



***ORIGANUM VULGARE L. BİTKİSİNDEKİ
UÇUCU YAĞIN VE EKSTRAKTIN
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ***

ÜMRAN ECE CARLIK

**YÜKSEK LISANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Ramazan ERENLER
Kasım - 2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORIGANUM VULGARE L. BİTKİSİNDEKİ UÇUCU YAĞIN VE EKSTRAKTIN
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ

ÜMRAN ECE CARLIK

TOKAT
Kasım - 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (BAP, No: 2017/31)
tarafından desteklenmiştir.**

Ümran Ece Carlık tarafından hazırlanan “*Origanum vulgare* L. bitkisindeki uçucu yağın ve ekstraktın antiproliferatif etkileri” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19 KASIM 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

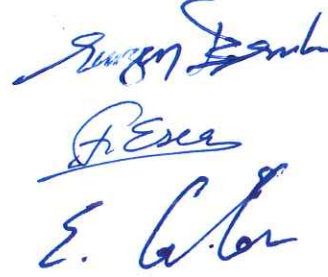
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Üye
Doç. Dr. Ferda ESER

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Ercan ÇAÇAN



ONAY


Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

22/11/2019

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ÜMRAN ECE CARLIK
19 Kasım 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ORIGANUM VULGARE* L. BİTKİSİNDEKİ UÇUCU YAĞIN VE EKSTRAKTIN ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

ÜMRAN ECE CARLIK

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN ERENLER)

Origanum türleri ilaç ve gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, *Origanum vulgare* bitkisinin toprak üstü kısmından su buharı destilasyonu ile uçucu yağı elde edildi ve GC-MS analizleri ile uçucu yağ bileşikleri belirlendi. Bu bileşikler içerisinde Cavracrol %90.4 lük bir oran ile ana bileşen olarak belirlendi. Ayrıca uçucu yağ eldesi esnasında kaynatılan bitkisel materyal süzüldü ve su uzaklaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Uçucu yağın ve ekstraktın antiproliferatif ve sitotoksik etkileri incelendi. Antiproliferatif aktivite için BrdU, sitotoksik etki için LDH yöntemi kullanıldı. A549 (İnsan akciğer kanser hücresi), Hep3B (Hepatosellüler kanser hücresi), HT29 (İnsan kolon kanser hücresi), MCF7 (İnsan meme kanser hücresi) kanser hücre hatları ve FL (İnsan amniyon hücresi) normal hücre hatları kullanıldı. Cisplatin ve 5-Florourasil (5-FU) standart olarak kullanıldı. Cisplatin ve 5-FU ya kıyasla uçucu yağın A549 (IC₅₀, 27.2 µg/mL), Hep3B (IC₅₀, 7.4 µg/mL), MCF-7 (IC₅₀, 7.1 µg/mL) kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olduğu gözlemlendi. Ayrıca ekstraktın Hep3B (IC₅₀, 27.2 µg/mL) ve MCF-7 (IC₅₀, 10.8 µg/mL) kanser hücre hatlarına karşı yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Sonuç olarak, uçucu yağın ve ekstraktın sitotoksik etkisinin standartlardan daha yüksek olduğu görüldü.

2019, 34 Sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: *Origanum vulgare*, uçucu yağ, ekstrakt, antiproliferatif aktivite.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACT FROM *ORIGANUM VULGARE*L.

ÜMRAN ECE CARLIK

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. RAMAZAN ERENLER

Origanum species have been used extensively in pharmaceutical and food industry. In this thesis, aerial parts of *Origanum vulgare* were subjected to steam distillation to yield the essential oil. The compounds of essential oil were elucidated by GC-MS analysis. Among these compounds, Carvacrol (90.4 %) was found as major product. In addition, plant material boiled during the steam distillation was filtered and water was evaporated under reduced pressure to yield the crude extract. Antiproliferative and Cytotoxic effects were investigated by BrdU and LDH techniques, respectively. A549 (human lung carcinoma), Hep3B (hepatocellular carcinoma), HT29 (human colon carcinoma), MCF7 (human breast adenocarcinoma) cancerous cell lines and FL (human amnion cells) normal cell lines were used. Cisplatin and 5-FU were used as standards. The essential oil revealed more impactful activity against A549 (IC₅₀, 27.2 µg/mL), Hep3B (IC₅₀, 7.4 µg/mL), MCF-7 (IC₅₀, 7.1 µg/mL) cancerous cell lines as compared to standards. In addition, the extract was observed to reveal outstanding activity on Hep3B (IC₅₀, 27.2 µg/mL) and MCF-7 (IC₅₀, 10.8 µg/mL) cell lines. The essential oil and extract have more cytotoxicity effect than the standards.

2019, 34 Pages

KEYWORDS: *Origanum vulgare*, essential oil, extract, antiproliferative activity.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca gerek ders aşamasında gerekse tez aşamasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, benim için her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Ramazan ERENLER'e
Antiproliferatif çalışmalarda desteğini esirgemeyen Dr. Ali Aydın'a ve Bitki Araştırma Laboratuvarında yardımlarından dolayı İlyas Yıldız'a
Bölümümüzün her türlü imkânından faydalanmamı sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü hocalarına;
Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme;
Çok teşekkür ederim.

Ümran Ece CARLIK
19 Kasım 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR ve ŞEKİLLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
1. GİRİŞ	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Bitki örnekleri	18
3.1.2. Kullanılan cihazlar	18
3.1.3 Kullanılan kimyasallar	20
3.1.4. Kullanılan sarf malzemeler	21
3.2 . Yöntem.....	22
3.2.1 . Uçucu yağ eldesi.....	22
3.2.2. GC-MS analizi.....	22
3.2.3. Ekstraksiyon yöntemi	23
3.2.4. Hücre kültürü.....	23
3.2.5. BrdU hücre ELİZA (Cell ELISA) testi	24
3.2.6. Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi	24
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	31
7. ÖZGEÇMİŞ.....	34

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μL	Mikrolitre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
ppm	Milyonda bir kısım

SİMGELER

Simgeler	Açıklama
5-FU	5-Florourasil
A549	İnsan akciğer kanser hücresi
DMSO	Dimetilsülfoksit
FL	İnsan amniyon hücresi
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
GI ₅₀	Tek seferde %50 öldüren miktar
Hep3B	Hepatosellüler kanser hücresi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HT29	İnsan kolon kanser hücresi
IC ₅₀	Maksimum inhibisyon sağlayacak konsantrasyonun yarısı
LC ₅₀	Test maddelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon
LDH	Laktat dehidrogenaz
MCF7	İnsan meme kanser hücresi
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
TGI	Hücrelerin büyümesinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Origanum majorana</i> bitkisinden izole edilen bileşikler	13
Şekil 2.2. <i>Origanum minutiflorum</i> bitkisinden izole edilen bileşikler.....	15
Şekil 2.3. <i>Origanum solymicum</i> bitkisinden izole edilen bileşikler	16
Şekil 3.1. <i>Origanum vulgare</i> bitkisi.....	18
Şekil 3.2. Su buharı destilasyonu ile uçucu yağ eldesi	22
Şekil 3.3. Uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS ile belirlenmesi.....	23
Şekil 4.1. <i>Origanum vulgare</i> bitkisinin uçucu yağ kromatogramı	27

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. <i>Origanum vulgare</i> bitkisinden elde edilen uçucu yağ bileşenleri	26
Çizelge 4.2. Ekstraktın ve uçucu yağın yaşam parametrelerine etkisi.....	29
Çizelge 4.3. Ekstraktın ve uçucu yağın yaşam parametrelerine etkisi.....	29
Çizelge 4.4. Kontrollerin IC ₅₀ değerleri.....	29
Çizelge 4. 5. Ekstraktın ve uçucu yağın % sitotoksik değerleri	29
Çizelge 4.6. Kontrollerin % sitotoksik değerleri	29

1. GİRİŞ

İnsanoğlu eski çağlardan beri bitkileri tıbbi amaçlı kullanmaktadır. Bitkilerin yaşam faaliyetlerini sürdürebilmek için ürettikleri sekonder metabolitler, doğal ürün kimyasının temelini oluşturmakta ve bu bileşikler, tıp, ilaç, gıda, kozmetik, zirai ilaç gibi alanlarda kullanılmaktadır (Newman ve ark., 2003). Bitkilerin bilimin odağı haline gelmesi 19. yüzyılda, bitkilerden etkin bileşiklerin izolasyonu ile başlamış ve doğal ürünler her geçen gün önemini korumuştur. Friedrich Serturmer'in, 1804 yılında morfini haşhaş (*Papaver somniferum*) tohumlarından izole etmesi, bitkilerden aktif bileşiklerin izolasyon çalışmalarının başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (Li ve Vederas, 2009). Bu çalışmayı, 1820 yılında kınakına kabuklarından kinin, 1868 yılında *Digitalis purpurea* bitkisinin yapraklarından digitalin ve 1890 yılında söğüt ağacı kabuklarından salisilik asidin saflaştırılması izlemiştir. Penisilin keşfinden dolayı, ikinci dünya savaşından sonra yeni antibiyotik keşfi için büyük miktarda mikroorganizmaları içerecek farmasötik çalışmalar genişletilmiştir. Antibiyotikler (penisilin, tetrasilin, eryothromsin), antiparasitler (avermestim), lipit kontrol ajanları (lovastatin, ve türevleri), organ nakli için immünosupresanlar (sikloporin, rapamysinler) ve antikanser ilaçları (taksol, doksorubisin) devrim niteliğindeki doğal kaynaklı ilaçlardır.

İlaçların keşfi ve geliştirilmesinde doğal ürünler önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde kullanılan ilaçların %80'i doğal ürün ve türevlerinden oluşmaktadır. Doğal ürünler, kanser ve enfeksiyon hastalıklarına karşı önemli bir yer tutmaktadır. Kanser ilaçlarının yaklaşık %50'si ve enfeksiyon hastalıklarının %75'i doğal ürünlerden oluşmaktadır.

Etkin bileşikler, bitkilerin toprak altı ve toprak üstü kısımlarında bulunabilir. Bitkisel ilaçlar aktif maddelerin yanında tatlandırıcı da içermektedir (Harvey, 2008). Gelişmekte olan ülkelerde insanların %80'i, sağlık sorunlarının giderilmesinde öncelikle geleneksel ilaçlardan faydalanmaktadır (Canter ve ark., 2005).

Fenolik bileşikler geniş spektrumlu biyoaktivite göstermekte ve ilaç, kozmetik, gıda sektöründe önemli yer tutmaktadır. Yüksek antioksidan ve antikanser etkiye sahip olmaları, fenolik bileşiklerin önemini her geçen gün arttırmaktadır. Bunun yanında,

sentetik ilaçların yüksek oranda yan etkiye sahip olmaları, doğal ürünlere olan ilgiyi arttırmaktadır (Sasaki ve ark., 2002).

Origanum cinsi Lamiaceae familyasına ait olup yaygın olarak Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. Origanum 14 tanesi endemik olmak üzere 23 tür ve 6 hibrit ile Türkiye Florası'nda temsil edilmektedir (Davis, 1982).Origanum türleri Türkiye'nin önemli ihracat ürünlerindedir ve Dünya marketinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu türler gıda ve parfüm endüstrisinde etkin bir şekilde kullanılan yüksek oranda uçucu yağ içermektedir.

Origanum türleri 1200-1500 m yükseklikte yetişmektedir (Oflaz ve ark., 2002). Origanum vulgaretürünün, Akdeniz bölgesinden Amerika'ya koloniler tarafından götürüldüğü düşünülmektedir (Padulosi, 1997).

Origanum Dünya mutfaklarında kullanılan bitkiler bakımından ilk sırada yer almaktadır. Yüksek oranda uçucu yağ içeren Origanum türleri, gıdaların vazgeçilmez çeşnisi konumundadır. Günümüzde Origanum, bitkisel ilaç olarak kullanılmakta ve Dünya ticaretinde yerini almaktadır. Origanum ihracatında Türkiye önemli bir yer tutmaktadır (Başer, 2001).

Uçucu yağlar; bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, tohum, kabuk, dal, odun, meyve ve köklerinden elde edilen güzel kokulu yağimsı sıvılardır. Uçucu yağların eldesinde kullanılan en yaygın metot su buharı destilasyonudur (Shelef, 1984).Yaklaşık olarak 3000 uçucu yağ bileşikleri bilinmekte ve bunlardan 300 kadarı ticari öneme sahip olup doğal ürün pazarında yerini almaktadır (Van de Braak ve Leijten, 1999). Uçucu yağların antibakteriyal (Deans ve Ritchie, 1987) etkisinin yanı sıra, antiviral (Bishop, 1995), antimikotik (Jayashree ve Subramanyam, 1999), antitoksijenik (Juglal ve ark., 2002), antiparazit (Pandey ve ark., 2000) ve insektisit (Karpouhtsis ve ark., 1998) etkilere sahiptir. Ayrıca kanser hücrelerine karşı etkileri son yıllarda dikkat çekmektedir (Soomro ve ark.; Nasrollahi ve ark., 2019; Sadeghi ve ark., 2019). Bu etki uçucu yağlarda bulunan bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Uçucu yağların damıtma ile elde edilme yöntemi, ilk olarak doğu ülkelerinde (Mısır, Hindistan ve Pers) kullanılmış ve dokuzuncu

yüzyılda Araplar tarafından geliştirilerek yaygınlaşmıştır (Bauer ve ark., 2008). 13. yüzyıla kadar uçucu yağlar eczacılar tarafından elde ediliyordu ve farmakolojik etkileri Farmakopiler’de belirtiliyordu fakat 16. asra kadar Avrupa’da bunların kullanımı ve etkileri hakkında bilgi yayılmamıştı (Carson ve Riley, 1993). Bundan sonraki zamanlarda Londra’da ticareti yapılmaya başlanmıştır (Burt, 2004). Birbirinden bağımsız olarak çalışan iki Strasburg’lu doktor, Brunschwig ve Reiff küçük farklılıkla, terebentin, ardıç ağacı, biberiye, lavanta, karanfil, hindistan cevizi, anason ve tarçın uçucu yağlarından bahsediyorlardı. Fransız doktor, Du Chesne göre, 17. yüzyılda uçucu yağların hazırlanması çok iyi biliniyordu ve eczacılar 15-20 kadar farklı uçucu yağları depolamışlardı (Guenther ve Althausen, 1948).

Avrupa Birliği’nde uçucu yağlar, gıda (baharat), parfümeri (koku, lösyon) ve ilaç endüstrisi alanında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Boyle, 1955). Uçucu yağların aromaterapide kullanım oranı yaklaşık %2 civarındadır. Uçucu yağdan elde edilen saf bileşikler gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler, uçucu yağlardan veya sentetik yollarla elde edilmektedir (Oosterhaven ve ark., 1995). Uçucu yağların antibakteriyel özelliklerinden dolayı, diş hekimliğinde kanal tedavisinde kullanılmaktadır (Manabe ve ark., 1987). Uçucu yağ içeren gıda koruyucu maddeler ticari olarak mevcuttur (Cutter, 2000).

Kanser günümüzde en ölümcül hastalıklardandır ve bu hastalıktan hayatını kaybedenlerin oranı %38 dir. Kanser hastalığına yakalananların %77’si elli beş yaş üstü insanlardır. Her yıl milyonlarca doların kansere karşı harcanması, antikanser ilaçlarının keşfini ve geliştirilmesini önemli hale getirmiştir (Dobrossy, 2002). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlar sadece kanser hücrelerini değil normal hücreleri de öldürmektedir. Bu durum, araştırmaları yan tesiri olmayan veya en az olan doğal ürünler üzerinde yoğunlaştırmıştır. Doğal ürünlerin antikanser olarak kullanımı 1947 yılında, Podophyllum peltatum bitkisinden saflaştırılan podophyllotoxin ile başlamıştır (Bohlin ve Rosen, 1996; Nicolaou ve ark., 1999).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

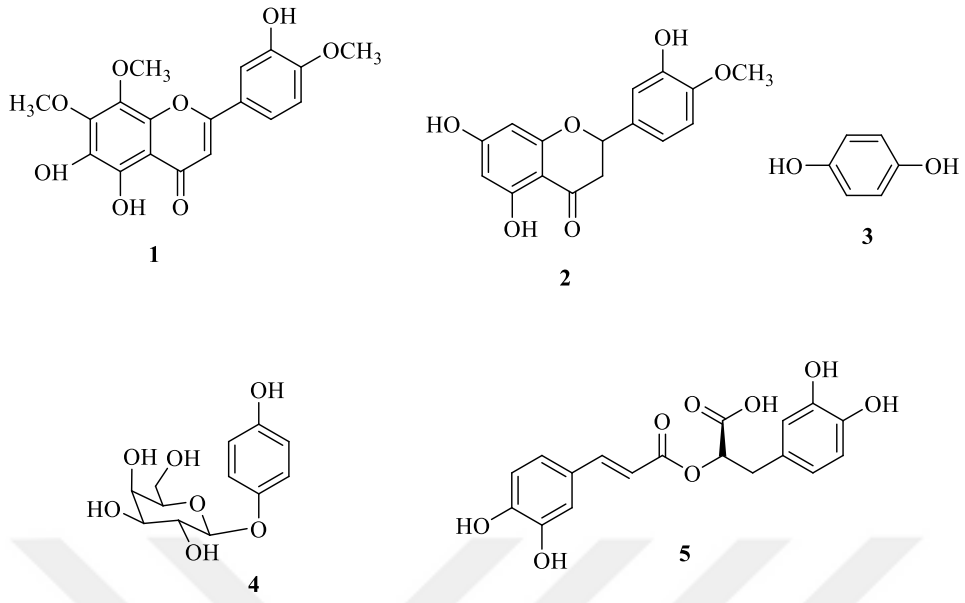
Origanum türleri gıda, kozmetik, ilaç sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve üzerinde birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Origanum vulgare bitkisinin etanol ekstraktı üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek derecede antioksidan ve antibakteriyal etki gösterdiği belirlenmiştir. İlgili ekstraktın HPLC ile kantitatif analizi sonucu, rosmarinik asit ana ürün olmak üzere protokatehrik asit, kafeik asit, kumarik asit ve kuersetin bileşikleri tespit edilmiştir (Chun ve ark., 2005).

Origanum türleri yüksek oranda uçucu yağ içermektedir. Karvakrol ve timol bileşikleri O. vulgare uçucu yağının ana bileşenlerini oluşturmaktadır (Azizi ve ark., 2012). O. vulgare'nin metanol ekstraktından izole edilen luteolin 7-O-glukuronit ve 7-O-ksiloz önemli derecede antimutagenik aktivite göstermiştir (Gulluce ve ark., 2012).

Origanum vulgare (Oregano) pizza, et, sosis, salata ve çorbalarda baharat olarak kullanılmaktadır. Tatlandırıcı etkisi, içerdiği aromatik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Son yirmi yıldır, Oregano'nun da dahil olduğu aromatik bitkilerin, gıda katkısı olarak hayvansal gıdalarda kullanımında ciddi bir artış gözlenmektedir. Bu artışın sebebi, Avrupa Birliği'nin 2006 yılından beri, yem katkı maddesi olarak büyümeyi kolaylaştıran antibiyotikleri yasaklamasından kaynaklanmaktadır. İlgili antibiyotikler, insan patojenlerinde antibiyotik direnci arttırdığı düşünülmektedir (Franz ve ark., 2010). Bunun yanında, aromatik bitkiler, antioksidan, antifungal, antimikrobiyal etkilerinden dolayı kullanım açısından daha fazla dikkat çekmektedir (Bakkali ve ark., 2008). Ayrıca, aromatik bitkilerin antioksidan etkisi gıda sektörleri tarafından ilgiyle karşılanmaktadır ve son zamanlarda gıda endüstrisinde sentetik antioksidan kullanımı yerine doğal antioksidan kullanımında ciddi bir eğilim gözlenmektedir. Gıdalarda antioksidan katkı maddesi olarak eklenen sentetik butxil hidroksi anisol (BHA) ve butil hidroksi toluen (BHT) ürünlerinin kullanımında, kanserojen şüphesinden dolayı kısıtlamalara gidilmiştir. Bunun aksine, baharatlar gıdalarda yıllardır kullanılmaktadır (Camire ve Dougherty, 1998). Ayrıca, aromatik bitkiler birçok ülkede yaygın olarak tüketildiği için, gıda sektöründe kullanımında yasal bir kısıtlama söz konusu değildir. Lamiaceae familyası türleri arasında oregano (Origanum vulgare) en yüksek antioksidan etkiye sahip

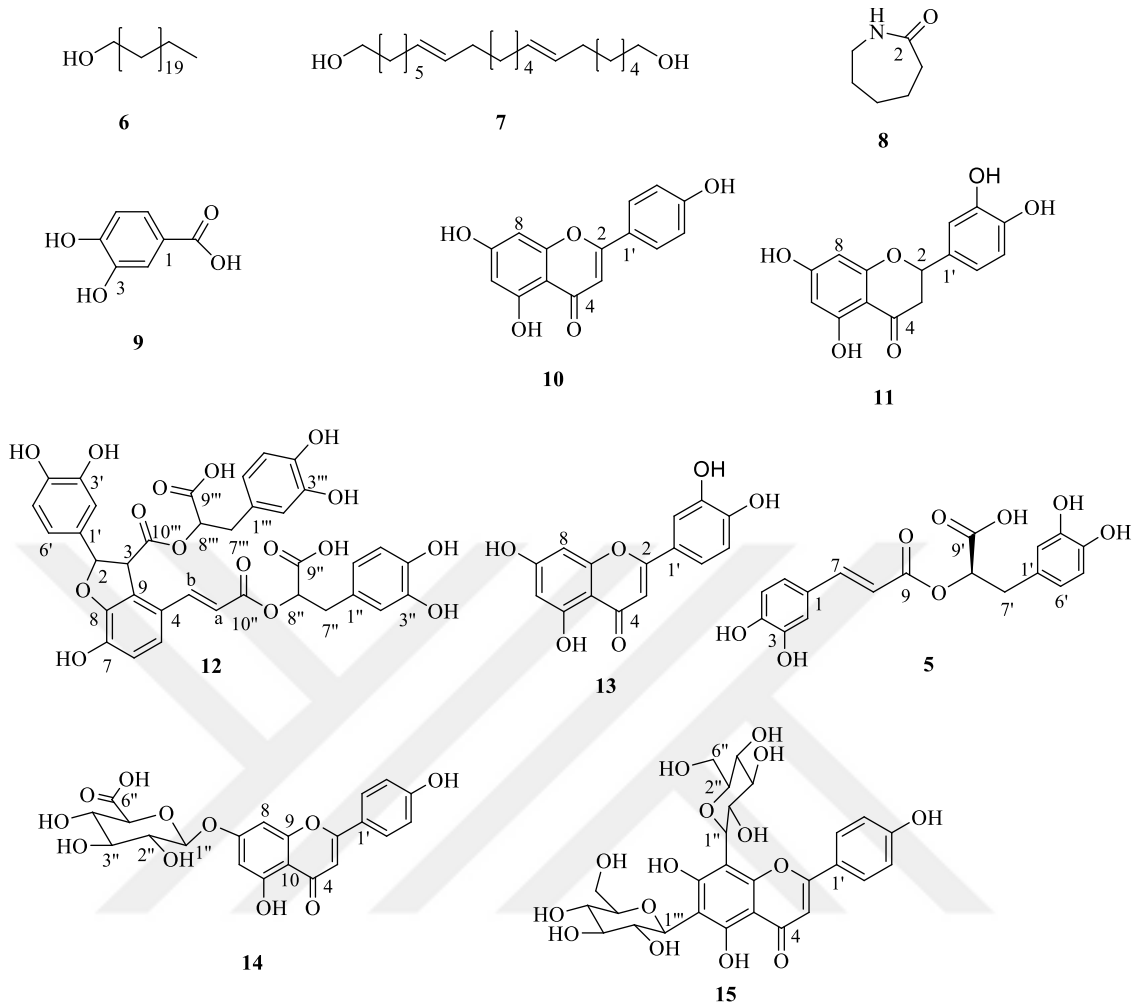
türlerdendir. Bu durum, doğal antioksidan için oregano bitkisini öne çıkarmaktadır. Toplam fenolik içerik olarak, 1 gram kuru oregano da 12 mg gallik asite eşdeğer fenolik bileşik bulunmaktadır (Zheng ve Wang, 2001).

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bitki Araştırma Laboratuvarı'nda *Origanum* türleri üzerinde bir dizi çalışma gerçekleştirilmiştir. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Aromatik ve Tıbbi Bitkiler Bahçesi'nde kültürü yapılan *Origanum majorana* toplanarak kurutulmuştur. Suda kaynatılan bitkisel materyal sırasıyla hekzan ve etil asetat ile ekstrakte edilmiş, etil asetat ekstraktı kromatografik işlemlere tabi tutularak saf bileşikler izole edilmiştir. İzole edilen bileşikler: 5,6-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-7,8-dimetoksi-4H-kromen-4-one (1), hesperetin (2), hidrokinon (3), arbutin (4), rosmarinik asid (5) olarak belirlenmiştir (Şekil 2.1). İzole edilen bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Bunun için başlıca 1D-NMR, 2D-NMR, LC-TOF/MS yöntemleri kullanılmıştır. İzole edilen bileşiklerin antioksidan etkileri araştırılmıştır. Bunun için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sülfonik asit) (ABTS) ve indirgenme gücü yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca toplam fenolik içerikleri gallik asit eşdeğerine göre belirlenmiştir. İzole edilen bileşiklerin HeLa (İnsan rahim kanser hücresi) ve C6 (Sıçan beyin kanser hücresi) kanser hücre hatlarına karşı aktivitesi incelenmiş, bunun için xCELLigence yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen bileşiklerin kuvvetli antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, hesperidin ve hidrokinon bileşiklerinin C6 ve HeLa kanser hücre hatlarına karşı oldukça etkili olduğu ortaya konulmuştur (Erenler ve ark., 2016).



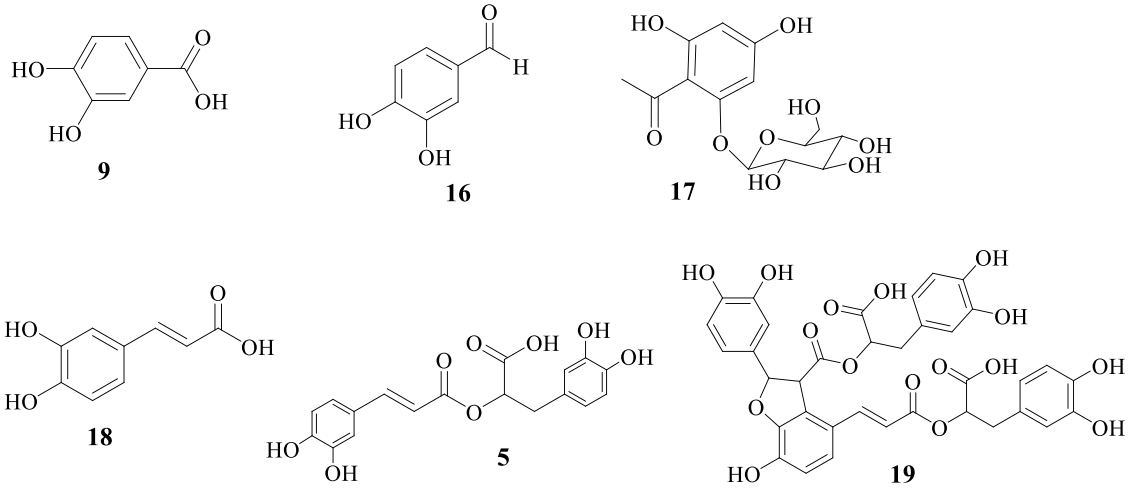
Şekil 2.1. *Origanum majorana* bitkisinden izole edilen bileşikler

Origanum minutiflorum üzerinde yapılan bir çalışmada antioksidan bileşikler izole edilmiştir (Şekil 2.2). Bunun için, *O. minutiflorum* suda kaynatılmış, soğutulup süzöldükten sonra su fazı sırasıyla, hekzan, etil asetat ve *n*-butan ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ektraktların toplam fenolik içerikleri belirlenmiştir. En yüksek fenolik bileşik *n*-butanol ekstraktında gözlenmiş ve ilgili ekstrakt kromatografik işlemlere tabi tutularak, Tricosan-1-ol (6), (8E,16E)-tetracos-8,16-dien-1,24-diol (7), azepan-2-one (8), 3,4-dihidroksibenzoik asit (9), apigenin (10), eriodiktyol (11), globoidnan-A (12), luteolin (13), rosmarinic acid (5), apigenin-7-*O*-glukoronid (14), vicenin-2 (15) bileşiklerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir(Şekil 2). Yapılan antioksidan çalışmasında, dihidroksibenzoik asit (9) çok yüksek DPPH radikal giderme aktivitesi gösterirken globoidnan-A (12), luteolin (13), rosmarinic acid (5), apigenin-7-*O*-glukoronid (14) yüksek derece aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Elmastas ve ark., 2018).



Şekil 2.2. *Origanum minutiflorum* bitkisinden izole edilen bileşikler

Origanum türlerinde diğer bir çalışmada, *O. solymicum* üzerinde yapılmıştır. *Origanum solymicum* gölgede kurutulduktan sonra suda kaynatılmış ve soğutularak katı kısım süzülmüştür. Sıvı kısım etil asetat ve *n*-butan ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat ekstraktı en yüksek aktivite gösterdiği ve en fazla fenolik bileşik içerdiğinden izolasyon çalışması etil asetat ekstraktından gerçekleştirilmiştir. Yapılan kromatografik (silika gel kolon kromatografisi ve preparatif HPLC) çalışmalar sonucu, 3,4-dihidroksi benzoik asit (protokateşik asit) (9), 3,4-dihidroksi benzaldehit (protokateurik aldehit) (16), 2-*O*- β -D-glikopiranozil-4,6-dihidroksiasetofenon (myriciafenon) (17), kafeik asit (18), rosmarinik asit (5), lithospermikasit B (19) bileşikleri saflaştırılmıştır (Erenler ve ark., 2017) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *Origanum solymicum* bitkisinden izole edilen bileşikler

Yine yapılan bir çalışmada, *O. rotundifolium* bitkisinden apigenin (10), ferulik asit (20), veteksin (21), kaprolaktam (22), rosmarinik asit (5) ve globoidnan A (12) bileşikleri izole edilmiştir. Globoidnan A (12), viteksin (20), rosmarinik asit (5), ferulik asit (21) etkili bir antioksidan aktivite gösterirken, viteksin (20) HeLa, HT29 ve C6 kanser hücrelerine karşı oldukça yüksek antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Erenler ve ark., 2017).

Origanum türlerinin uçucu yağ çalışmaları dikkat çekmektedir. Erzurum, Oltu'dan toplanan *O. vulgare* bitkisinin uçucu yağında karyofilen ve spatulenol ana bileşik olarak belirlenmiş ve uçucu yağın önemli derecede antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şahin ve ark., 2004). *Origanum vulgare* yapraklarından elde edilen uçucu yağın ana bileşeni karvakrol (%78.5) olarak belirlenmiştir. Uçucu yağın, süt ineklerinde fermantasyon, üretim ve süt yağ asidi bileşenler üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Hristov ve ark., 2013).

Diğer bir çalışmada Mendoza, Arjantin'den toplanan *vulgare* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri belirlenmiş ve uçucu yağın antioksidan ve antilipaz etkileri ortaya konulmuştur. Uçucu yağın, ana ürün olarak, γ -terpinen, (%32), α -terpinen (%15), ρ -cimen (%8) ve timol (%8) içerdiği ve kuvvetli anti-lipaz aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Quiroga ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada *vulgare* subsp. *hirtum* türünün uçucu yağının antifungal etki gösterdiği belirlenmiş ve ana ürün olarak timol (%45) ve kavarkrol (%33) içerdiği ortaya konulmuştur (Adam ve ark., 1998).

Vulgare uçucu yağı ile laktik asidin karıştırılması, *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı sinerjik etkiden dolayı aktivitenin yükseldiği saptanmıştır (Barros ve ark., 2012). Bu çalışmada, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Aromatik ve Tıbbi Bitkiler Bahçesi'nden temin edilen *vulgare* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri belirlendi. Ayrıca ekstrakt ve uçucu yağın antiproliferatif etkileri ortaya kondu.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki örnekleri

Origanum vulgare bitkisi Prof. Dr. İsa TELCİ gözetiminde Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bahçesi'nden toplandı (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. *Origanum vulgare* bitkisi

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Otomatik Pipetler.....	Rainin
UV-VIS Spektroskopisi.....	Shimadzu/ Jasco V650
GC-MS.....	Thermo Scientific
Clevenger-tipi Alet.....	İldam Tic. San. A.Ş.
Döner Buharlaştırıcı.....	Heidolph
Ultrasonik Banyo.....	Wise Clean WUC-D06H
Vorteks.....	IKA MS3 Basic
Isıtmalı Su Banyosu.....	Wise Clean
Manyetik Karıştırıcı.....	IKA
Laminar Kabin.....	Esco Sınıf II Tip A2
Faz-kontrast Mikroskop.....	Leica DMIL

Iřık Mikroskop.....	Olympus CX21
İnkübatör.....	Nuaire AutoFlow NU-4750
Karıştırıcı İnkübatör.....	Heidolph Unimax 1010
Hassas Terazı.....	Denver Instrument TB 224A
Terazi.....	AccuLab VIC212
Vorteks Tüp Çalkalayıcı.....	IKA Genius 3
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı.....	IKA RH Basic 2
Santrifüj.....	Hettich Mikro200R
Santrifüj.....	Hettich EBA21
pH Metre.....	Hanna HI 2211
Thoma Lamı.....	Tiefe Depth
Vakum Pompası.....	Divac 2.2L
Mikroplate Okuma.....	Rayto RT-2100C
Elisa Plate Yıkama.....	Cenix Exaro
Otoklav.....	Hirayama HMC HV-110L
Derin Dondurucu (-80).....	New Brunswick Scientific U-410
Derin Dondurucu (-20).....	VESTEL GTP 455A
Soğutucu (+4).....	UĞUR USS 440 DKTL
Buz Makinesi.....	Scotsman AF 80
Sıvı Azot Tankı.....	Locator 4 Thermolyne Dewars
Saf Su.....	MES MP MiniPure
Saf Su.....	Labconco WaterPro PS
Ultra Saf Su.....	Milipore Direct-Q 3 UV

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

TritonX-100.....	Amresco
HCl.....	Carlo-Erba
NaHCO ₃	Merck
Tripan Blue.....	Fluka
Agaroz.....	Lonza
Sitrik Asit.....	Botafarma
Absolüt Alkol.....	Merck
Tris.....	Roche
Borik Asit.....	Sigma
EDTA.....	Amresco
Loading Dye.....	Fermantes
Etidyum Bromür.....	Sigma
DPBS.....	Sigma
5-Fluorourasil (5-FU).....	Sigma
Cisplatin	Sigma
DMSO.....	Sigma
Ultra Saf DMSO.....	Sigma
Hücre Kültür Media (DMEM).....	Sigma
Penicilin-Streptomycin.....	Sigma
Fetal Bovine Serum (FBS).....	Roche
Tripsin-EDTA.....	
Cytotoxicity Detection Kit (LDH).....	

3.1.4. Kullanılan sarf malzemeler

T150 Flask.....	Corning Costar
T75 Flask.....	Corning Costar
T25 Flask.....	Corning Costar
Vidalı Kapaklı Santrifüj Tüpü (15 mL).....	Corning Costar
Vidalı Kapaklı Santrifüj Tüpü (50 mL).....	Corning Costar
Hücre Kültür Plate (96, 24 ve 6 kuyulu).....	Corning Costar
Parafilm.....	Pechiney
Plastik Pipet (10 mL).....	Corning costar
Plastik Pipet (25 mL).....	Corning costar
Pipet (2-10 µL).....	Axygen
Pipet (1-200 µL).....	Axygen
Pipet (100-1000 µL).....	Axygen
Çok Kanallı Pipet (1-200 µL).....	Brand, Eppendorf
Otomatik Pipet (100-1000 µL).....	Brand, Eppendorf
Pipet Tabancası.....	Brand, Eppendorf
Pipet Ucu (1-200 µL).....	Corning costar
Pipet Ucu (100-1000 µL).....	Corning costar
Pipet Ucu (2-10 µL).....	Corning costar
Dispensır.....	Eppendorf
Filtre (0.22 mikron).....	Stericup
Şırınga Filtre.....	Sartorius Stedim
Pastör Pipet.....	LP Italiana
Eppendorf Tüpü (2 mL).....	Isolab
Cam Şişe (250 mL, 500 mL, 1 L).....	Isolab

3.2. Yöntem

3.2.1. Uçucu yağ eldesi

2 lt lik balona 190 gram öğütülmüş *Origanum vulgare* konuldu, 1 L su ilave edildi ve 6 saat Clevenger aletinde su buharı destilasyonu yapıldı. 1.66 gram uçucu yağ elde edildi (%0.87) vebu işlem üç kez tekrarlanarak toplam 5.0 gram uçucu yağ elde edildi (Şekil 3.2). Uçucu yağ, analiz yapılana kadar +4 °C’de buzdolabında saklandı.



Şekil 3.2. Su buharı destilasyonu ile uçucu yağ eldesi

3.2.2. GC-MS analizi

20 mg uçucu yağ 1.2 mL asetonda çözüldü. Analizler Perkin Elmer Clarus500 GC-MS cihazında gerçekleştirildi ve BPX5 (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film) kolon kullanıldı (Şekil 3.3). Enjeksiyon hacmi 2.0 µL ve enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Taşıyıcı gaz akış hızı 1 ml/dk, dağıtma oranı 50:1 olacak şekilde He kullanıldı. Fırın programı 50 °C ile başlatıldı, dakikada 5 °C artırılarak 100 °C kadar ısıtıldı ve 2 dakika bu sıcaklıkta bekletildi. Ardından sıcaklık dakikada 3 °C artırılarak 220 °C yükseltildi ve bu sıcaklıkta 2 dakika bekletildi. Toplam program zamanı 30 dakikaya ayarlandı. İyonlaşma enerjisi 70 eV ve iyon kaynak sıcaklığı 250 °C’ye ayarlandı. Bileşiklerin aydınlatılması, alıkonma zamanına göre, kütüphane ile kıyaslanarak belirlendi (NIST, Wiley, and Pflieger).



Şekil 3.3. Uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS ile belirlenmesi

3.2.3. Ekstraksiyon yöntemi

Origanum vulgare su buharı destilasyonuna tabi tutuldu ve uçucu yağ elde edildi. İçerisinde *vulgare* ve su olan balon soğutulduktan sonra, bitkisel materyal süzülerek atıldı ve su kısmı döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Analiz için buzdolabında bekletildi (+4 °C).

3.2.4. Hücre kültürü

Hücreler steril ortamda ve laminar kabinde hazırlandı. Hücreler sıvı azot tankında muhafaza edildi. Hücreler, benmaride 2 dakika 37°C sıcaklıktaki bekletildi ve %2 (v/v) PenStrep (Penisilin-Streptomisin), %10 (v/v) FBS (Fetal Bovine Serum) ve NaHCO₃ ilave edilen DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, High Glucose (4.5 g/L)) besi yeri içeren steril T75'lik hücre kültür flasklarında 37 °C %5 CO₂ ortamında 4 gün inkübasyona tabi tutuldu. Kofluent şeklindeki hücreler, flakslardaki besi yeri atıldı ve hücreler 10 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) ile yıkandı ve sonra DPBS döküldü. Zemindeki hücreler Tripsin-EDTA solüsyonu (6 mL %0.25) ile çözüldü. Flaske 6 mL %0.25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek zemindeki hücrelerin çözünmesi sağlandı ve flask çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanarak, hücre süspansiyonu falkon tüplere (50 mL) aktarıldı. Falkon tüplere 10 mL katkılı taze besi yeri ilave edilerek tripsin nötralize edildi ve 5 dakika 1500 × g'de santifüj edildi. Süpernatant kısmı aspire edildi ve hücre pelleti üzerinde 4 mL taze besiyeri ilave edilerek pastör pipet ile hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon hücreleri eksponansiyel log

fazında olması için üçergün arayla dört hücre ekimi daha gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonundan alınan 20 µL hücre ile 20 µL %0.4 (wt/vol) tripan mavisi solüsyonu karıştırılarak hücre konsantrasyonu belirlendi. Bu karışımdan alınan 20 µL Thoma lamına pipetlenerek mikroskop altında birinci sayım alanından 5 kere, ikinci sayım alanından 5 kere olmak üzere toplam 10 kez sayım yapıldı [1 mL hücre süspansiyonu içindeki hücre sayısı = 10 karede sayılan toplam hücre sayısı / 10 x 2 (Tripan mavisi seyreltme faktörü) × 16 (bir sayım alanındaki toplam kare sayısı) x 10 000 (katsayı)].

3.2.5. BrdU hücre ELİZA (Cell ELISA) testi

Bu çalışmada *Origanum vulgare* uçucu yağının ve su ekstraktının etkileri BrdU ELIZA testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerler IC₅₀ olarak hesaplandı. ELIZA BrdU testi DNA çoğalmasına duyarlı olup, hücre çoğalması hakkında bilgi veren bir testtir.

Herbir kuyucuğa 5000 hücre pipetlendi. Tabakalara yüklenen hücrelerin üzerinde ekstrakt, uçucu yağ ve pozitif kontrol eklendi ve kuyunun son hacmi 200 µL olacak şekilde besiyeri eklendi ve 24 saat inkübe edildi. Herbir kuyuya 20 µL BrdU eklenerek 4 saat tabakalar inkübe edildi. Daha sonra tabaka ters çevirilerek döküldü ve üzerine fix denat (100 µL) eklendi. Tabaka oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildikten sonra ters döndürülerek döküldü ve kurulandı. Herbir kuyuya Anti-BrdU-POD solüsyonu (50 µL) eklendi ve tabaka 2 saat inkübe edildi. Kuyular buffer (200 µL) ile yıkandı, döküldü, kurutuldu ve yıkama üç kez tekrarlandı. Yıkamadan sonra substrat solüsyonundan herbir kuyuya 50 µL eklendi ve inkübe edildi (45 dak). Herbir kuyuya H₂SO₄ (1.0 M, 25 µL) eklendi, Elisa Reader cihazında (450-650 nm) absorbans ölçümü yapıldı ve % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.6. Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksisite testi

Uçucu yağ ve ekstraktın hücre sitotoksik aktiviteleri LDH yöntemi ile belirlenmiştir. Test maddelerine bağlı olarak inkübasyon süresinde ölen hücre miktarındaki artış, kültür supernatanında LDH artışıyla sonuçlanacaktır. Bu deneylerin esasını, hücre hasarı sonucu ortama salınan sitoplazmik enzimlerin ölçümü teşkil etmektedir. LDH kararlı, sitoplazmik bir enzim olup birçok hücrede bulunur.

Kültüre edilen hücreler plakadaki kuyucuğa 5000 hücre olacak şekilde pipetlendi. Tabakaya yüklenen hücrelerin üzerinde DMSO da çözülmüş test maddeleri, yüksek kontrol için %2 Triton X-100 (LDH salınımına etkisi %100 kabul edilecek), düşük kontrol için test maddesi içermeyen hücre hattı, besi yeri, kontrol için sadece besiyeri içeren kuyu ve pozitif kontrol olarak 5-FU eklenerek kuyuların son hacmi besi yeri ile 200 µL'ye tamamlandı ve 24 saat inkübe edildi. Hücre içermeyen 100 µL kültür süpernatanı herbir kuyucuktan alınarak başka bir mikrotabakaya aktarıldı. Üzerine kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından 100 µL/kuyu olacak şekilde eklenerek yarım saat karanlıkta inkübe edildi. 1 N HCl eklenerek 50 µL/kuyu olarak ayarlandı. Spektrofotometre de absorbans (492-630 nm) ölçülerek % sitotoksosite hesaplandı.

4. BULGULAR

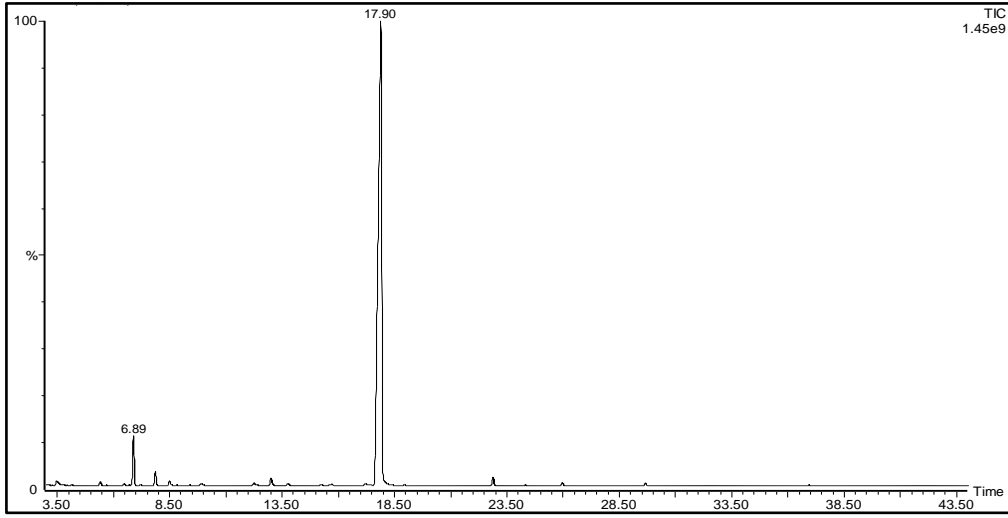
Origanum vulgare bitkisinin toprak üstü kısmı su buharı destilasyonuna tabi tutularak uçucu yağ elde edildi. Uçucu yağ bileşenleri GC-MS ile belirlendi (Çizelge 4.1). Uçucu yağdaki ana bileşenler carvacrol (%90.4) ve *p*-cymene (%4.2) monoterpenerlerdir.

Çizelge 4.1. *Origanum vulgare* bitkisinden elde edilen uçucu yağ bileşenleri

Bileşikler	RT	RI*	%
Tyranton	3.465	846	0.58
Myrcene	5.489	981	0.35
α-Terpinene	6.547	1021	0.17
<i>p</i>-Cymene	6.972	1027	4.21
γ-Terpinene	7.948	1063	1.19
Trans-sabinenehydrate	8.55	1085	0.40
Cis-sabinenehydrate	9.911	1091	0.28
4-Terpineol	13.068	1179	0.74
α-Terpineol	13.812	1208	0.14
Thymol	17.273	1290	0.22
Carvacrol	18.113	1301	90.42
β-Caryophyllene	22.94	1417	0.83
β-Bisabolene	26.011	1510	0.21
Caryophyllene oxide	29.679	1581	0.26
Toplam %			99.98

*Alikonma indeksi (RI) *n*-alkanlara göre, % oranları FID verilerine göre hesaplandı.

GC-MS cihazından elde edilen kromatogramdan (Şekil 4.1) uçucu yağ bileşikleri belirlendi. Bileşikler cihazın kütüphanesindeki bileşiklerin kütleleriyle kıyaslanarak belirlendi.



Şekil 4.1. *Origanum vulgare* bitkisinin uçucu yağ kromatogramı

Uçucu yağın eldesi esnasında kaynatılan *vulgare* bitkisi, süzüldü ve su kısmı dönerli buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Uçucu yağ ve ham ekstraktın antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Bunun için A549 (İnsan akciğer kanser hücresi), Hep3B (Hepatosellüler kanser hücresi), HT29 (İnsan kolon kanser hücresi), MCF7 (İnsan meme kanser hücresi) kanser hücre hatları ve FL (İnsan amniyon hücresi) normal hücre hatları kullanıldı (Çizelge 4.2). Cisplatin ve 5-Florourasil (5-FU) standart olarak kullanıldı. Uçucu yağın A549 (İnsan akciğer kanser hücresi) hücrelerine karşı oldukça etkili olduğu görüldü. Uçucu yağın IC₅₀ değeri 27.2 iken bu değer cisplatin için 40.4 µg/mL ve 5-FU için 65.2 µg/mL olarak belirlendi. Uçucu yağın Hep3B (Hepatosellüler kanser hücresi) kanser hücresine karşı önemli etkiye sahip olduğu görülmektedir (IC₅₀, 7.4, µg/mL). Bu değer cisplatin ve 5-FU için sırasıyla 48.7 µg/mL ve 62.9 µg/mL olarak kaydedildi. Uçucu yağın HT29 hücresine karşı kayda değer bir etki göstermediği ancak, MCF7 hücresine karşı oldukça etkili olduğu belirlendi. MCF7 kanser hücresine karşı uçucu yağın IC₅₀ değeri 7.1 µg/mL iken cisplatin ve 5-FU'in IC₅₀ değeri sırasıyla 63.8 µg/mL ve 74.2 µg/mL olarak belirlendi. Uçucu yağın FL (İnsan amniyon hücresi) normal hücreye karşı antiproliferatif etkiye sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3). Normal hücrelere karşı antiproliferatif etkisinin olmaması veya düşük olması yeğlenir. Ekstraktın etkisine bakıldığında, oldukça etkili olduğu görülmektedir. Ekstrakt A549 hücresine karşı kayda değer bir etki göstermezken, Hep3B kanser hücresine karşı etki gösterdiği gözlenmiştir (IC₅₀, 27.2 µg/mL) (Çizelge 4.4). Ayrıca MCF7 hücre hatlarına karşı etkili

olduğu belirlendi (IC₅₀, 10.8 µg/mL).Uçucu yağın ve ekstraktın sitotoksik etkilerine bakıldığında, uçucu yağın A549 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etki %22.8 iken bu değer cisplatin için %8.6 ve 5-FU için %9.2'dir (Çizelge 4.5). Bu değer uçucu yağın A549 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkinin standartlara göre yüksek olduğunu göstermektedir. Uçucu yağın Hep3B kanser hücresine karşı sitotoksik etki %18.5 olarak kaydedilirken, cisplatin ve 5-FU için sırasıyla bu değer %8.5 ve %9.7 olarak kaydedilmiştir. Bu da ilgili kanser hücresine karşı sitotoksitesinin standartlara göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ekstraktın A549 kanser hücresine karşı %25.3 sitotoksik etkiye sahipken bu değer cisplatin için %8.6, 5-FU için %9.2 dir. Ekstraktın A549 kanser hücresine karşı sitotoksitesinin standartlardan daha düşük olduğu görülmektedir. Ekstraktın Hep3B kanser hücresine karşı etkisi (%19.4) standartlardan (cisplatin: %8.5, 5FU: %9.7) daha düşüktür. Fakat ekstraktın kanser hücresine karşı antiproliferatif etkisinin oluşu görülmektedir. MCF7 kanser hücresine karşı ekstraktın %16.8 değerinde bir etkiye sahip olduğu gözlenirken, bu etki cisplatin için 10.7 ve 5-FU için 7.7 olarak kaydedildi. Ayrıca ekstraktın HT29 kanser hücresine karşı %18.0'lık bir etki göstermiştir. FL normal hücreye karşı sitotoksik etkisinin standartlardan daha düşük olduğu gözlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.2. Ekstraktın ve uçucu yağın yaşam parametrelerine etkisi

Maddeler (µg/mL)	A549				Hep3B				HT29			
	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
Uçucu yağ (EO)	4.67	20.04	341.08	27.16	2.60	7.44	66.81	7.36	1.61	>1000	>1000	>1000
Ekstract (Ext)	9.51	538.57	>1000	>1000	3.72	27.88	>1000	27.20	1.92	>1000	>1000	>1000

Çizelge 4.3. Ekstraktın ve uçucu yağın yaşam parametrelerine etkisi

Maddeler (µg/mL)	MCF7				FL			
	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	IC ₅₀
EO	2.34	7.24	100.16	7.07	1.53	3.14	21.36	3.11
Ext	2.15	11.24	>1000	10.76	3.12	15.60	753.03	15.35

Çizelge 4.4. Kontrollerin IC₅₀ değerleri

Kontroller µg/mL)	Hep3B	HT29	A549	MCF7	FL
Cisplatin	48.69	40.39	60.49	63.79	52.79
5FU	62.89	65.19	69.79	74.19	59.09

Çizelge 4. 5. Ekstraktın ve uçucu yağın % sitotoksik değerleri

Maddeler	A549	Hep3B	MCF7	HT29	FL
EO	22.86	18.48	19.63	20.32	17.47
Ext	25.26	19.41	16.83	18.04	16.65

Çizelge 4.6. Kontrollerin % sitotoksik değerleri

Kontroller	FL	HT29	A549	MCF7	Hep3B
Cisplatin	8.33	11.23	8.63	10.71	8.46
5FU	8.44	7.91	9.19	7.69	9.67

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Origanum cinsi, farmasötik ve gıda sektöründe geniş bir kullanım alanına sahiptir. Dünyada doğal yetişmesinin yanında etkin olarak kültürü yapılmaktadır. *Origanum vulgare* bitkisinin toprak üstü kısmı su buharı destilasyonuna tabi tutularak uçucu yağ elde edildi. GC- MS ile de uçucuyağ bileşikleri belirlendi. Uçucu yağın gösterdiği etki, ana ürün olan carvacrol (%90.4) bileşiğinden kaynaklandığı söylenebilir. Cavaracrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) cymene bileşiğinin türevi bir monoterpendir. Bakterilere karşı gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır(Lofa ve ark., 2019). Ayrıca su buharı desitlasyonuna tabi tutulan bitkiler, süzöldü ve su kısmı döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ham ekstrakt elde edildi. Ekstrakt ve uçucu yağın antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Uçucu yağın kanser hücrelerine karşı etkisi incelendiğinde sitotoksiteden çok antiproliferatif etkisinin olduğu gözlendi. Uçucu yağın HT29 hariç bütün kanser hücrelerine karşı standartlardan daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği gözlendi. Fakat sitotoksik etkinin aynı paralelde olmadığı göröldü. Uçucu yağın sitotoksik etkisinin standartlardan daha düşük olduğu gözlendi. Buradan, uçucu yağın antiproliferatif etkisinin sitotoksik etkiden daha baskın olduğu söylenebilir.

Ekstraktın antiproliferatif etkisinin oldukça yüksek olduğu gözlendi. Ekstraktın A549, HT29 kanser hücrelerine karşı etkinliği gözlenmezken diğer kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olduğu belirlendi. Antiproliferatif etkisinin standartlardan daha yüksek olduğu belirlendi.

Ekstraktın kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi standartlardan düşük iken antiproliferatif etkisinin standartlardan yüksek olduğu gözlendi. Ekstraktın etkisi içerdii biyoaktif bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı etkili bileşiklerin izole edilmesi, yapılarının belirlenmesi ve aktivitelerinin araştırılması önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis, 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1739-1745.
- Azizi, A., J. Hadian, M. Gholami, W. Friedt and B. Honermeier, 2012. Correlations between genetic, morphological, and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. *Chemistry & biodiversity*, 9(12), 2784-2801.
- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck and M. Idaomar, 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barros, J. C. d., M. L. d. Conceição, N. J. Gomes Neto, A. C. V. d. Costa, E. L. d. Souza, 2012. Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit *Staphylococcus aureus* in meat broth and meat model. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1120-1127.
- Başer, K., 2001. Her derde deva bir bitki Kekik. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 402 (26), 74-77.
- Bauer, K., D. Garbe, H. Surburg 2008. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses* John Wiley & Sons.
- Bishop, C. D., 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (maiden amp; Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7(6), 641-644.
- Bohlin, L., B. Rosen, 1996. Podophyllotoxin derivatives: Drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 1(8), 343-351.
- Boyle, W., 1955. Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 66(1), 25-28.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Camire, M. E., M. P. Dougherty, 1998. Added phenolic compounds enhance lipid stability in extruded corn. *Journal of Food Science*, 63(3), 516-518.
- Canter, P. H., H. Thomas, E. Ernst, 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
- Carson, C., T. Riley, 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16(2), 49-55.
- Chun, S.-S., D. A. Vattem, Y.-T. Lin and K. Shetty, 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40(2), 809-816.
- Cutter, C. N., 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601-607.
- Davis, P. H. 1982. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh, 300-307, University Press.
- Deans, S., G. Ritchie, 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, 5(2), 165-180.

- Dobrossy, L., 2002. Cancer mortality in central-eastern Europe: facts behind the figures. *Lancet Oncology*, 3(6), 374-381.
- Elmastas, M., S. M. Celik, N. Genc, H. Aksit, R. Erenler and İ. Gulcin, 2018. Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea—*Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 374-384.
- Erenler, R., T. Adak, T. Karan, M. Elmastas, I. Yildiz, H. Aksit, G. Topcu and M. A. Sanda, 2017. Chemical constituents isolated from *Origanum solymicum* with antioxidant activities. *The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics*, 1 139-145.
- Erenler, R., B. Meral, O. Sen, M. Elmastas, A. Aydin, O. Eminagaoglu and G. Topcu, 2017. Bioassay-guided isolation, identification of compounds from *Origanum rotundifolium* and investigation of their antiproliferative and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1646-1653.
- Erenler, R., O. Sen, H. Aksit, I. Demirtas, A. S. Yaglioglu, M. Elmastas and İ. Telci, 2016. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 822-836.
- Franz, C., K. Baser, W. Windisch, 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 327-340.
- Guenther, E., D. Althausen 1948. *The essential oils* Van Nostrand New York.
- Gulluce, M., M. Karadayi, Z. Guvenalp, H. Ozbek, T. Arasoglu and O. Baris, 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food chemistry*, 130(2), 248-253.
- Harvey, A. L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19-20), 894-901.
- Hristov, A. N., C. Lee, T. Cassidy, K. Heyler, J. Tekippe, G. Varga, B. Corl and R. Brandt, 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1189-1202.
- Jayashree, T., C. Subramanyam, 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*, 28(3), 179-183.
- Juglal, S., R. Govinden, B. Odhav, 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. *Journal of food protection*, 65(4), 683-687.
- Karpouhtsis, I., E. Pardali, E. Feggou, S. Kokkini, Z. G. Scouras and P. Mavragani-Tsipidou, 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1111-1115.
- Li, J. W.-H., J. C. Vederas, 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 325(5937), 161-165.
- Lofa, A., V. Velasco, M. Gerding, M. D. Lopez, D. Vallejos, A. M. Bonilla and C. M. Logue, 2019. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) extract. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4), 9.
- Manabe, A., S. Nakayama, K. Sakamoto, 1987. Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalmitoyl phosphatidylcholine-liposomes. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 44(1), 77-84.

- Nasrollahi, S., S. M. Ghoreishi, A. H. Ebrahimabadi and A. Khoobi, 2019. Gas chromatography-mass spectrometry analysis and antimicrobial, antioxidant and anti-cancer activities of essential oils and extracts of *Stachys schtschegleevii* plant as biological macromolecules. *International journal of biological macromolecules*, 128 718-723.
- Newman, D. J., G. M. Cragg, K. M. Snader, 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037.
- Nicolaou, K. C., D. Hepworth, N. P. King and M. R. V. Finlay, 1999. Chemistry, biology and medicine of selected tubulin polymerizing agents. *Pure and Applied Chemistry*, 71(6), 989-997.
- Oflaz, S., M. Kürkçüoğlu, K. Başer (2002). *Origanum onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler. 29–31 Mayıs 2002, Eskişehir, ISBN 975–94077–2–8.
- Oosterhaven, K., B. Poolman, E. Smid, 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops & Products*, 1(4), 23-31.
- Padulosi, S. 1997. *Oregano*: Proceedings of the IPGRI International Workshop on *Oregano*, 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano (Bari), ItalyBioversity International.
- Pandey, R., A. Kalra, S. Tandon, N. Mehrotra, H. Singh and S. Kumar, 2000. Essential oils as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8), 501-502.
- Quiroga, P. R., N. R. Grosso, A. Lante, G. Lomolino, J. A. Zygadlo and V. Nepote, 2013. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(3), 642-649.
- Sadeghi, S., A. Davoodvandi, M. H. Pourhanifeh, N. Sharifi, R. ArefNezhad, R. Sahebnaasagh, S. A. Moghadam, A. Sahebkar and H. Mirzaei, 2019. Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European journal of medicinal chemistry*.
- Sasaki, Y. F., S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kabasawa, K. Iwama, K. Taniguchi and S. Tsuda, 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1), 103-119.
- Shelif, L., 1984. Antimicrobial effects of spices. *Journal of food safety*, 6(1), 29-44.
- Soomro, S., V. R. Chidrawar, M. Imran and H. O. Alshammari, Immunomodulating, anti-bacterial and anti-cancer potential of Za'atar (*Thymus vulgaris*) and its combination with essential oil (Olive and Balsam oil).
- Şahin, F., M. Güllüce, D. Daferera, A. Sökmen, M. Sökmen, M. Polissiou, G. Agar and H. Özer, 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food control*, 15(7), 549-557.
- Van de Braak, S., G. Leijten, 1999. Essential oils and oleoresins: a survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116.
- Zheng, W., S. Y. Wang, 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5165-5170.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümran Ece Carlık

Doğum Tarihi ve Yer : 29.10.1992 / Denizli

Yabancı Dili : İngilizce

e-mail : umranece@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	--
Lisans	Pamukkale Üniversitesi	2014
Lise	Denizli Lisesi	2011

Deneyimli Olunan Çalışma Alanları

- Uçucu Yağlar
- GC-MSve HPLC