlerinin *in vitro* antifungal aktiviteleri üzerine yapılmış olan bir çalışmada, *Avena sativa* (yulaf), *Hedera helix* (duvar sarmaşığı) ve *Datura stramonium* (şeytan elması) gibi bitkilerin bitki patojeni bazı funguslar üzerinde antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Türküsay ve Onoğur, 1998). 1999 yılında Ürdün'de yapılan bir diğer çalışmada *Bryonia syriaca* ve *Ononis spinosa* bitkilerinden elde edilen özütlerin, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Fusarium moniliforme*



funguslarına karşı antifungal ajan olarak kullanılan mikonazol nitrattan on kat daha etkili oldukları bildirilmiştir (Mahasneh ve El-Oqlah, 1999).

Tıbbi bitkilerin antiviral aktivitelerine ilişkin de çok sayıda veri bulunmaktadır. Baharat, çay ve gıda olarak kullanılan pek çok bitkinin uçucu yağının yüksek oranda antiviral aktivite göstermiş olduğu ifade edilmektedir (Jassim ve Naji, 2003). *Sanicula europa* bitkisinin rizomlarından elde edilen sulu ekstrenin influenza-A virüsüne karşı antiviral aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Turan ve ark., 1999). Fas'ta yapılan bir çalışmada ülkedeki Arap toplumu tarafından tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin herpes virüsüne karşı etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda halk tarafından bronşit, öksürük ve soğuk algınlığında kullanılan *Thymus maroccanus*'un, mide ağrıları ve ülser için kullanılan *Pistacia lentiscus*'un özütlerinin herpes virüsü üzerinde oldukça etkili oldukları belirtilmiştir (Mouhajir ve ark., 2001). Güney Afrika'da yapılan bir diğer çalışmada ise; *Helichrysum aureonitens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen galangin aktif maddesinin 12 µg/ml konsantrasyonda HSV-1 (herpes simpleks virüs tip 1), 47 µg/ml konsantrasyonda ise Cox B1 (koksaki B virüs tip 1) virüslerine karşı inhibisyon etkisi gösterdiği ve önemli derecede antiviral aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Meyer ve ark., 1997).

Dünyanın tropikal bölgelerinde yılda en az bir milyon kişinin ölümüne neden olan sıtma hastalığına karşı insanlar bitkilerden faydalanmışlardır. Yapılan çalışmalarla *Artemisia annua* bitkisinden izole edilen artemisinin etken maddesinin sıtmaya karşı önemli aktivite gösterdiği ve tedavide kullanıldığı ifade edilmiştir. Ayrıca Avrupa'da aromatik özelliklerinden dolayı kültürü yapılan *A. abrotanum*'dan izole edilen etken maddelerin antimalaryal aktivite gösterdiği de belirtilmiştir (Schwikkard ve Heerden, 2002).

Halk arasında migrene karşı kullanılan ve antiinflamatuar etkisi çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş olan *Tanacetum parthenium*'un içerdiği bir seskiterpen lakton türevi olan partenolid ve diklorometan özütünün antileişmanyal aktivitesi araştırılmıştır. Bu araştırmaların sonucuna göre, partenolid 0.37 µg/ml, diklorometan özütü ise 3.6 µg/ml konsantrasyonlarında *Leishmania amazonensis*'in promastigot formunu üzerinde %50 oranında inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Elde edilmiş olan bu sonuçlar antileişmanyaya ilaçlarının geliştirilmesinde bitkilerin önemli bir kaynak olabileceği fikrini desteklemektedir (Tiuman ve ark.,2005a; Tiuman ve ark., 2005b).

Bitkiler antimikrobiyal aktivite göstermelerinin yanı sıra sitotoksik kapasiteye de sahip olabilmektedirler. Kıvçak ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Ceratonia ciliqua* bitkisinden elde edilen metanol ve su özütlerinin hem antimikrobiyal hem de sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kıvçak ve ark., 2002). Türkiye’de yetişen bazı tıbbi bitkilerden ve bu bitkilerin doku kültürlerinden elde edilen özütler ile yapılan bir araştırmada ise, *Ecbalium elaterium* bitkisinin hücre kültüründen elde edilen özütün sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Sökmen, 1999).

*Scrophulariaceae* familyasına ait olan *Verbascum* türleri yüzyıllar boyunca çeşitli dahili ve harici enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır. Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika’daki toplulukların çoğu da *Verbascum* türlerinin çeşitli aktif bileşen maddeler içeren yaprak ve çiçeklerinin çeşitli amaçlar doğrultusunda kullandığı rapor edilmiştir (Maurer-Grimes ve ark., 1996). Yapılan araştırmalarla *Verbascum* türlerinin çiçeğinin, müsilaj, uçucu yağ, hesperozit ve verbaskozit gibi flavon glikozitleri, yaprağının ise; saponin, müsilaj, rezin ve acı maddeler ihtiva ettiği belirtilmiştir (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 2003). Ayrıca *Verbascum* türlerinin çok geniş oranda aucubin, ajugol ve harpagozit gibi iridoid glikozitleri ile verbaskozit gibi feniletanoid glikozitleri içerdikleri bildirilmiştir. Avrupa kökenli *Verbascum* türlerinin ise iridoit, lignan, saponin, flovanoit ve sterol içerdikleri de belirtilmiştir (Akdemir ve ark., 2004).

Adi sığırkuyruğu olarak adlandırılan *Verbascum thapsus*’un yaprak ve çiçekleri sakinleştirici olarak ve bronşit, astım gibi solunum yolu hastalıklarıyla kuru öksürükte kullanılmaktadır (Türker ve Camper, 2002). Anadolu’da *Verbascum siniatum* türünün tohumları taşıdıkları zehirli saponinlerden ötürü balık avlamada kullanılır (Baytop, 1999). Etiyopya’da yapılan bir çalışmada *V. siniatum*’un halk tarafından şarbon, fil hastalığı, yüzeysel mantar enfeksiyonları ve yaralanmalarda kullanıldığı rapor edilmiştir (Tadeg ve ark., 2005).

*Verbascum* bitkisinin çeşitli türlerinin *in vitro* biyolojik aktiviteleri üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; *V. thapsus* yapraklarından elde edilen özütün herpesvirus tip 1’e karşı antiviral (Mc Cutcheon ve ark., 1995), metanol özütünün ise sivrisinek larvalarına karşı inhibisyon aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Gross ve Werner, 1978). Ayrıca Türker ve Camper (2002) tarafından yapılan bir çalışmada aynı bitkinin çeşitli çözücülerle elde edilen özütlerinin antibakteriyel ve

antitümoral aktivite gösterdiği ve bu sonuçların *V. thapsus*'un halk arasında kullanım gerekçeleriyle paralellik gösterdiği ifade edilmiştir.

Bir başka çalışmada; *Verbascum arcturus* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilmiş olan özüt *Leishmania donovani*'nin promastigot kültürüne karşı uygulanmış ve sonuçta bu bitkinin antileişmanyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Fokialakis ve ark., 2007).

Anadolu'da çiçekleri diüretik, ekspektoran ve sedatif amaçlı olarak kullanılan *Verbascum pseudoholotrichum*, *Verbascum cymigerum*, *Verbascum cholorostegium*, *Verbascum linguifolium*, *Verbasum pellitum* bitkilerinden elde edilen metanolik özütlerin özellikle gram pozitif bakteriler ve mayalar üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (Dülger ve ark., 2005).

*Verbascum* türlerinden *V. chianophyllum*, *V. cilicium*, *V. trapifolium*, *V. meinckeanum*, *V. lyratifolium*'un, *V. gypsicola*, *V. olympicum*, *V. prusianum* ve *V. bombyciferum*'dan elde edilen metanolik özütlerin gram pozitif bakteriler ve mayalar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Dülger ve ark., 2002; Dülger ve Gönüz, 2004; Dülger, 2006)

Magiatis ve arkadaşları (2001) tarafından *Verbascum undulatum* bitkisinin köklerinden ilk defa bir makrolik dimer lakton türevi olan verbalakton maddesi izole edilmiştir. Elde edilen bu verbalaktonun *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* gibi gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde önemli derecelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Gürbüz ve arkadaşları tarafından *in vivo* olarak ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada *Verbascum cheiranthifolium* Boiss. var. *cheiranthifolium* bitkisinin çiçeklerinin antiülserojenik aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Gürbüz ve ark., 2005).

Ayrıca *In vivo* olarak yapılan bir diğer çalışmada, *Verbascum pycnostachyum* bitkisinden çiçeklerinden elde edilen metanolik özütün antienflamatuvar ve antinociceptive etki gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu olumlu sonuç bilim adamları tarafından, bu bitkinin halk arasında kullanımının bilimsel gerekçesi olarak yorumlanmıştır (Tatlı ve ark., 2007).

### 2.3. Bitkilerin *In Vitro* Antioksidan Özellikleri

Atomlardaki elektronlar orbitaller olarak bilinen enerji seviyelerinde bulunurlar. Her bir orbital zıt yönde hareket eden 2 adet elektron tutabilir ve atom ancak bu şekilde stabilitesini koruyabilir. Ancak atom veya molekül dış yörüngesinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeriyorsa bu durumda radikal adını alır. Yapısında bulunan çiftleşmemiş elektron veya elektronlar molekülün kimyasal aktivitesini değiştirir. Bu serbest radikaller hücre harabiyetine neden olan etkenlerin başında yer almaktadır. Serbest radikaller bir dizi reaksiyon sonucunda aktif radikallere dönüşerek; doku hasarı, organ fonksiyonunun bozulması ve radikal hasarına bağlı hücre ölümlerine neden olabilmektedirler (Eryılmaz, 2001).

Aerobik organizmalarda bulunan serbest radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklindedir. Çünkü oksijen ortamda sürekli bulunan ve elektrofilik ataklara en uygun olan moleküldür. Oksijenin normalde reaktif olmayan bir yapısı vardır. Ancak *in vivo* koşullarda oksidan maddelerle karşılaştığında metabolize olarak reaktif forma dönüşür ve reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturur. Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $\Delta gO_2$ ), nitrik oksit ( $NO^{\cdot}$ ) ve peroksi radikalleri ROT'lara örnek olarak verilebilir (Eryılmaz, 2001).

Son zamanlarda reaktif oksijen türlerinin ve özellikle serbest radikallerin kanser ve arterosklerozis gibi hastalıkları tetiklediği de kabul edilmiştir (Cuendet ve ark, 1997). Ayrıca serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu, ROT'lara bağlı hücre harabiyetinin en önemli nedeni olarak tanımlanmaktadır. Yağ asitleri biyolojik membranların önemli bileşenlerdir ve özellikle çoklu doymamış yağ asitleri çift bağlarından dolayı oksidatif hasara karşı çok hassastırlar. Bir serbest radikal membrana yakın oluştuğunda, membran fosfolipitlerinin özellikle doymamış yağ asiti yan zincirine, saldırır. Serbest radikal yan zincirdeki karbon atomlarından birinden bir hidrojen alarak su oluşturur. Bu reaksiyon serbest radikali oluşturur fakat membranda karbon merkezli bir radikal bırakır. Oluşan bu radikal moleküler oksijen ile reaksiyona girerek bir başka radikali meydana getirir. Açığa çıkan radikal ise hidrojen çıkarmak için komşu yağ asitlerine saldırabilecek kadar aktiftir. Bu saldırı ile karbon merkezli bir başka radikal oluşur ve böylece zincir reaksiyonu devam eder. Lipid peroksidasyon reaksiyonu sonucunda oluşan lipid hidroperoksitler bir dizi oldukça kuvvetli toksik ürünler oluşturmak üzere parçalanırlar. Sonuç olarak lipid peroksitler, çeşitli yağ

zincirlerinde oksidasyon, membran proteinlerinde hasar ve membranda sızıntı yaratarak membranın tamamen yıkılmasına neden olurlar (Özen, 2003).

Serbest radikalleri bertaraf ederek yarattıkları olumsuz etkileri ortadan kaldıran maddeler antioksidan maddeler olarak adlandırılmaktadır. Genel olarak antioksidan maddeler koruyucu antioksidanlar ve zincir kırıcı antioksidanlar olmak üzere 2 kategoride sınıflandırılabilirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve transferrin gibi enzimler koruyucu antioksidan grubuna dahil edilirler. Radikal süpürücü ve lipid peroksidasyonunu önleyici özelliklere sahip olan Vitamin C, vitamin E, bilirubin ve polifenoller ise zincir kırıcı antioksidanlar grubuna girmektedirler.

Zincir kırıcı antioksidanlar etkilerini, oksidasyon sürecinde ortaya çıkmış olan peroksil radikalleri üzerine hidrojen veya tekli oksijen atomu transfer ederek gösterirler. Fenoliklerin de dahil olduğu pek çok antioksidan madde oksidasyon sürecindeki etkisini H atomu transfer ederek gerçekleştirmektedir (Ou ve ark., 2002).

Antioksidan maddeler lipid peroksidasyonunun çeşitli aşamalarında; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltma,  $O_2^{\cdot -}$  ve  $OH^{\cdot}$  gibi reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırma, peroksitleri parçalayarak zincir reaksiyonu oluşturan radikellere dönüşümlerini engelleme, katalitik metal iyonlarını bağlama ve başlamış olan bir radikal zincir reaksiyonunu kırma şeklinde etkilerini göstermektedirler (Özen, 2003).

Özellikle sentetik antioksidan maddelerin olumsuz etkilerinden dolayı doğal kaynaklı antioksidanlar ilgi odağı olmuştur. Bitkilerden izole edilen fenoller (flavonoid, tokoferol), azotlu bileşikler (alkaloid, aminoasit ve aminler), karotenoidler ve askorbik asit doğal kökenli antioksidanlar olarak kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların kanser vb. gibi çeşitli hastalıkları tetikleyebileceği şüphesinden dolayı, bitkiler alternatif antioksidan madde araştırmaları için önemli birer kaynaktır (Veliöglü ve ark., 1998). Bitkilerden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların *in vitro* ortamda antioksidan aktivite gösterdiğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Ünlü ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Thymus pectinatus* bitkisinden izole edilen uçucu yağ ve metanolik ekstraktın antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Vardar-Ünlü ve ark., 2003). *Cyclotrichium origanifolium* bitkisinin uçucu yağ ve çeşitli özütleriyle yapılmış olan antioksidan aktivite araştırmasında ise bitkinin polar özütlerinin non-polar olanlara göre daha yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Tepe ve ark., 2004). Koşar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Rhus coriaria* (sumak) bitkisinin

meyvelerinin fenolik, tanen ve antosiyanin içerdiği ve bu maddelerin önemli oranda antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Koşar ve ark., 2002). Sarı kantaron veya binbirdelik otu olarak adlandırılan *Hypericum perforatum* bitkisinin metanolik özütünün antioksidan aktivitesi ve fenolik içeriği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda bitkinin içerdiği fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu ve fenolik madde içeriğinin arttığı oranda antioksidan aktivitenin de arttığı bildirilmiştir (Meral ve Konyalıoğlu, 2002).

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarının yanı sıra çeşitli *Verbascum* türlerinin özütleri antioksidan aktivite açısından da araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin *Verbascum densiflorum* bitkisinin metanolik ekstraktının oldukça güçlü bir radikal süpürücü etkiye sahip olduğu yapılan çalışmayla belirlenmiştir (Mariassyova ve Hieleroova, 2004). Diğer bir çalışmada ise *Verbascum lesianthum*'dan izole edilen ve bir iridoid glikoziti olan harpagozit ve feniletaloid glikoziti olan pulimozit kimyasallarının önemli derecede radikal süpürücü ajan olarak antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (Akdemir ve ark., 2004).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze (Sığırkuyruğu) Bitkisinin Toplanması ve Teşhisi

Tez kapsamında kullanılan bu bitkinin lokalitelerinin Çevlik ve Batıayaz (Samandağ-Hatay) olduğu belirlendikten sonra bu lokalitelerden Haziran-Temmuz (2007) aylarında bitkisel materyal toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Davis'e göre Dr. Hikmet Yolcu tarafından yapılmıştır. Buna göre bitkinin *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze bitkisinin fotoğrafı

##### 3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışma kapsamındaki antimikrobiyal aktivite deneylerinde 14 adet bakteri ile 1 adet fungus kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında kullanılan gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* O157 H:7, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* NCTC 8394 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarından, gram pozitif bakterilerden *Enterococcus gallinarum* CDC-NJ-4, *Enterococcus faecium* NJ-1 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden ve gram negatif bakteriler *Escherichia coli* ATCC 35218, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ile *Candida albicans* ATCC 10231 fungusu Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bitkinin Kurutulması ve Özütleme İşlemleri

Batıyaz ve Çevlik civarından toplanan *V. pinetorum* bitkisinin toprak üstü kısımları gölge ve hava akımının bulunduğu bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulan bitkisel materyal küçük parçalara ayrıldıktan sonra öğütücü (Premier-PRG 742) yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz halindeki materyalden 20 gram tartılarak kartuşlara yerleştirilip Soxholet apareyinde özütleme işlemlerine tabi tutulmuştur. Özütleme işlemleri artan polariteye göre özütleme ve direkt metanol özütlemesi olacak şekilde yapılmıştır (Tepe, 2002; Dülger, 2004).

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal çözücülerin tamamı Merck'ten temin edilmiş olup tüm deneysel çalışmalar en az üçer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1.1. Artan Polariteye Göre Özütleme

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere bitkisel materyal artan polariteye göre özütlenmiştir. Bu amaçla hazırlanan kartuşlar Soxholet apareyine yerleştirilerek 250 ml hexan ile 18 saat boyunca özütlenmiştir. Hexan özütlemesinin ardından bitkisel materyal diklorometan ile 6 saat boyunca özütlenmiştir. Bu özütlemelerin ardından bitkisel materyalin içermiş olduğu non-polar kısımlar hexan ve diklorometan çözümlerinin içerisine alınmıştır. Diklorometanla yapılan özütlemenin



ardından bitkisel materyal 6 saat süreyle metanol ile özütlenmiştir. Metanol özütlemesinden sonra elde edilen yapışkan özüt kloroform ve su fazına alınmıştır. Bu sayede polar ve non-polar fazlar kademeli olarak elde edilmiştir. Bu yöntemle elde edilen özütler +4 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.1.2. Direkt Metanol Özütlemesi**

Bitkisel toz materyal (20 gr) içeren kartuşlar soxholet apareyine yerleştirilerek 250 ml metanol ile antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılmak üzere 24 saat boyunca özütlenmiştir. Ayrıca antioksidan aktivite tayini için, bitkisel materyal aynı yöntemle 8 saat boyunca metanolde özütlenmiştir.

Bu yöntemlere göre elde edilmiş olan özütler IKA marka döner buharlaştırıcıda solventin kaynama noktasının altında ve yüksek vakum uygulanarak uçurulmuştur. Sonuçta elde edilen özütler +4 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri**

#### **3.2.2.1. Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması**

Buharlaştırmanın ardından antimikrobiyal aktivite tayini için artan polariteye göre elde edilmiş olan özütler (hekzan, diklorometan, kloroform) ve direkt metanol özütü, dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde son konsantrasyonu 200 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Özütlerin apolar kısımları ise distile su içerisinde son konsantrasyonu 200 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür (Tepe, 2002; Dülger, 2004). Bu şekilde hazırlanmış olan özütler koyu renkli ve kapaklı şişelerin içerisinde antimikrobiyal aktivite deneyleri yapılmaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.2.2. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

*V. pinetorum* bitkisinden elde edilmiş olan özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemle göre çalışmada kullanılan standart bakteri suşları Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde bir gece 37 °C'de ve maya suşu ise Saboroud Dextroz Broth (SDB) besiyeri içerisinde bir gece 30 °C kültüre alınmıştır. İzotonik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi kullanılarak kültürlerin 0.5 Mc

farland ayarına uygun süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan bakteri süspansiyonları MHA besiyerlerine, maya ise SDA besiyerine inoküle edilmiştir. İnokülasyonun ardından petri plaklarının yeterince kuruması sağlandıktan sonra steril boş disklerle 50µl özüt (10 mg/disk) emdirilerek (Shtayeh ve ark., 1998) katı agar üzerine yerleştirilmiştir. Disklerin petrilere yerleştirilmelerinin ardından plaklar +4 °C'de 2 saat bekledikten sonra bakteriler 37 °C'de 24 saat, mayalar ise 30 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oluşan zon çapları (mm) ölçülerek kaydedilmiştir (NCCLS, 1999).

### 3.2.3. Antioksidan Aktivite Deneyleri

Bitki özütleri gibi pek çok kompleks içeriğin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu çeşitli yöntemlerden sadece bir tanesini uygulayarak özütün veya kompleks karışımın olası antioksidan aktivitesini belirlemek mümkün değildir. Çünkü sadece bir yöntem antioksidan aktivite gösteren bir maddenin tüm olası etki mekanizmalarını belirlemek için yeterli değildir. Bu doğrultuda *V. pinetorum*'dan elde edilen metanolik özütün antioksidan aktivitesi iki komplementer yöntem olan DPPH (2,2-Difenilpikrilhidrazil) ve beta-karoten renk açılım test yöntemi ile belirlendi (Tepe ve ark., 2006).

#### 3.2.3.1. Bitki Özütlerinin Antioksidan Aktivite Deneyleri İçin Hazırlanması

Sekiz saatlik metanol özütü, 2,2-Difenilpikrilhidrazil (DPPH) yönteminde kullanılmak üzere çeşitli konsantrasyonlarda olacak şekilde metanolde çözülerek koyu renkli şişelerde +4°C'de çalışma anına kadar saklanmıştır.

Beta-karoten renk açılım yöntemi için de *V. pinetorum* bitkisinin sekiz saatlik metanol özütü kullanılmıştır. Metanol döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra elde edilen özüt 2 g/L konsantrasyonunda olacak şekilde etanol içerisinde çözülerek koyu renkli şişeler içerisinde +4°C'de deney anına kadar saklanmıştır.

### 3.2.3.2. DPPH Yöntemi

DPPH antioksidan aktivite belirleme yöntemi Burits ve Bucar'dan (2000) modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu test yöntemi kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazilin (DPPH) elektron veya hidrojen atomları veren bir antioksidan varlığında bu kimyasal tarafından süpürülmesi ile karakteristik mor rengin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır. Dolayısıyla antioksidan madde ne kadar güçlü etki gösterirse, DPPH'nin mor renginin o derece açılması beklenir. Bu test yönteminde *V. pinetorum* bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanolik özütünün çeşitli derişimlerde metanol içinde hazırlanmış olan çözeltileri kullanılmıştır. *V. pinetorum* özütünün çeşitli derişimlerdeki çözeltilerinin 50 µL'si 5 mL %0.004'lük metanolik DPPH (Sigma) çözeltisi ile karıştırılmış ve daha sonra karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçülerek boş kontrole (50 µL metanol) karşı değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) (Sigma) ve askorbik asit (Sigma) kullanılmıştır. Özütün, boş kontrol testleri ve pozitif kontrollerin absorbans değerleri kullanılarak DPPH'nin % inhibisyonu aşağıdaki formüle göre değerlendirilerek sonuçlar grafiğe alınmıştır.

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

### 3.2.3.3. Beta-Karoten Renk Açılım Testi

Bu yöntem beta-karoten linoleik asit solüsyonundaki linoleik asidin oksidasyonu sonucunda, beta-karotenin tipik sarı renginin açılması ve bu renk değişikliğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanır.

Beta-karoten renk açılım testi Dapkevicious ve arkadaşları (1998) tarafından önerildiği şekilde uygulanmıştır. Buna göre; antioksidan aktivitesi belirlenecek olan *V. pinetorum* bitkisinin metanolik özütü ve pozitif kontrolün etanol içerisinde konsantrasyonu 2 g/L olacak şekilde test örnekleri hazırlanmıştır. 0.5 mg beta-karoten 1 mL kloroform içerisinde çözüldükten sonra içerisine 200 mg tween 80 (Merck) ile emülsiyon haline getirilmiş olan 25 µL linoleik asit (Sigma) eklenmiştir. Bu karışım iyice çalkalandıktan sonra döner buharlaştırıcıda 50 °C kuvvetli vakum altında

kloroformu uçurulmuştur. Kloroformu uçurulmuş beta-karoten linoleik asit solüsyonu üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak ve yarım saat boyunca oksijene doyurulmuş olan sudan 100 mL eklenmiş ve 1 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Bu aşamanın sonunda sarı renkli beta-karoten linoleik asit test çözeltisi elde edilmiştir. Bir test tüpü içerisinde bu çözeltinin 250 µL'si üzerine 35 µL özüt eklendikten sonra test tüpleri oda ısısında 50 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Belirli aralıklarla özütün ve kontrol gruplarının absorbansı 490 nm dalga boyunda Biospec-mini Shimadzu marka spektrofotometre ile ölçülmüştür. Boş kontrol olarak etanol (35 µL) ve pozitif kontrol olarak da BHT (bütillenmiş hidroksi toluen) kullanıldı. Deneyin sonucunda zamana bağlı olarak linoleik asit oksidasyonunun % inhibisyon değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir.

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

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada *V. pinetorum* (Sığırkuyruğu) bitkisinin toprak üstü kısımları artan polariteye göre ve direkt metanol (24 saat) ile özütlenmiştir. Elde edilen bu özütlerin antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemine göre araştırılmıştır. Ayrıca *V. pinetorum*'un 8 saatlik metanol ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilmiş olan özütün de DPPH ve beta-karoten renk açılım testi yöntemleriyle antioksidan aktivitesi belirlenmeye çalışılmıştır.

##### 4.1. Özüt Verimleri

*V. pinetorum* bitkisinden elde edilen özütlerin verimleri (g/kg) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *V. pinetorum* bitkisinin özüt verimleri (g/kg)

Özüt Tipi	Verim g/kg
Hekzan	23.64
Diklorometan	7.40
Metanol/ Kloroform	7.19
Metanol/ Su	140.67
Direkt Metanol	269.26

Özütleme çalışmaları sonucunda en yüksek verim metanol ekstraksiyonundan elde edilmiştir. Almış olduğumuz bu sonuç suda çözünmeyen maddelerin büyük bir kısmının hekzan ve diklorometanla yapılan özütleme ile çıktığı ve son aşamada metanol ile yapılan özütleme sonucunda geriye apolar maddeler ile birlikte büyük oranda polar maddelerin kalmış olabileceği görüşünü desteklemektedir (Tepe, 2002).

## 4.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

### 4.2.1. Antifungal ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotiklerden tetrasiklin, ampisilin, penisilin, eritromisin, norfloksasin, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim sulfometazol, neomisin, streptomisin ve antifungal ajanlardan nistatin pozitif kontrol olarak, test koşullarının NCCLS kriterlerini sağladığını göstermesi bakımından disk difüzyon yöntemiyle standart bakteri suşlarına karşı test edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Ayrıca DMSO'nun hiçbir test mikroorganizması üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir.

### 4.2.2. Artan Polarite Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Artan polarite özütlemesi sonucunda elde edilen özütlerin disk difüzyon yöntemine göre göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

*V. pinetorum* bitkisinde elde edilen hekzan, diklorometan, metanol/su ve metanol/kloroform özütlerin antimikrobiyal aktivitesi, 8 adet gram pozitif, 6 adet gram negatif bakteri ile bir adet maya olmak üzere toplam 15 patojen mikroorganizma üzerinde incelenmiştir. Bu sonuçlara göre her bir özütün en az bir mikroorganizma üzerinde aktivite gösterdiği bulunmuştur. Metanol/kloroform özütü, *S. aureus* ATCC 29213 (Şekil 4.1.), *S. aureus* 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *H. influenzae* ATCC 49247, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 10231 mikroorganizmaları üzerinde, 10 mm ile 14 mm arasında zon çapı oluşturan en etkili özüt olmuştur. Metanol/su özütü ise ikinci en yüksek aktiviteyi gösteren özüt olarak belirlenmiştir.

En düşük antimikrobiyal aktivite hekzan özütünde alınmıştır. Hekzan özütünün sadece *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *B.subtilis* ATCC 6633 mikroorganizmaları üzerinde aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra diklorometan özütünün, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde çeşitli derecelerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



**Çizelge 4.3.** *V. pinetorum* 'un hekzan, diklorometan, metanol/kloroform ve metanol/su (artan polariteye göre) özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zon çapları disklerin (6 mm) çapını içerecek şekilde ölçümler alınmıştır.

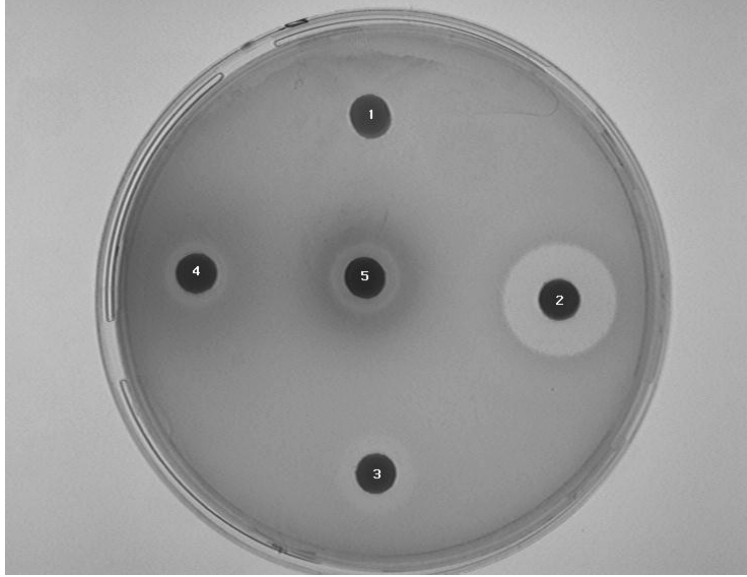
<sup>2</sup>Test edilmedi.

Mikroorganizmalar	Özüt Tipleri			
	Hekzan	Diklorometan	Metanol	
			CHCl <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	10	13	11
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	8	15	10
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8	9	10	11
<i>E. gallinarium</i> CDC-NJ-4	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> NJ-1	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O 157 H:7	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-
<i>S. typhi</i> NCTC 8394	-	-	-	-
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	-	TE <sup>2</sup>	12	14
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11	7	16	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	12

Çalışmada gram negatif bakterilerden *E. coli* O157 H:7, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *S. typhi* NCTC 8394 ve *H. influenzae* ATCC 49247, gram pozitif bakterilerden ise *E. gallinarium* CDC-NJ-4, *E. faecium* NJ-1, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. pyogenes* ATCC 19615 bakterileri çalışılan özütlere karşı dirençli olarak tespit edilmiştir.

Tüm özüt tiplerinin sadece *B. subtilis* ATCC 6633 üzerinde değişen oranlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan literatür çalışmalarında *Verbascum* türlerine ait artan polarite şeklinde bir özütlemeye ve bu özütlerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi çalışmasına rastlanılmamıştır.





**Şekil 4.1.** *V. pinetorum*'dan elde edilen özütlerin *S. aureus* ATCC 29213 bakterisi üzerinde disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivitesi  
1-Hekzan özütü; 2- Metanol/Kloroform özütü; 3-Diklorometan özütü; 4- Direkt Metanol Özütü; 5- Metanol/ Su özütü

#### 4.2.3. Direkt Metanol Özütünün Antimikrobiyal Aktivitesi

*V. pinetorum* bitkisinden elde edilen 24 saatlik metanol özütünün disk difüzyon yöntemine göre alınan antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda *V. pinetorum*'un metanolik özütü *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 ve *B. subtilis* ATCC 6633 olmak üzere üç gram pozitif, *H. influenzae* ATCC 49247, *P. aeruginosa* ATCC 27853 olmak üzere iki gram negatif ve *C. albicans* ATCC 10231 mayası olmak üzere 6 adet mikroorganizma üzerinde çeşitli derecelerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Metanolik özütün en yüksek antimikrobiyal aktivitesi 17 mm'lik zon çapıyla *H. influenzae* ATCC 49247 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakterileri üzerinde gözlenmiştir. Özütün gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 ve *B. subtilis* ATCC 6633 üzerinde daha düşük zon çapı oluşturduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** *V. pinetorum*'un direkt metanol özütünün disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal aktivitesi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Zon çapları disklerin (6 mm) çapını içerecek şekilde ölçümler alınmıştır.

Mikroorganizma	İnhibisyon zonu (mm)	Mikroorganizma	İnhibisyon zonu (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	10	<i>E. coli</i> O 157 H:7	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11	<i>E. coli</i> ATCC 25922	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8	<i>E. coli</i> ATCC 35218	-
<i>E. gallinarium</i> CDC-NJ-4	-	<i>S. typhi</i> NCTC 8394	-
<i>E. faecium</i> NJ-1	-	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	17
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	17
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	-	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-		

*V. pinetorum*'dan elde edilen metanolik özüt *S. typhi* NCTC 8394, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157 H:7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. pyogenes* ATCC 19615, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* NJ-1, *E. gallinarium* CDC-NJ-4 bakterileri üzerinde herhangi bir aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Literatürden elde edilen bilgiler doğrultusunda farklı *Verbascum* türlerinin metanolik özütlerinin gram pozitif, gram negatif bakteriler ile çeşitli mayalar üzerinde farklı oranlarda antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Dülger ve arkadaşları (2005) tarafından *Verbascum*'un farklı türlerinden elde edilen metanolik özütlerin gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis* ve funguslardan *C. albicans*, *Kluyveromyces fragilis* ve *Rhodotorula rubra*'ya karşı çeşitli derecelerde antimikrobiyal etki gösterdiklerini ancak *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* gibi gram negatif mikroorganizmaların üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etki göstermediklerini bildirmiştir (Dülger ve ark., 2002; 2004; 2005; 2006). Bir başka çalışmada *V. phoenicum*'un köklerinden elde edilen metanolik özütün *C. albicans*, yapraklardan elde edilen metanolik özütün ise *S. aureus* bakterisi üzerinde önemli derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Maurer-Grimes ve ark., 1996). Barbour ve arkadaşları (2004) *V. leptostychem*'un *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi* gibi gram negatif ve *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* gibi gram pozitif bakteriler ve *C. albicans* fungusu üzerinde %99.9

oranında antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca *V. georgicum*'un metanolik ekstraktının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği, fakat *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Keleş ve ark., 2005). *V. siniaticum*'un metanol özütü ile yapılan bir diğer çalışmada bu özütün *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği ancak *E. coli* üzerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği bildirilmiştir (Tadeg ve ark., 2005).

İki ayrı özütlemenin sonuçları karşılaştırıldığında, her iki yöntemin özütlerinin aynı mikroorganizmalar üzerine etkili olduğu görülmüştür. Fakat direkt metanol özütünün gerek etkilediği mikroorganizma sayısı, gerekse oluşturduğu zon çapı büyüklüğü açısından diğer özütlere oranla daha etkili olduğu görülmektedir. Ayrıca özütlerin hem bakteriler hem de fungus üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermesi *V. pinetorum*'un farklı etki mekanizmalarına sahip farklı antimikrobiyal bileşenler içerdiğini ortaya koymaktadır.

Artan polariteye göre yapılan özütleme yönteminde amaç bitkinin içerdiği polar ve non-polar bileşenleri kademeli olacak şekilde birbirinden ayırarak, olası antimikrobiyal aktiviteden sorumlu maddelerin hangi kimyasal yapıda olabileceğini (polar veya non-polar) belirlemektir. Fakat elde edilen sonuçlar doğrultusunda hem polar (metanol/su) hem de non-polar (hekzan, diklorometan, metanol/kloroform) özütlerinin antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca direkt metanol özütünün diğer özütlere göre daha çok sayıda mikroorganizma üzerinde etkili olması ve daha geniş çaplı inhibisyon zonları oluşturması, bitki yapısında bulunan polar ve non-polar bileşenlerin bir arada sinerjistik etki göstererek daha yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Cowan (1999), bitkilerden antimikrobiyal aktiviteye sahip tannin, polifenol, terpenoid, saponin, lakton ve flavonların izole edildiğini bildirmiştir. Ayrıca kimyasal açıdan tek bir etken maddeye dayanan sentetik ilaçların aksine bitkisel özütlerin içerdiği çeşitli kimyasalların sinerjistik etki yaparak hastalıkların tedavisine olumlu katkı sağladığı da rapor edilmiştir. Bitki kimyasallarının sinerjistik ve birden fazla farmakolojik etki göstermelerinin gerekçesi olarak da bu kimyasalların bitki savunma sistemindeki yeri işaret edilmektedir (Briskin, 2000). Söz konusu bitki kimyasallarının sekonder metabolitler olduğu bilinmektedir ve bunların bitki savunma sisteminde patojenlere karşı oldukça önemli roller üstlendikleri ve bitkiyi bu zararlılara karşı çeşitli yollarla korudukları belirtilmiştir (Hartmann, 1998).

Çalışmamızın sonucunda *V. pinetorum*'un metanolik ekstraktının *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *B. subtilis* ATCC 6633 üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği bulgusu diğer *Verbascum* türleri ile yapılmış çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ayrıca literatürde herhangi

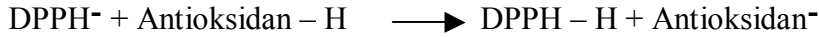
bir *Verbascum* türü ekstraktının *H. influenzae* ATCC 49247 bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle *H. influenzae* ATCC 49247 ile ilgili olarak elde etmiş olduğumuz antimikrobiyal aktivite sonuçları literatür açısından ilk kayıt olacaktır.

*Verbascum* cinsinden antimikrobiyal özelliklere sahip verbaskozit ve iridoit glikozitleri, saponin ve flavonoidler izole edilmiştir (Klimek ve ark., 1992). Verbaskozitin gram pozitif bakteriler üzerinde diğerlerine göre daha yüksek oranda antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Çalış, 2001). Bu nedenlerden dolayı çalışma materyali olan *V. pinetorum* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesinin muhtemelen yukarıda belirtilen bu etken madde gruplarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

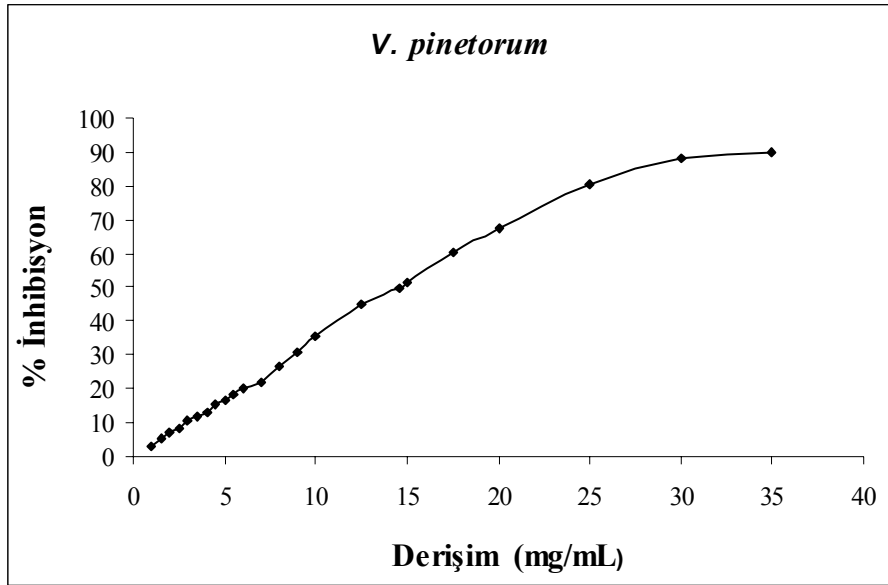
### 4.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları

#### 4.3.1. DPPH Yöntemi

Bu yöntem kararlı bir serbest radikal olan DPPH'nin metanolik çözeltisinin hidrojen içeren bir antioksidan madde varlığında ve 517 nm'deki redüksiyonuna dayanan bir yöntemdir (Burits ve Bucar, 2000).



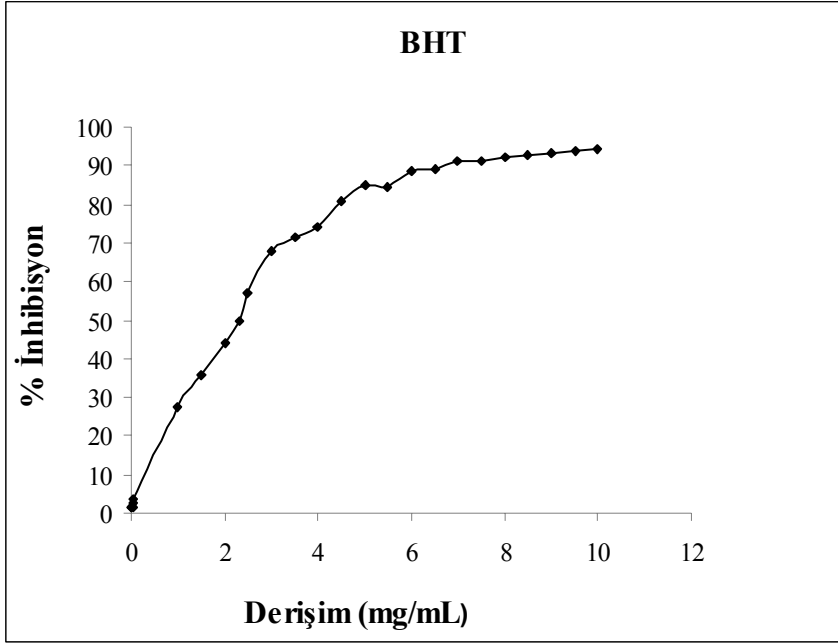
Materyal ve yöntem bölümünde ayrıntılarıyla anlatılan yöntem izlenerek; kararlı DPPH radikalının *V. pinetorum* bitkisinden elde edilen metanolik özütün varlığındaki davranışı incelenmiştir. Elde edilen metanolik özütün ve pozitif kontrollerin (BHT ve askorbik asit) stok çözeltilerinden hazırlanan farklı derişimlerdeki özütün ve pozitif kontrollerin %0.004 'lük DPPH çözeltisinin rengini açma kapasitesi % inhibisyon olarak değerlendirilmiştir. *V. pinetorum*'un metanolik özütü ile BHT ve askorbik asitin çeşitli derişimlerine karşı % inhibisyon grafikleri Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



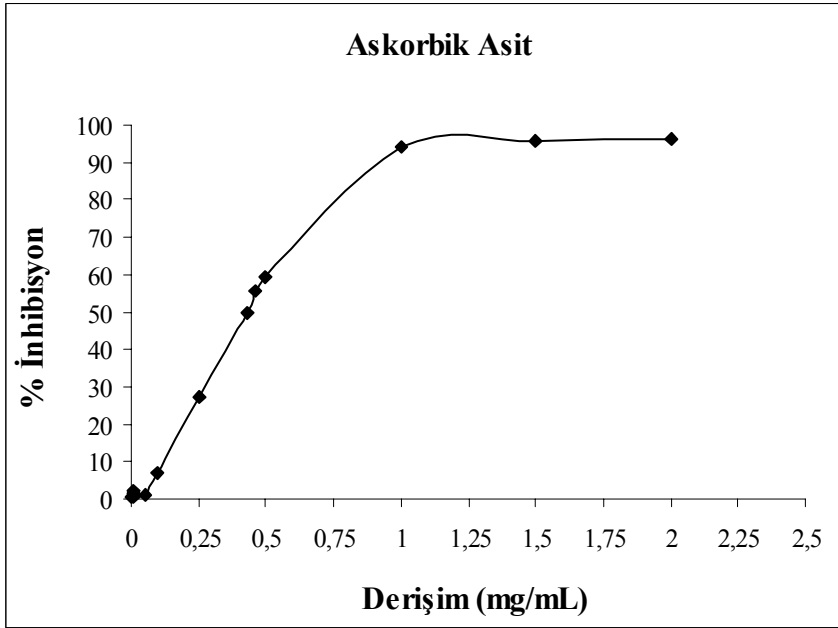
**Şekil 4.2.** *V. pinetorum*'un metanolik özütünün çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği

Bu sonuçlar doğrultusunda *V. pinetorum*'un metanolik özütünün kontrol grupları olan askorbik asit ve BHT'ye oranla çok daha yüksek bir derişimde, DPPH'yi %100 inhibisyona uğrattığı görülmektedir. Ayrıca *V. pinetorum* özütü ve kontrol gruplarının DPPH'nin %50 (IC<sub>50</sub>) inhibisyonuna neden olan derişimleri de belirlenerek Şekil 4.5'te karşılaştırmalı olarak grafik şeklinde verilmiştir.

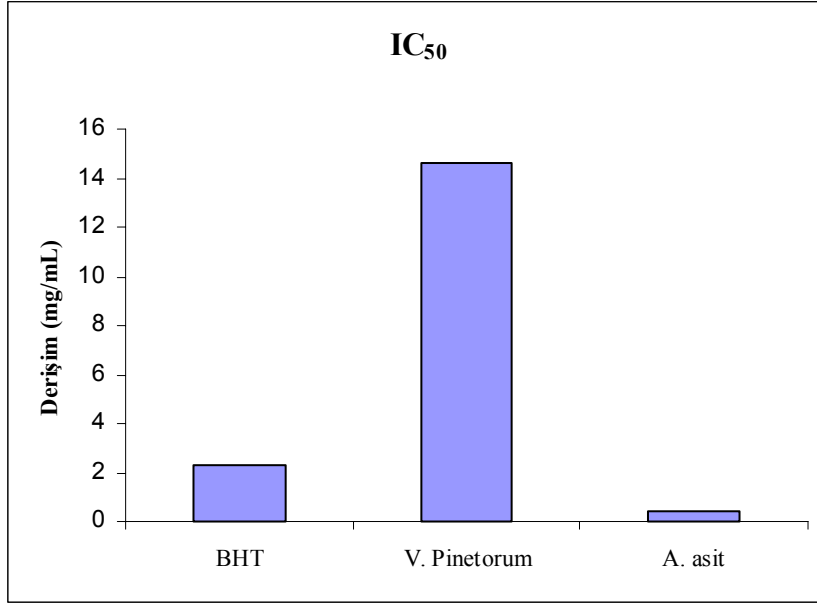
Özüt ve pozitif kontrollerin %100 inhibisyon sağlayan derişim değerlerine paralel olarak, %50 inhibisyon sağlayan derişimler incelendiğinde yine *V. pinetorum*'un IC<sub>50</sub> değerinin pozitif kontrollere oranla oldukça yüksek olduğu (yaklaşık 14 mg/ml) görülmektedir. Özütün ardından BHT'nin en yüksek IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu görülmektedir. Askorbik asitin ise oldukça güçlü bir antioksidan aktivite göstermesinden dolayı, kararlı bir radikal olan DPPH'nin aktivitesini (*V. pinetorum* ve BHT'ye göre) çok daha düşük derişimlerde inhibe ettiği görülmektedir (IC<sub>50</sub>: 0-2 mg/ml) (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. BHT'nin çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği



Şekil 4.4. Askorbik asitin çeşitli derişimlerine karşı DPPH'nin % inhibisyon grafiği

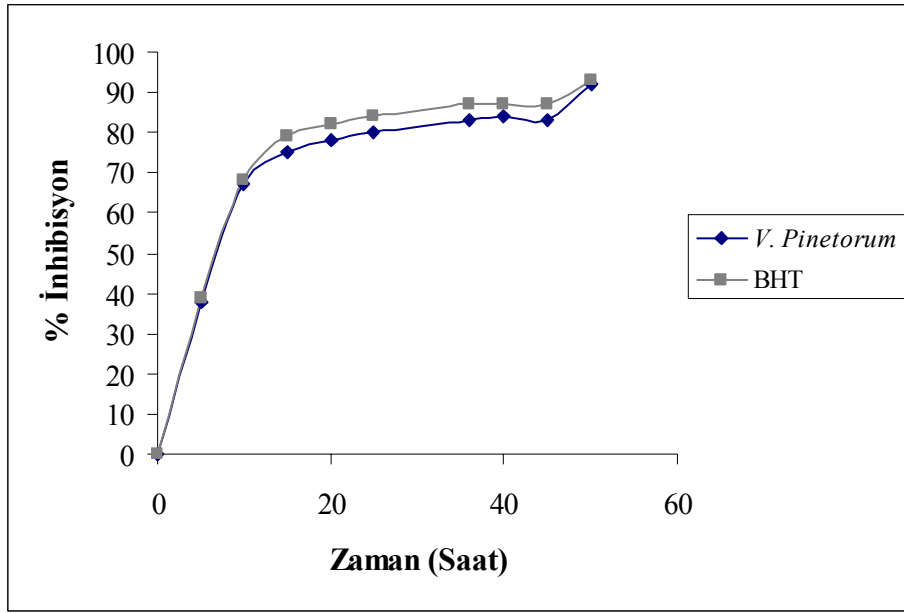


**Şekil 4.5.** BHT, *V. pinetorum* ve askorbik asitin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri

#### 4.3.2. Beta-Karoten Renk Açılım Testi

Beta-karoten linoleik asit test sistemine oksijene doyurulmuş suyun eklenmesi linoleik asitin peroksidasyonuna ve dolayısıyla beta-karotenin renginin zamana bağlı olarak açılmasına neden olmuştur. Beta-karotenin renginin açılmasının linoleik asidin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan konjuge dienler ve diğer uçucu bozunma ürünlerinden kaynaklanmaktadır (Dapkevicious, 1998). Zamana bağlı olarak beta-karotenin renginde meydana gelen değişimler 490 nm dalgaboyunda spektrofotometreyle ölçülerek absorbans değerleri belirlenmiştir. Pozitif kontrol olan BHT ve özütten elde edilen absorbans değerleri boş kontrole karşı değerlendirilerek linoleik asitin oksidasyonu üzerindeki % inhibisyon değerleri hem BHT hem de özüt için grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6.). Değerlendirme sırasında beta-karotenin açık sarı olan renginin korunması pozitif aktivite değeri olarak değerlendirilmiştir.

Beta-karoten renk açılım testinin sonuçlarına göre *V. pinetorum*'un metanolik özütü reaksiyonun başladığı ilk on saatlik süre içerisinde hızla artan ve neredeyse pozitif kontrole eşdeğer oranda bir inhibisyon göstermiştir. İlerleyen saatlerde özüt BHT'den biraz düşük seviyede olmasına rağmen yine de güçlü sayılabilecek bir inhibisyon sağlamıştır (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** *V. pinetorum* ve BHT'ye ait beta-karoten linoleik asit test sistemindeki linoleik asitin zaman bağılı olarak % inhibisyonu

Bitkilerden elde edilen bazı feniletanoid glikozitlerinin *in vitro* koşullarda oldukça güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri ve özellikle yapısında caffeic asit ve ferulic asit gibi fenolik asitler içeren feniletanoid glikozitlerin güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Çalış, 2001). Cuendet ve arkadaşları (1996) tarafından yapılan bir çalışmada ise *Fragraea blumei* bitkisinden elde edilen özellikle hidrokinoon içeren iridoit glikozitlerinin de güçlü bir şekilde antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi *Verbascum* cinsinden izole edilmiş flavonoit, feniletanoid ve iridoit glikozitleri bulunmaktadır (Klimek ve ark., 1992). Özellikle de iridoit glikozitlerinin *Scrophulariaceae* familyasının üyeleri arasında oldukça yaygın olduğu ve kemotaksonomik bir belirteç olarak bu kimyasalların önemli olduğu Akdemir ve arkadaşları (2004) tarafından yapılmış çalışmalarda belirtilmiştir. *V. pycnostachyum* ile yapılan bir çalışmada bu bitkinin metanolik özütünün iridoit glikozitlerinden okubin, ajugol, ajugozit ve harpagozit içerdiği, feniletanoit glikozitlerinden verbaskozit içerdiği ve bu glikozitlerden harpagozit ve verbaskozitin konsantrasyona bağlı olarak DPPH üzerinde inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Tatlı ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada *V. lesianthum*'um köklerinden izole edilen harpagozit (iridoit glikoziti) ve poliumozitin (feniletanoid glikoziti) güçlü antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Akdemir ve ark., 2004). Ayrıca *V. salviifolium*'dan da elde edilen glikozitlerin DPPH yöntemi ile güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Akdemir ve ark., 2004).



Yapılan çalışma sonucunda *V. pinetorum* bitkisinin metanolik özütünün antioksidan aktivitesinin diğer araştırmacıların elde etmiş oldukları bulgularla paralel sonuçlar gösterdiği bulunmuştur. *V. pinetorum*'un da bu cinsin diğer üyeleri gibi çeşitli glikozitler içerebileceği ve göstermiş olduğu antioksidan aktivitenin de bu kimyasallardan kaynaklanabileceği düşünölmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde ve/veya önleyici tedavide kullanılan pek çok bitkinin *in vitro* ortamda antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. *In vitro* ortamlarda elde edilmiş olan bu önemli sonuçlar özellikle çeşitli enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisinde bitkilerin kullanımının haklı gerekçesini açıklamaktadır.

20. yüzyılın ortasından günümüze değin hızla gelişen ve mikroorganizmalar arasında genetiksel aktarım yoluyla yayılan bakteriyel direnç bilim adamlarının alternatif antimikrobiyal madde araştırmalarına odaklanmalarını zorunlu kılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite gösteren bitkisel kökenli kimyasalların mikroorganizmaları sentetik kematerapötiklerden daha farklı mekanizmalarla inhibe ettikleri bildirilmiştir. Farklı etki mekanizmasının bir sonucu olarak özellikle antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş mikroorganizmaların bu kimyasallar tarafından *in vitro* ortamda inhibe edildiği çalışmalarla ortaya konmuştur.

Bir Hatay endemiği olan *V. pinetorum* bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacı ile yapılan çalışmada bitki özütlerinin bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilerle *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Özütlerin hem bakteriler hem de bir fungus üzerinde aktivite göstermiş olması bitkinin içeriğinde bulunan antimikrobiyal maddelerin çok çeşitli olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma sonucunda *Verbascum* bitkisinin diğer türleriyle yapılmış olan antimikrobiyal aktivite sonuçlarıyla paralel bulgular elde edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite testlerinin yanı sıra *V. pinetorum*'dan elde edilen metanolik özütün antioksidan aktivitesi de beta-karoten renk açılım testi ve DPPH yöntemleriyle belirlenmiştir. Yapılan antioksidan aktivite testlerinden beta-karoten renk açılım testi sonuçlarına göre *V. pinetorum*'un metanolik özütü çalışmada kullanılan pozitif kontrol BHT ile neredeyse eşit derecede antioksidan aktivite göstermiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda *V. pinetorum* bitkisinin çeşitli özütleriyle yapılmış olan antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarının sonuçları umut verici kabul edilmekle beraber bu aktivitelerden sorumlu fonksiyonel sekonder metabolit grup veya grupların neler olduğu üzerine net veriler ortaya koyamamaktadır. Bu nedenle daha ayrıntılı kimyasal analizlerle bitkinin kimyasal yapısının aydınlatılması, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye neden olan etken madde gruplarının saflaştırılması önerilmektedir. Ayrıca yapılan literatür taramaları sonucunda *V. pinetorum* bitkisi ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite veya kimyasal analiz sonucuna ulaşılamamış olması da bu durumun gerekliliğini desteklemektedir.

## KAYNAKLAR

- Akdemir, Z. S., Tatlı, İ. İ., Bedir, E., Khan, I. A., 2004. Neolignan and phenylethanoid glycosides from *Verbascum salviifolium* Boiss. **Turkish Journal of Chemistry**, 28: 621-628.
- Akdemir, Z. S., Tatlı I. I., Bedir, E., Khan, I. A., 2004. Acylated iridoid glycosides from *Verbascum lasianthum*. **Turkish Journal of Chemistry**, 28: 101-109.
- Ali-Shtayeh, M. S., Yagmour, R. M.-R., Faidi, Y. R., Salem, K., Al-Nuri, M. A., 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. **Journal of Ethnopharmacology**, 60: 265-271.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. **Bitki Biyoteknolojisi, Cilt I**. Sel-Ün yayınları, 374 s, Konya.
- Başer, K. H. C., 2000. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c23/CI011069.pdf>
- Barbour, E. K., Al Sharif, M., Sagherian, V. K., Harbe, A. N., Talhouk, R. S., Talhouk, S. N., 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 93: 1-7.
- Baytop, T., 1999. **Türkiye’de bitkiler ile tedavi**. Nobel Tıp Kitapevleri, 480 s, Ankara
- Biletler M., 2000. Bacterial Resistance. <http://www.accp.com/p4b4m2sample.pdf>
- Briskin, D. P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, 124: 507-514.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., 2000. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, 1250-1318.
- Burits, M., Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy Research**, 14:323-328.
- Canales, M., Hernandez, T., Serrano, R., Hernandez, L. B., Duran, A., Rios, V., Sigrist, S., Hernandez, H. L. H., Garcia, A. M., Angeles-Lopez, O., Fernandez-Araiza M. A., Avila, G., 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. **Journal of Pharmacology**, 110: 343-347.
- Candan, F., Sökmen, A., 2004. Effects of *Rhus coriaria* L. (*Anacardiaceae*) on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. **Phytotherapy Research**, 18: 84-86.
- Coşkun, M., Özkan, A. M. G., 2005. Global phytochemistry: the Turkish frame. **Phytochemistry**, 66: 956-960.
- Cowan, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. 12: 564-582.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, 4: 1144-1152.
- Çalış, İ., 2001. **Proceedings of the 3rd IUPAC international conference on biodiversity (ICOB-3)**. Antalya.
- Çöleri, A., 2001. **Bakterilerde antibiyotik direnç mekanizmaları**. Seminer notları (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 59 s, Ankara.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, van Beek R., T. A, Linssen, J. P. H, 1998. Antioxidant activity of extracts obtained different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 77: 140-46.

- Dorman, H. J. D., Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88: 308–316
- Dülger, B., Ugurlu, E., Aki, C., Suerdem, T. B., Camdeviren, A., Tazeler, G., 2005. Evaluation of antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Sideritis*, and *Stachys* species from Turkey. **Pharmaceutical Biology**, 43: 270-274.
- Dülger, B., 2006. Antimicrobial activity of some endemic *Scrophulariaceae* from Turkey. **Pharmaceutical Biology**, 44: 672–676.
- Dülger, B., Gonuz, A., 2004. Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia*, and *Stachys* species. **Pharmaceutical Biology**, 42: 301–304.
- Dülger, B., Kırmızı, S., Arslan, H., Gülyüz, G., 2002. Antimicrobial activity of three endemic *Verbascum* species. **Pharmaceutical Biology**, 40 :587–589.
- Dülger, B., Ugurlu, E., 2005. Evaluation of antimicrobial activity of some endemic *Scrophulariaceae* members from Turkey. **Pharmaceutical Biology**, 43: 275- 279.
- Ertuğ, F., 2004. Bodrum yöresinde halk tıbbında yararlanılan bitkiler. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, 76-93, Eskişehir.
- Eryılmaz, B., 2001. ***Capsicum annuum* (L.) Solanaceae meyvelerinin antioksidan aktivite açısından değerlendirilmesi**. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 102 s, Ankara.
- Essawi, T., Sour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 70: 343-349.
- Farnsworth, N. R., 1990. The role of ethnopharmacology in drug development. **Ciba Found. Symp.**, 2: 11-21.
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B. L., Khan ,S. I., Kobaisy, M., Skaltsounis, A. L., Duke, S. O., 2007. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. **Nat. Med.**, 61: 38-45.
- Gürbüz, I., Özkan, A. M, Yesilada, E., Kutsal, O., 2005. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine Pinarbasi (Kayseri, Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, 101: 313–318.
- Gürhan, G., Ezer, N., 2004. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan Bitkiler I. **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 24: 37-55.
- Gross, K. L., Werner, P. A., 1978. The biology of Canadian weeds: *Verbascum thapsus* and *Verbascum blattaria*. **Canadian Journal of Plant Science**, 58: 401-403
- Harput, Ş. Ü., Çalış, İ., Saraçoğlu, İ., Dönmez, A. A., Nagatsu, A., 2006. Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities. **Turkish Journal Of Chemistry**, 30: 383-390.
- Hartmann, T., 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 80: 177-188.
- Hoareau, L., Da Silva, J. E., 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2: 56-70.
- Jassim, S. A. A., Naji, M. A., 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, 95: 412-427.
- Karaman, Ş., Kocabaş, Y. Z., 2001. Traditional medicinal plants of K. Maras (Turkey). **The Sciences**, 3: 125-128.
- Kefser, D. E., İzmirli, M., Dığrak, M., 2002. Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. **KSU Journal of Science and Engineering**, 5: 38-46.
- Keleş, O., Ak, S., Bakırel, T., Alpınar, ,K., 2005. Türkiye’de yetişen bazı bitkilerin antibakteriyel etkisinin incelenmesi. **Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences**, 25: 559-565.
- Kıvçak, B., Mert, T., 2002. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. **Turkish Journal of Biology**, 26: 197-200.

- Klimek, B., Lavaud, C., Massiot, G., 1992. Saponins from *Verbascum nigrum* **Phytochemistry**, 31: 4368-4370.
- Koleva, I., Van Beek, T., Linssen, J. P. H., Groot, A., Evstatieva, L. N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13: 8-17.
- Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F., Başer, K. H. C., 2002. Sumak (*Rhus coriaria*)'nın fenolik bileşikleri ve antioksidan etkileri. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, 113-124, Eskişehir.
- Lall, N., Hussein, A. A., Meyer, J. J. J. M., 2006. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. **Fitoterapia**, 77: 230-232.
- Magiatis, P., Spanakis, D., Mitaku, S., Tsitsa, E., Mentis, A., Harvala, C., 2001. Verbalactone, a new macrocyclic dimer lactone from the roots of *Verbascum undulatum* with antibacterial activity. **Journal of Natural Product**, 64: 1093-109.
- Mahasneh, A. M., El-Oqlah, A. A., 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 271-276.
- Mantle, D., Anderton, J. G., Folkos, G., Barnes, M., Jones, P., Perry, E. K., 1998. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 121: 385-391.
- Mariassyova, M., Heilerova, L., 2004. Optimalization of antioxidants extraction from wool mullein (*Verbascum Densiflorum*). **3. Medicinal and Aromatic Plants of Southest European Countries, Book of Abstract**, 57, Slovak Republic.
- Mc Cutcheon, A. R., Roberts, T. E., Gibbons, E., Ellis, S. M., Babiuk, L. A., Hancock, R. E. W., Towers, G. H. N., 1995. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 49: 101-110.
- Meurer-Grimes, B., Mc Beth, D. L., Hallihan, B., Delph, S., 1996. Antimicrobial activity in medicinal plants of the *Scrophulariaceae* and *Acanthaceae*. **International Journal of Pharmacognosy**, 4: 243-248.
- Meral, G. E., Konyalıoğlu, S., 2002. Üç *Hypericum* L. türünün antioksidan etkilerinin incelenmesi. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, 371-372, Eskişehir.
- Meyer, J. J. M., Afolayan, A. J., Taylor, M. B., Erasmus D., 1997. Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. **Journal of Ethnopharmacology**, 56: 165-169.
- Mouhajir, F., Hudson, J. B., Rejdali, M., Towers, G. H. N., 2001. Multiple antiviral activities of endemic medicinal plants used by Berber peoples of Morocco. **Pharmaceutical Biology**, 39: 364-374.
- Nair, R., Kalariya, T., Chanda, S., 2005. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. **Turkish Journal of Biology**, 29: 41-47.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Of Microbiology**, 31: 247-256.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **9th International Supplement**, M100-S9.
- Newman, D. J., Cragga, G. M., Snader, K. M., 1999. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep**, 17: 215-234.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. A., 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, 30: 379-384.

- Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S., Esimone, C. O., 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 78: 119-127.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (Orac) and ferric reducing antioxidant power (Frap) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 50: 3122-3128.
- Özen, T., 2003. **Bazı bitkilerin antioksidant aktivitesinin *in vitro* ve *in vivo* araştırılması**. Doktora tezi, Samsun On Dokuz Mayıs Üniversitesi, 103 s, Samsun.
- Pereira, R. S., Sumita, T. C., Furlan, M. R., Olavo, A., Jorgec, C., Ueno, M., 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Rev. Saude. Republica**, 38: 1-3.
- Rios, J. L., Recio, M. C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 80-84.
- Sağdıç, O., Aksoy, A., Özkan, G., Ekici, L., Albayrak, S., 2008. Biological activities of two endemic *Sideritis* species in Turkey. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9: 80-84.
- Schwikkard, S., van Herden, F. R., 2002. Antimalarial activity of plant metabolites **Nat. Prod. Rep.**, 19: 675-692.
- Sökmen, A., Jones, M. J., Ertürk, M., 1999. Antimicrobial activity of extracts from the cell cultures of some Turkish medicinal plants. **Phytotherapy Research**, 13: 355-357.
- Sökmen, A., 1999. Antiviral and cytotoxic activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, 5: 343-350.
- Şener, B., 2004. **Turhan Baytop Anma Kitabı**. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 81, 150 s, İstanbul.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Gebre-Mariam, T., 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 168-175.
- Tanker, M., Tanker, N., 1998. **Farmakognozi Cilt 2**. Ankara Üniv. Eczc. Fak. Yayınları No:65, 433 s, Ankara.
- Tanker, M., Tanker, N., 2003. **Farmakognozi Cilt 1**. Ankara Üniv. Eczc. Fak. Yayınları No:66, 347 s, Ankara.
- Tatlı İ. İ., Schuhly, W., Akdemir, Z. S., 2007. Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of *Verbascum pycnostachyum* Boiss. & Helder flowers **Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy**, 27: 23-32.
- Tepe, B., 2002. **Lamiaceae Familyasına ait bazı Bitki türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması**. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, 66 s, Sivas.
- Tepe, B., Dönmez, E., Ünlü, M., Candan, F., Dafera, D., Ünlü, G. V., Polissoui, M., Sökmen, A., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, 84: 519-525.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., Sökmen, A., 2004. The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L. var *bevanii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84: 1389-1396.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H. A., Sökmen, A., 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. **Food Chemistry**, 95: 200-204.

- Tiuman, S. T., Nakamura, U. T., Cortez, G. A. T., Filho, D. P. B., Diaz, M. J. A., Souza W., 2005a. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 49: 176–182.
- Tiuman, T. S., Nakamura, U. T., Dias-Filho, B. P., Cortez, G. A. D., Nakamura, V. C., 2005b. Studies on the effectiveness of *Tanacetum parthenium* against *Leishmania amazonensis*. **Acta Protozoologica**, 44: 245-251.
- Turan, K., Turan, S. Ö., Kuru, A., 1999. *Sanicula europaea* L. rizomlarından hazırlanan sulu ekstraktların anti-influenza virus aktivitesi. **Turkish Journal of Biology**, 23: 369-376.
- Türker, A. U., Camper, N. D., 2002. Biological activity of common mullein, a medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, 82: 117-125.
- Türküsay, H., Onoğur, E., 1998. Bazı bitki ekstraktlarının *in vitro* antifungal etkileri üzerine araştırmalar. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 22: 267 271.
- Uzun, E., Sariyar, G., Andersen, A., Karakoç, B., Ötük, G., Oktayoglu, E., Pırıldar, S., 2004. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. **Journal of Ethnopharmacology**, 95: 287-296.
- Uysal, İ., Çelik, S., Oldacay, M., 2005. Antimicrobial activity of *Anthemis coelopoda* and *Anthemis tinctoria* species having ethnobotanical features. **Journal of Applied Sciences**, 4: 639-642.
- Vardar-Ünlü, G., Candan, F., Sökmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, M., Dönmez, E., Tepe, B., 2003 Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (*Lamiaceae*). **J. Agric. Food Chem**, 51: 63-67.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural of Food and Chemistry**, 46: 4113-4117.
- Yeşilada, E., Hondab, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y., 1993. Traditional medicine in Turkey IV. folk medicine in the Mediterranean subdivision. **Journal of Ethnopharmacology**, 39: 31-38.

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam boyunca değerli fikirleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN'a, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamalarındaki kıymetli katkılarıyla yol gösterici olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Birgöl ÖZCAN'a, bitkinin toplanmasını sağlayan ve teşhisini gerçekleştiren Sayın Dr. Hikmet YOLCU'ya ve kimyasal analizler sırasında yol gösteren MKÜ FAM Müdürü Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Kemal SANGÜN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca her türlü desteği sağlayan sevgili aileme ve sevgili dostum Feryal ÖZKAYALAR GÜVEN'e çok teşekkür ederim.



**ÖZGEÇMİŞ**

1982 yılında Samandağ'da (Hatay) doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Antakya'da tamamladım. 1999 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım. 2003 yılında fakülte üçüncüsü ve bölüm birincisi olarak mezun oldum. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği (Biyoloji) Tezsiz Yüksek Lisans programını tamamladım. 2005 yılında ise Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2006-2007 öğretim yılı bahar döneminde Erasmus öğrenci değişim programı çerçevesinde Flensburg University of Applied Sciences (Almanya) Biyoteknoloji bölümünde bir dönem öğrenim gördüm. Halen MKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.