

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

Marrubium cordatum (Labiatae)'un ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dinçer ERDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ

HAZİRAN-2007

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Dinçer ERDAĞ'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı **“*Marrubium cordatum (Labiatae)*'un Antioksidan Kapasitesinin Araştırılması”** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2007

Adı Soyadı	İmza
Başkan :
Üye :
Üye :
Üye :

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada *Marrubium cordatum* (*Labiatae*) bitkisinden elde edilen metanol özütünün antioksidan kapasitesi araştırılmıştır.

Tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sağlayan, çalışmamın her aşamasında yakın ilgisini esirgemeyen, bilgi ve önerileri ile beni her konuda yönlendiren danışman hocam, Sayın Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, bitki örneğinin teşhisinde ve bitki hakkında bilgilerini esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Dr. Gençay AKGÜL'e, çalışmalarım esnasında ve tezin hazırlanması sürecinde yine katkılarını esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Zeynep ULUKANLI' ya ve Sayın Yard. Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini ve yardımlarını aldığım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kars-2007

Dinçer ERDAĞ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
RESİMLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	8
3.1. Materyal	8
3.1.1. Bitki Materyali	8
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	8
3.1.3. Kullanılan Alet ve Gereçler	9
3.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler	9
3.1.4.1. 0,1 M PBS Tamponu (pH 7,4)	9
3.1.4.2. 0,05 M Asetat Tamponu (pH 5,5)	10
3.1.4.3. 0,2 M Fosfat Tamponu (pH 6,6)	10
3.1.5. Bitki özütlerinin hazırlanması	10
3.2. Yöntemler	11
3.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite	11
3.2.1.1. Numune ve standart hazırlanması	11
3.2.1.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler	12
3.2.2. Nitrik Oksit (NO) Radikal Süpürücü Aktivite	13

3.2.2.1. Numune ve standart hazırlanması	13
3.2.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler	13
3.2.3. İndirgeyici Güç Testi	15
3.2.3.1. Numune ve standart hazırlanması	15
3.2.3.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler	15
3.2.4. Toplam Polifenol Madde Tayini	17
3.2.4.1. Numune ve standart hazırlanması	17
3.2.4.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	19
4.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite	19
4.2. NO Radikal Süpürücü Aktivite	21
4.3. İndirgeyici Güç	23
4.4. Toplam Polifenolik Maddeler	24
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	26
6. KAYNAKLAR	31
7. ÖZGEÇMİŞ	37

ÖZET

***Marrubium cordatum*'un ANTIOKSİDAN KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu yüksek lisans tezinde, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)/nitrik oksit (NO) radikal süpürücü aktiviteler, indirgeyici güç ve toplam fenolik madde analizi gibi kurulmuş çeşitli *in vitro* sistemlerle Labiatae familyasına ait *Marrubium cordatum*'un metanol özütünün antioksidan özellikleri incelenmiştir. *M. cordatum*'un anlamlı bir şekilde DPPH ve NO radikallerini doza bağlı konsantrasyonlarda inhibe ettiği görüldü. Ayrıca yüksek kapasitede indirgeyici güç aktivitesi sergiledi. *In vitro* modellerden elde ettiğimiz bu veriler bize *M. cordatum*'un metanol özütlerinin antioksidan özelliği olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler; *Marrubium cordatum*, serbest radikaller, antioksidan kapasite, DPPH, NO

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF *Marrubium cordatum*

In this master thesis, the antioxidant properties of methanol extract of *Marrubium cordatum*, that belongs to the Labiatae family, was investigated by using various established *in vitro* systems such as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) / nitric oxide (NO) radical scavenging activity, reducing power and total phenolic substance analysis. *M. cordatum* exhibited a significant concentration-dependent inhibition of DPPH and NO radical. Furthermore, *M. cordatum* showed very high reducing power. The data obtained from these *in vitro* models clearly demonstrated antioxidant potential of methanol extract of *M. cordatum*.

Key words; *Marrubium cordatum*, free radicals, antioxidant capacity, DPPH, NO

KISALTMALAR DİZİNİ

ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
GSH:	İndirgenmiş Glutasyon
O₂⁻ :	Süperoksit Anyonu
OH[·] :	Hidroksil Radikali
¹O₂ :	Singlet (Tekil) Oksijen
NO[·] :	Nitrik Oksit
SOD :	Süperoksit dismutaz
CAT :	Katalaz
GSH-Px:	Glutasyon Peroksidaz
GR :	Glutasyon Redüktaz
DPPH :	1,1-Difenil-2-pikril-hidrazil
NO₂ :	Nitrit
PBS :	Phosphate Buffer Solution
BHT :	Bütillenmiş Hidroksi Toluen

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1. <i>Marrubium cordatum</i> ve Rutin'in DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması	20
Şekil 4.2. <i>Marrubium cordatum</i> ve Rutin'in NO radikal süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması	22
Şekil 4.3. <i>Marrubium cordatum</i> ve BHT'nin indirgeyici güç yeteneklerinin karşılaştırılması	24
Şekil 4.4. Pirokatekol standart grafiği	25

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 2.1. *Marrubium cordatum* 'un genel görünüşü.

7

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. DPPH radikal süpürücü aktivite analizi	12
Çizelge 3.2. NO radikal süpürücü aktivite analizi	14
Çizelge 3.3. İndirgeyici güç analizi	16
Çizelge 3.4. Toplam fenolik madde analizi	17
Çizelge 4.1. <i>Marrubium cordatum</i> ve Rutin'in üç deneme sonrası DPPH radikali için % inhibisyon ortalamaları	19
Çizelge 4.2. <i>Marrubium cordatum</i> ve Rutin'in üç deneme sonrası NO radikali için % inhibisyon ortalamaları	21
Çizelge 4.3. <i>Marrubium cordatum</i> ve BHT'nin üç deneme sonrası indirgeyici güç ortalamaları	23
Çizelge 4.4. Standart Pirokatekol için üç deneme sonrası absorbans ortalamaları	25

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavi edici özellikleri, ilkel çağlardan beri bilinmekte ve kullanılmaktadır. Örneğin; faydası olduğu bilinen bazı bitkiler ilk çağlarda yaraların iyileştirilmesi için kullanılmıştır [1]. Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye’de de tıbbi açıdan önemli olan bitkiler yüzyıllardan beri Anadolu halkı tarafından hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır [2,3].

Dünya insanların büyük bir kısmı özellikle gelişen ülkelerde çeşitli hastalıkların tedavisi için geleneksel uygulamalar geliştirmişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü dünya insanların % 80’inin başlıca geleneksel ilaçlara güvendiğini ve geleneksel tedavilerin büyük bir kısmını bitki özütlerini veya onların aktif bileşenleri kullanarak yaptıklarını 1993 yılında rapor etmiştir [4].

Bitkiler aleminden köken alan birçok değerli ürün vardır. Örneğin; boyalar, ilaçlar, kozmetik maddeler, besin koruyucular bunların arasında sayılabilir.

Geçen 40 yıl boyunca bitkilerin antioksidan aktiviteleriyle ilgilenilmeye başlanmıştır. Labiatae familyası, aktif bileşikleri içeren bitkiler arasında en dikkat çekenlerden biridir.

Marrubium cordatum bitkisi Labiatae familyasından olup bu familya yaklaşık 3500 türe sahiptir. Labiatae familyası Avustralya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika’da yayılım gösterebilir de, daha çok yayılım alanları Akdeniz kıyıları olarak görülmektedir. *Marrubium* güneşli, kayalık, kuru ve terk edilmiş bölgelerde baskın olarak yetişir. Türkiye’de Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yayılış göstermektedir. Bu türlerden yaklaşık olarak 500 tanesi tıbbi özelliklere sahip olduklarından dolayı dünyada geleneksel tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır.

Birçok araştırmada bazı bitki türlerinin yüksek seviyede kanseri ve kardiovasküler hastalıkları önlediği bildirilmiştir. Bu bitkilerin kimyasal bileşenlerine bakıldığında yüksek

seviyede antioksidan özellik gösteren polifenoller, vitaminler gibi maddeleri bolca içerdikleri tespit edilmiştir. Örneğin; yapılarında polifenoller, vitaminleri içeren meyve ve sebzelerin bolca tüketilmesinin kanser gibi hastalıkları önleyebileceği bildirilmiştir [5].

Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROT) kanser, nörodejeneratif ve kardiovasküler hastalıkları içine alan çeşitli hastalıkların oluşumunda hücre ve doku patogenezesinin indükleyicileri olarak bilinmektedirler. Antioksidanlar sağlığımızı sürdürmede canlı organizmaların yapısında bulunan enzim olan veya olmayan savunma bileşiklerine denilmektedir. Antioksidanlar özellikle oksidasyon sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri adı verilen bileşiklerin zararlı etkilerine karşı hücrelerin hasarlanmasını önleyen moleküllerdir. Hücresel radikal süpürücü sistemler, antioksidan enzimleri ve glutatyon (GSH), flavanoidler, ubiquinol-10 gibi enzim olmayan radikal süpürücü molekülleri içine alan bir sistemdir.

Serbest radikalleri içine alan araştırmalar kardiovasküler, kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların önlenmesinde, antioksidanlarca zengin olan besinlerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir [6]. Bitkilerin göstermiş olduğu bu özelliklerin polifenolik bileşikler, vitamin C, karotenoidler ve vitamin E gibi antioksidan maddelerden kaynaklandığı bilinmektedir.

Bu tezde antioksidan kapasiteleri üzerine fazlaca bir araştırma yapılmayan Labiatae familyasına ait olan *Marrubium cordatum* türünün antioksidan aktivitesinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bazı sentetik ilaçların yan etkilerinin olması, insanları daha az yan etkiye sahip olduğunu düşündükleri ve antioksidan kapasiteye sahip olabilecek bitkilerle tedaviye yöneltmiştir. Son zamanlarda biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin birçok hastalıkla ilişkili olduğunun tesbit edilmesi antioksidanlara karşı olan ilgiyi arttırmıştır [7].

Serbest radikallerin kanser, miyokard enfarktüsü gibi birçok hastalığa neden olduğu günümüzde ortaya konmuş ve doğal antioksidanların günlük olarak diyetle birlikte alınmasının bu hastalıkların oluşum riskini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Özellikle bitkisel organizmalarda metabolizma ürünleri olarak ortaya çıkan uçucu yağların bileşiminde yer alan terpen bileşiklerinin kimyasal yapılarından dolayı potansiyel antioksidan aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir [8].

Tsimidou ve Boskou [9], birçok baharat ve bitkinin sahip olduğu antioksidan ve antimikrobiyal aktivitenin bitkinin içermiş olduğu fenolik yapılarıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Serbest radikaller; biyokimyasal redoks tepkimeleri ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çok az bir süre için bile olsa bir çiftlenmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllere denilmektedir. Serbest radikaller aşırı derecede reaktiftirler ve bu nedenle diğer moleküller ile hızla reaksiyona girebilirler. Bu radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşmakta ve belli patolojik durumlarda üretimleri artmaktadır. Serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH \cdot), singlet (tekil) oksijen (1O_2) ve nitrik oksit (NO \cdot) gibi radikal türleridir. Serbest radikaller, nükleik asitler, lipidler, proteinler, serbest amino asitler, lipoproteinler, karbohidratlar gibi biyomoleküllere hasar verebilmektedirler. Normal fizyolojik şartlarda oksijenin %2-5'i reaktif oksijen türleri'ne (ROT) dönüşmekte ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılmaktadır. ROT, eğer antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılmazsa, lipid peroksidasyonu ile hücre hasara neden olabilmektedir.

Antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ve glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan antioksidanları içine almaktadır. Dokularda antioksidan sistemlerce kaldırılamayacak kadar aşırı serbest radikal üretiminin olduğu her patolojik durumda, oksidatif stres meydana gelmektedir [10]. Dış faktörlerin etkisiyle oluşan ROT, hücrenin oksidan/antioksidan dengesini daha da bozar.

1950'lerden önce antioksidanlar olarak bitkilerin kullanımına ait oldukça sınırlı sayıda araştırma vardır [11]. İlk temel çalışma Chipault'un grubu tarafından yapılmıştır. Chipault ve ark. [12], 32 baharat türünün antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar test ettikleri biberiye ve adaçayında çok iyi antioksidan aktivite olduğunu rapor etmişlerdir. Daha sonra araştırmacılar genel olarak Labiatae familyası ile başlayan bitkilerin antioksidan aktivitelerini araştırmaya başlamışlardır. Sonraki çalışmalarda bitkilerin temel yağ özütleri, ham özütleri ve yapılarında ki bileşiklerin tanınmasına yönelik çalışmalar devam etmiştir. Farag ve ark. [13], Labiatae familyasına ait bazı baharatların esasi yağlarının antioksidan aktivitelerini linoleik asit sistemiyle test etmişlerdir. Karanfil, kekik, biberiye, kimyon ve adaçayında antioksidan aktivite olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bitkilerde görülen antioksidan aktivitesi ve bitkinin kimyasal yapısı arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Özellikle bitkilerin yapılarında bulunan monoterpenlerin, aromatik halkalarının içermiş oldukları hidroksil grubunun yüksek antioksidan aktiviteye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Labiatae familyası üyeleri deniz seviyesinden 3500 metreye kadar olan yükseltilerde bulunabildiği gibi çok değişik habitatlarda (nemli alanlar, ormanaltı ve içi, step, kayalık, kurak alanlar, yol ve tarla kenarları gibi) ve değişik bitki toplulukları içinde de bulunabilmektedirler. Bazen de bu bitki topluluklarını kendileri oluşturarak, birlik düzeyine ulaşabilmektedirler. Yurdumuzun başta Akdeniz bölgesi olmak üzere diğer bölgelerde de değişik bitki birlikleri içinde bulunabilmektedir. Türkiye florasında *Marrubium* cinsi 21 tane tür, bir tane alttür ve 6 tane varyete olmak üzere toplam 28 tane tür ve türaltı takson ile

temsil edilmektedir [14]. *Marrubium* türlerinin çoğu, tek veya çok yıllık otsu bitkilerdir, aynı zamanda basit veya dallanmış bir yapıya sahiptirler (*Resim 2.1*) [15].

Labiatae familyasının tıbbi özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [16]. *Marrubium* cinsinden en yaygın tür olan *Marrubium vulgare* bitkisinin kullanımı 2000 yıl öncesine dayanır. Antik Mısırlılar zamanında genellikle öksürük dindirici ve balgam söktürücü olarak kullanılmıştır. Ayrıca Antik Yunan tıbbında ise kuduz köpek ısırıklarını tedavi etmede kullanılmıştır. Günümüzde ise yine öksürük dindirici, boğaz ağrısı ve solunum sistemi hastalıklarında tonik olarak kullanılabilir. Bitki bu etkilerinden dolayı çeşitli ilaçların bileşiminde (şurup, pastil ve değişik eriyikleri) yer almaktadır. Almanya'da doyumluk hissi ve iştah kaybı gibi hazımsızlık şikâyetleri tedavisinde de kullanılmaktadır [17-19].

Marrubium vulgare, Anadolu'da boz ot, at sineği, kara derme, köpek otu, kukas otu, mayasıl otu adlarıyla anılmaktadır [20,21]. Bu bitki kimyasal olarak terpenoidler, flavonoidler, fenil propanoidler, fitosteroller, azotlu maddeler, reçineler, mumlar ve mineraller içermektedir [22]. Hatta bu bitkiye özgü "Marrubiin" isimli bir madde de elde edilmiştir [23].

Yapılan bir araştırmada Labiatae familyasına ait olan ve Türkiye'de yayılış gösteren *Ballota* cinsine ait 16 bitki türünün etanol özütünün lipid peroksidasyonu ve süperoksit anyon oluşumu üzerinde antioksidan özellikleri incelenmiştir. *Ballota* türlerinden elde edilen tüm özütlerin süperoksit anyon radikallerinin süpürülmesinde ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu üzerinde antioksidan aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir [24].

Yine bir başka çalışmada Labiatae familyasına ait *Teucrium montbretii* subsp. *Pamphylicum* türünden elde edilen metanolik özütün antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve bitki özütünün lipidlerde otooksidasyonu önleyen doğal bir ürüne

sahip olduğu ve aynı zamanda bitkinin antibakteriyel ve antioksidan aktivitelere sahip olması nedeniyle doğal besin koruyucusu olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [25].

Triantaphyllou ve ark. [26], Yunanistan'da yayılış gösteren Labiatae familyasına ait 6 farklı aromatik bitki türünden (*dittany, lemon balm, mint, sage, sideritis, sweet marjoram*) elde edilen su özütlerinin antioksidan aktivitelerini incelemişler ve bitkilerden elde edilen özütlerin lipid oksidasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bitki özütlerinin lipid oksidasyonu üzerindeki antioksidan aktivitesine yapılarında bulundurdıkları fenolik bileşiklerin neden olduğu kanısına varmışlardır.



Resim 2.1. *Marrubium cordatum* 'un genel görünüşü.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Marrubium cordatum (Labiatae) bitkisi 25 Ekim - 1 Kasım 2005 tarihleri arasında Kars İlinden toplandı ve herbaryumda güneş ışınlarına maruz kalmayacak şekilde gölgede kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra bitkinin sadece yaprakları alındı ve bir öğütücü vasıtasıyla iyice toz haline gelinceye kadar öğütülüp özüt alma işlemi için hazır hale getirildi

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

DPPH Analizi için; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) (Sigma), Rutin standart maddesi (Sigma), Sodyum Asetat (Sigma), Metanol (Riedel-de Haën) ve Asetik Asit (glasiyal) (Riedel-de Haën) kullanıldı.

NO Analizi için; Metanol (Riedel-de Haën), Rutin standart madde (Sigma), Sodyum nitropurisit (Fluka), Sodyum klorür (Kimya ve Medikal Tic. Ltd. Şti.), Sodyum Fosfat dibazik dihidrat (Riedel-de Haën), Sodyum Fosfat monobazik dihidrat (Riedel-de Haën), Sodyum Hidroksit (Sigma), Hidroklorik Asit (Riedel-de Haën), Fosforik Asit (Riedel-de Haën), Sulfanilamid (Sigma) ve Naftiletilen diamin dihidroklorit (Aldrich) kullanıldı.

İndirgeyici Güç Testi için; Metanol (Riedel-de Haën), 2,6-Di-tert-butyl-4-Methylphenol (BHT) (Fluka), Potasyum Ferrisiyanit (Aldrich), Triklorasetik Asit (Riedel-de Haën), Demir Klorür (Sigma), Potasyum dihidrojen fosfat (Merck), Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck) ve Sodyum Hidroksit (Sigma) kullanıldı.

Toplam Polifenolik Madde Analizi için; Metanol (Riedel-de Haën), Pirokatekol (Fluka), Disodyum karbonat (Merck), Folin ciocalteus (Fluka) kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Gereçler

Araştırmada Distile su cihazı (GFL marka), mikrogram hassasiyetli Denver marka hassas terazi, karıştırıcı olarak Yellow Line marka vorteks kullanıldı. pH ölçümleri HANNA instruments marka pH metre ile yapıldı. Bazı kimyasal reaksiyonlar için Memmert marka su banyosu kullanıldı. Spektrofotometrik okumalar PG Instruments Ltd T60U Spectrometer marka spektrofotometre ile yapıldı. Karıştırma işlemlerinde M221 elektro.mag manyetik karıştırıcı kullanıldı. Santrifüj işlemleri için; EBA 20 Hettich zentrifugen cihazı ile soğutmalı MİKRO 22R Hettich zentrifugen cihazları kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.4.1. 0,1 M PBS Tamponu (pH 7,4)

250ml 10X konsantre solüsyon için;

18,93g NaCl

3,075g Na₂HPO₄.2H₂O

2,075g NaH₂PO₄.2H₂O

Kimyasallardan gösterilen oranlarda hassas terazide tartıldı ve bir beher içerisinde karıştırılıp, üzerine 200ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözüldü. Çözünme işlemini takiben solüsyonun pH'sı 1M HCl veya 1M NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Solüsyonun pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra total hacim distile su ile 250ml'ye tamamlandı.

3.1.4.2. 0,05 M Asetat Tamponu (pH 5,5)

Sodyum asetat ve Asetik asitten hazırlandı. Sodyum asetattan 5,71gr tartıldı, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda iyice çözüldü, daha sonra bunun üzerine de 440µl asetik asitten eklenerek pH'sı 5,5 ayarlanarak son hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.1.4.3. 0,2 M Fosfat Tamponu (pH 6,6)

KH_2PO_4 ve K_2HPO_4 ile hazırlandı. 10,88gr KH_2PO_4 ve 3,48gr K_2HPO_4 tartıldı toplam hacmi distile su ile 500ml'ye tamamlandı.

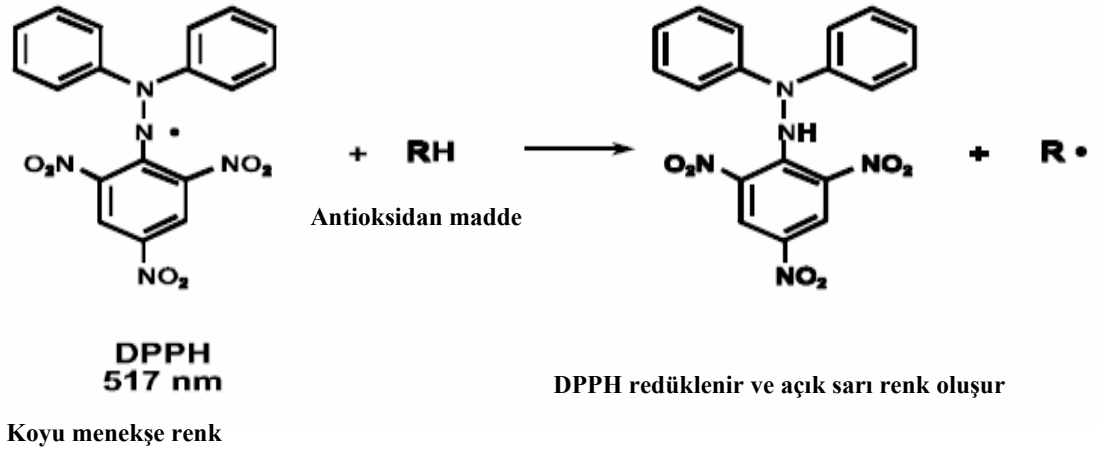
3.1.5. Bitki özütlerinin hazırlanması

Özüt alma işleminde ceketli ısıtıcı kullanıldı ve sokselet sistemiyle bitki özütü çıkarıldı. Özüt alma işlemi için çözücü madde olarak metanol kullanıldı. Öğütülerek toz haline getirilen kurutulmuş bitki yaprağından her bir deneme için 25gr tartıldı ve filtre kâğıdına rulo yapılarak sokselet içerisine yerleştirildi. Daha sonra ceketli ısıtıcı, metanol düzenli bir şekilde kaynayacak biçimde (65°C) ısıtıldı. Bu özüt alma işlemi 8 saat boyunca devam etti. İşlem tamamlandıktan sonra özüt maddeyi metanolden tamamen arıtmak için evaporatör kullanıldı ve su trompu ile düşük basınçta metanolün tamamı uçuruldu. Elde edilen ürün koyu yeşil renkte ve yağimsı bir haldeydi. Sonrasında ise cam balon içerisindeki özüt madde alüminyum folyo ile ışıktan korunacak şekilde iyice paketlenildi ve -35°C 'de muhafaza edilerek daha sonraki antioksidan testler için kullanıma hazır hale getirildi. Elde edilen özütün **i-** 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikal süpürücü etkisine, **ii-** nitrik oksit (NO) radikal süpürücü etkisine, **iii-** toplam polifenolik madde içeriğine ve **iv-** indirgeyici gücüne bakıldı. Bütün testlerin sonuçları, antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinen standartlar ile karşılaştırıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. DPPH radikal süpürücü aktivite

Marrubium cordatum bitkisinin metanolik özütünün DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi Mokbel ve Hashinaga'nın [27] metoduna göre çalışıldı. DPPH radikali 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede koyu menekşe bir renk verir. DPPH radikali aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi bir antioksidan madde ile reaksiyona girdiği zaman redüklenerek koyu menekşe olan rengi açık sarıya dönüşmekte ve bu renk değişimide UV/visible spektrofotometrede 517 nm de belirlenebilmektedir. Antioksidan kapasitesi çalışılacak maddenin standart bir maddeye karşı DPPH redükleme kapasitesi bu renk azalımına göre çalışılıp karşılaştırılmaktadır.



3.2.1.1. Numune ve standart hazırlanması

Marrubium özütünün 0–550 µg/ml konsantrasyonları arasında değişen miktarlarda metanol çözeltileri hazırlandı. Aynı şekilde Rutin standart maddesinin de 0–550 µg/ml arasında değişen miktarlarda metanolde çözülmüş konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.1.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

0,3 mM DPPH çözeltisi (metanolde hazırlandı), 0,05 M asetat tamponu (pH 5,5), metanol, distile su.

Çizelge 3.1. DPPH radikal süpürücü aktivite analizi

	Kör	Kontrol Grubu	Bitki Özüt Grubu	Bitki Özütünden gelen absorbands Grubu	Rutin Grubu
0,05 M Asetat tamponu (pH 5,5)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Metanol	3 ml	2 ml	1,9 ml	2,9 ml	2,9 ml
Bitki özütü	—	—	0,1 ml	0,1 ml	—
Rutin	—	—	—	—	0,1 ml
0,3 mM DPPH	—	1 ml	1 ml	—	—

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendi. 30 dakika sonunda özütün, standartın ve kontrolün absorbandsları spektrofotometrede 517 nm’de kör’e karşı okundu. Bütün numuneler 3 tekrarlı çalışıldı ve ortalama değerleri alındı. Rutin pozitif kontrol olarak kullanıldı. DPPH’nin inhibisyon yüzdesi Shyu ve Hwang’ın [28] aşağıda verilen hesaplama formülüne göre yapıldı ve grafik üzerinde standart madde ile DPPH süpürücü etkileri karşılaştırıldı.

$$\% \text{ Süpürücü etki} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

Burada;

A_0 = Özütlemeden DPPH'nin 517 nm'deki absorpsiyonu (Kontrol Absorpsiyonu)

A = Özütleme veya standartın 30 dakika sonra 517 nm'deki absorpsiyonu

A_b = DPPH olmadan özütlemeden veya standarttan gelen absorpsiyon

3.2.2. Nitrik Oksit (NO) Radikal Süpürücü Aktivite

Marrubium cordatum bitkisinin metanol özütleminin NO serbest radikal süpürücü aktivitesi Badami ve ark.[29] ve Kumar ve ark. [30]'nin metodlarına göre kısmen modifiye edilerek çalışıldı. Sodyum nitroprusit sulu solüsyonlarda ve fizyolojik pH'da kendiliğinden NO üretmektedir ve bu NO radikalide ortamdaki oksijenle etkileşime girerek nitrit (NO_2) iyonları üretmektedir. Oluşan nitrit'te Greiss reaksiyonuyla renklendirilerek 548 nm'de okunarak ortamdaki NO tayin edilebilmektedir [31].

3.2.2.1. Numune ve standart hazırlanması

Marrubium özütleminin 0–200 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları arasında değişen miktarlarda metanol çözeltileri hazırlandı. Aynı şekilde Rutin standart maddesinin de 0–200 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen miktarlarda metanolde çözülmüş konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.2.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

10 mM sodyum nitroprusit, PBS tamponu (0,1 M, pH 7,4), Greiss Reaktif (5%lik fosforik asit, %1 sulfanilamid ve % 0,1 naftiletillen diamin dihidroklorit hazırlanarak yapıldı), fosforik asit, metanol.

Çizelge 3.2. NO radikal süpürücü aktivite analizi

	Kontrol Grubu	Bitki Özüt Grubu	Bitki Özütünden gelen absorbands Grubu	Rutin Grubu
Sodium nitroprusside (10mM)	2 ml	2 ml	—	2 ml
PBS Tamponu (0,1 M, pH 7,4)	0,5 ml	0,5 ml	2,5 ml	0,5 ml
Metanol	0,5 ml	—	—	—
Bitki Özütü	—	0,5 ml	0,5 ml	—
Rutin	—	—	—	0,5 ml

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 150 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra özüte, standarta ve kontrole 1:1 oranında Greiss reaktifi eklenerek 30 dakika daha oda sıcaklığında beklendikten sonra absorbandslar spektrofotometrede PBS kör'üne karşı 548 nm'de okundu. Bütün numuneler 3 tekrarlı çalışılarak ortalama değerleri alındı. Oluşan nitrik oksitin yüzde inhibisyonu kontrolün ve numunelerin absorbands değerlerinin karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Rutin pozitif kontrol olarak kullanıldı.

NO radikal süpürücü etki hesaplanması;

$\%inhibisyon = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$ formülü kullanılır.

A_0 : Kontrol Absorbansı

A: Özüt veya Standart Absorbansı

A_b : Özüt veya Standarttan gelen Absorbans

3.2.3. İndirgeyici güç testi

Bu testte bitki özütünün veya standartın ortama eklenen Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme kapasitesi araştırıldı. Standart olarak Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) kullanıldı. Bir bileşiğin indirgeyici kapasitesinin olması, antioksidan aktivitesinin belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. *Marrubium cordatum* bitki özütünün indirgeyici güç testi Oyaizu'nun metoduna göre çalışıldı [32].

3.2.3.1. Numune ve standart hazırlanması

Marrubium cordatum özütünün 0–600 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları arasında değişen miktarlarda metanol çözeltileri hazırlandı. Aynı şekilde standart olarak kullanılan Bütillenmiş Hidroksitoluen'inde (BHT) metanolde çözülmüş konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.3.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

%1'lik Potasyum ferrisiyanid ($K_3Fe(CN)_6$), 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6), %10'luk Triklorasetik asit (TCA), % 0,1'lik Demir klorür ($FeCl_3$).

Çizelge 3.3. İndirgeyici güç analizi

	Kör	Bitki Özüt Grubu	BHT Grubu
Fosfat Tamponu (0,2 M, pH 6,6)	2,25 ml	2,25 ml	2,25 ml
Bitki Özütü (0–600 µg arası konsantrasyonlar)	—	0,25 ml	—
BHT (0–600 µg arası konsantrasyonlar)	—	—	0,25 ml
%1'lik Potasyum ferrisiyanid	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Metanol	0,25 ml	—	—

Karıştırıldı 20 dakika 50⁰C derecede inkübasyona bırakıldı. Daha sonra

TCA (%10 luk)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
---------------	--------	--------	--------

eklendi, karıştırıldı ve 1000 x g de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki temiz süpernatandan 2,5 ml alındı ve üzerine

Distile su	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
% 0,1 FeCl ₃	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

eklendi, karıştırıldı ve 700 nm'de spektrofotometrede ölçüm alındı. Bütün numuneler 3 tekrarlı çalışılarak ortalama değerleri alındı. Sonuçlar standart BHT ile karşılaştırıldı. Reaksiyon karışımındaki yüksek absorbands, güçlü indirgeyici kapasiteye işaret etmektedir.

3.2.4. Toplam Polifenolik Madde Tayini

Marrubium cordatum bitkisinin metanolde hazırlanmış özütünün toplam çözünebilir Fenolik maddelerin tayini Slinkard ve Singleton'un metoduna göre Folin-Ciocalteu ayracı kullanılarak belirlendi [33].

3.2.4.1. Numune ve standart hazırlanması

1 ml metanol içerisinde *Marrubium cordatum* çözüldü (çözelti 1 mg *Marrubium cordatum* özütü içermekteydi). Pirokatekol standart maddesinin de 0–100 µg/ml arasında değişen miktarlarda metanolde çözülmüş konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.4.2. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Folin-Ciocalteu ayracı, %2'lik Na₂CO₃

Çizelge 3.4. Toplam Polifenolik Madde analizi

	Kör	Bitki Özüt Grubu	Pirokatekol Grubu
Bitki Özütü	—	1 ml	—
Pirokatekol (0–100 µg/ml arası konsantrasyonlar)	—	—	1 ml
Distile su	46 ml	45 ml	45 ml
Folin-Ciocalteu ayracı	1 ml	1 ml	1 ml

Çözeltiler eklendi ve karıştırıldı. 3 dakika sonra %2'lik Na₂CO₃ eklendi

%2'lik Na ₂ CO ₃	3 ml	3 ml	3 ml
--	------	------	------

Çözeltiler aralıklarla çalkalanarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 760 nm’de spektrofotometre kör’e karşı sıfırlanarak özütün ve standartın toplam polifenolik madde absorbans ölçümleri yapıldı. Bütün gruplarda okumalar 3 tekrarlı yapılarak ortalama değerleri alındı. *Marrubium cordatum* bitki özütünün toplam polifenolik madde içeriği pirokatekol eşleniği olarak mg/g cinsinden belirlendi.

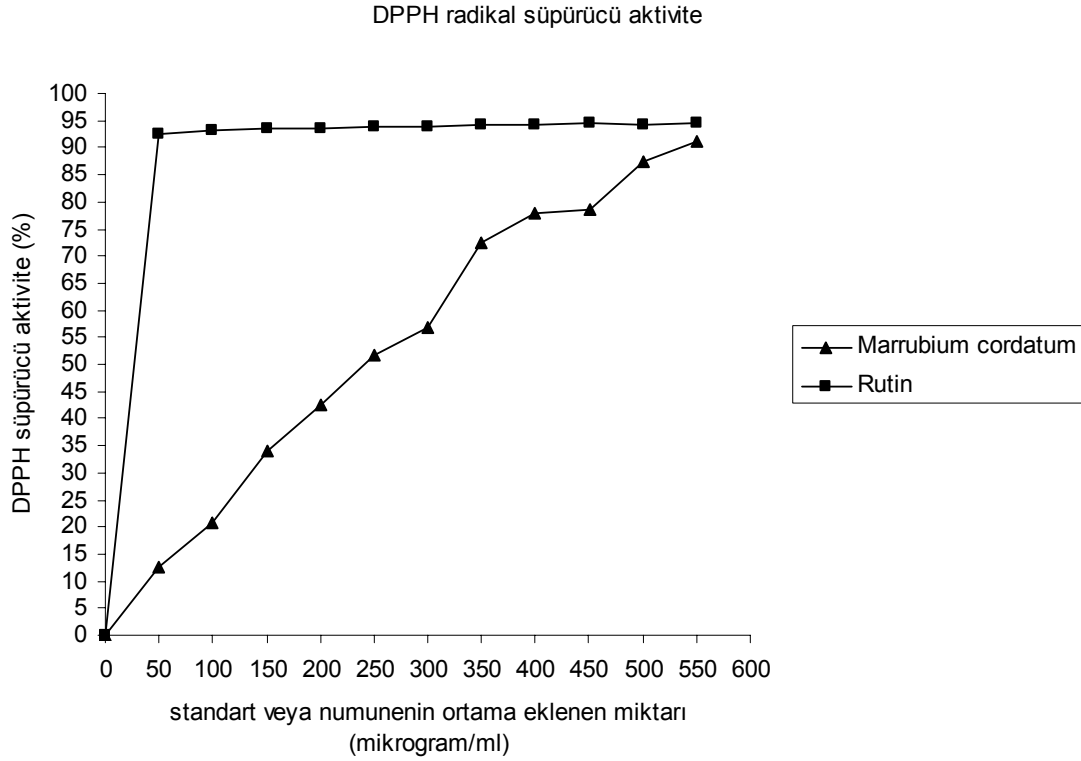
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Marrubium cordatum ve Rutin standart maddesinin DPPH radikal süpürücü % aktiviteleri üç deneme ortalaması olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Marrubium cordatum* ve Rutin'in üç deneme sonrası DPPH radikali için % inhibisyon ortalamaları

Ortama eklenen <i>Marrubium cordatum</i> veya Rutin miktarı (mikrogram/ml)	<i>Marrubium cordatum</i> için % DPPH İnhibisyonu (ortalama±standart sapma)	Rutin için % DPPH inhibisyonu (ortalama±standart sapma)
0	0	0
50	12,65±2,09	92,37±0,34
100	20,83±3,10	93,14±0,07
150	34,02±2,66	93,52±0,04
200	42,62±0,84	93,59±0,27
250	51,62±1,10	93,75±0,26
300	56,78±0,87	93,90±0,26
350	72,43±0,98	94,21±0,27
400	77,73±0,36	94,21±0,26
450	78,54±2,18	94,44±0,58
500	87,48±0,78	94,37±0,25
550	91,01±2,73	94,39±0,28



Şekil 4.1. *Marrubium cordatum* ve Rutin'in DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması

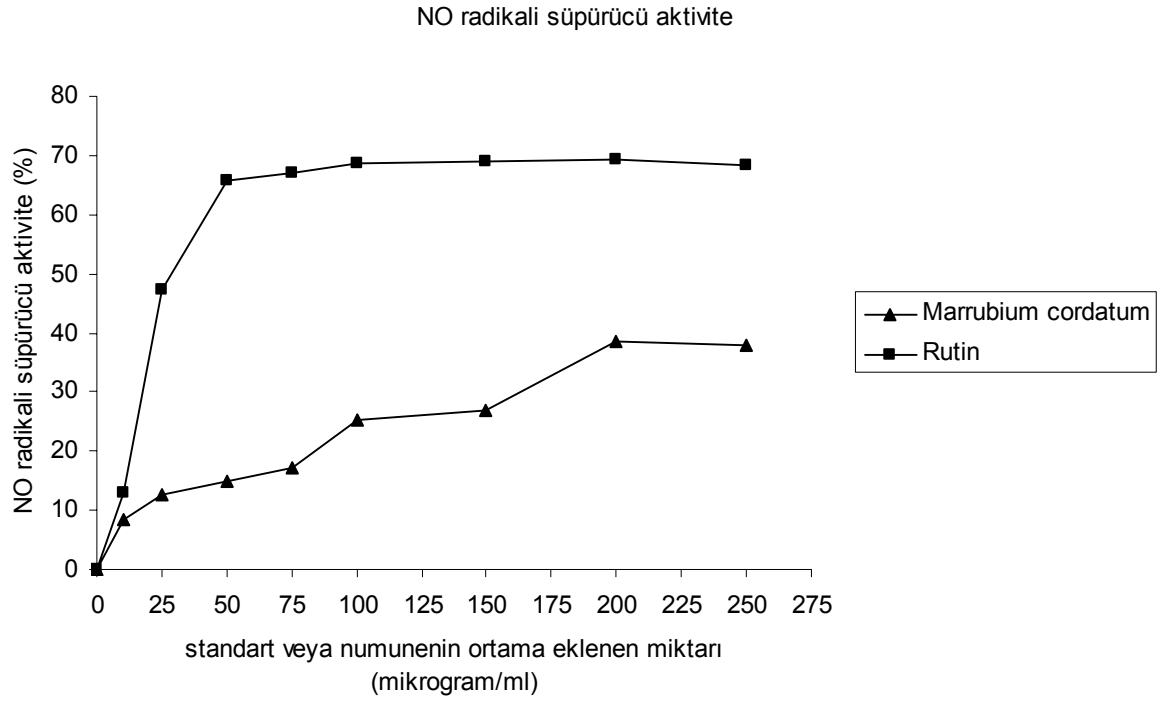
Marrubium cordatum metanol özütü, 0,3 mM DPPH içeren ortama çeşitli miktarlarda eklenerek, DPPH radikal süpürücü etkisi Rutin standartı ile karşılaştırıldı (Şekil 4.1). Deneyler sonucunda elde edilen verilere lineer regresyon analizi uygulandığında, ortamdaki DPPH radikalinin %50' sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değerinin 263 mikrogram/ml olduğu tespit edildi (R²=0,978).

4.2. NO Radikal Süpürücü Aktivite

Marrubium cordatum ve Rutin standart maddesinin NO radikal süpürücü % aktiviteleri üç deneme ortalaması olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Marrubium cordatum* ve Rutin'in üç deneme sonrası NO radikali için % inhibisyon ortalamaları

Ortama eklenen <i>Marrubium cordatum</i> veya Rutin miktarı (mikrogram/ml)	<i>Marrubium cordatum</i> için % DPPH inhibisyonu (ortalama±standart sapma)	Rutin için % DPPH inhibisyonu (ortalama±standart sapma)
0	0	0
10	8,50±0,70	12,96±1,00
25	12,55±1,13	47,41±0,99
50	14,98±0,78	65,78±1,20
75	17,14±0,94	67,10±2,10
100	25,38±0,99	68,78±0,82
150	26,79±3,42	68,96±2,06
200	38,70±2,26	69,23±2,78
250	37,86±1,17	68,29±1,45



Şekil 4.2. *Marrubium cordatum* ve Rutin'in NO radikal süpürücü aktivitelerinin karşılaştırılması

pH 7,4'de PBS tamponunda 10 mM sodyum nitroprussit kullanılarak NO radikali üretildi ve farklı miktarlarda ortama eklenen metanolik *Marrubium cordatum* özütünün NO radikal süpürücü etkisi Rutin standart maddesiyle karşılaştırıldı (Şekil 4.2). Deneyler sonucunda elde edilen verilerin lineer regresyon analizi yapıldığında ortamdaki NO radikalinin %50 sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değerinin 303 mikrogram/ml olduğu tespit edildi ($R^2=0,903$).

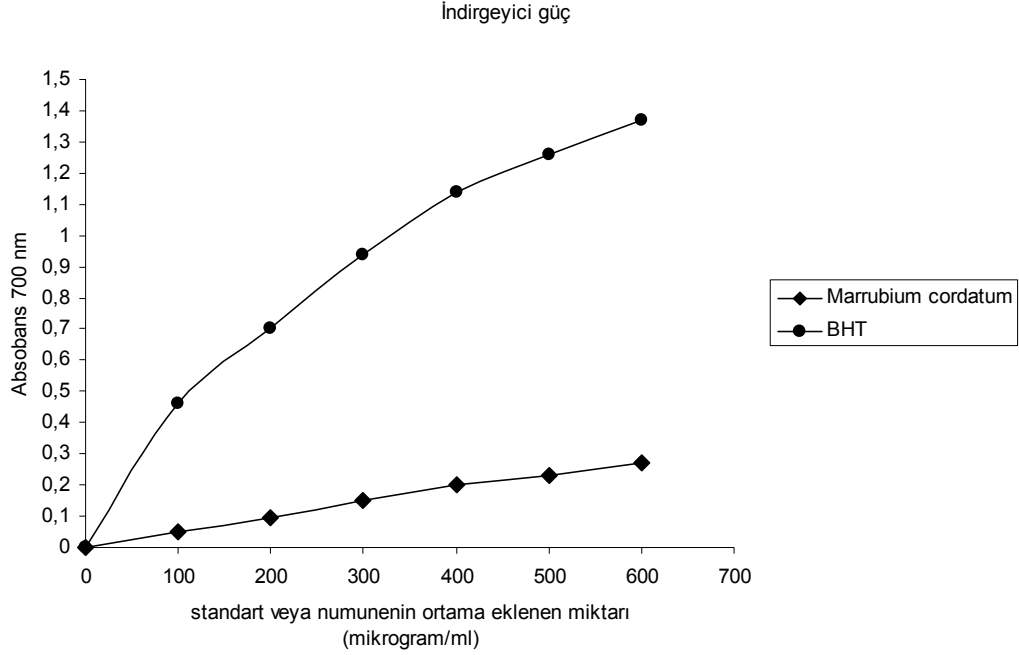
4.3. İndirgeyici Güç Testi

Marrubium cordatum ve BHT (bütillenmiş hidroksi toluen) standart maddesinin indirgeyici güç aktiviteleri üç deneme ortalaması olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Marrubium cordatum* ve BHT nin üç deneme sonrası indirgeyici güç ortalamaları

Ortama eklenen <i>Marrubium cordatum</i> veya Rutin miktarı (mikrogram/ml)	<i>Marrubium cordatum</i> için indirgeyici güç (ortalama±standart sapma)	BHT için indirgeyici güç (ortalama±standart sapma)
0	0	0
100	0,050±0,010	0,461±0,010
200	0,095±0,010	0,697±0,030
300	0,151±0,010	0,939±0,020
400	0,200±0,040	1,144±0,050
500	0,231±0,030	1,256±0,020
600	0,269±0,010	1,366±0,020

Bu testte, *Marrubium cordatum* bitkisi özütünün, ortama eklenen Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme kapasitesini araştırmak için, standart olarak kullanılmış olan Bütillenmiş Hidroksitoluen'le (BHT) karşılaştırması yapıldı. Şekil 4.3'te, BHT ile *Marrubium cordatum* özütünün redüktif yetenekleri karşılaştırılmıştır. Bir bileşiğin indirgeyici kapasitesinin olması, antioksidan aktivitesinin belirleyicisi olarak kullanılmaktadır.



Şekil 4.3. *Marrubium cordatum* ve BHT'nin indirgeyici güç yeteneklerinin karşılaştırılması

4.4. Toplam Polifenolik Madde

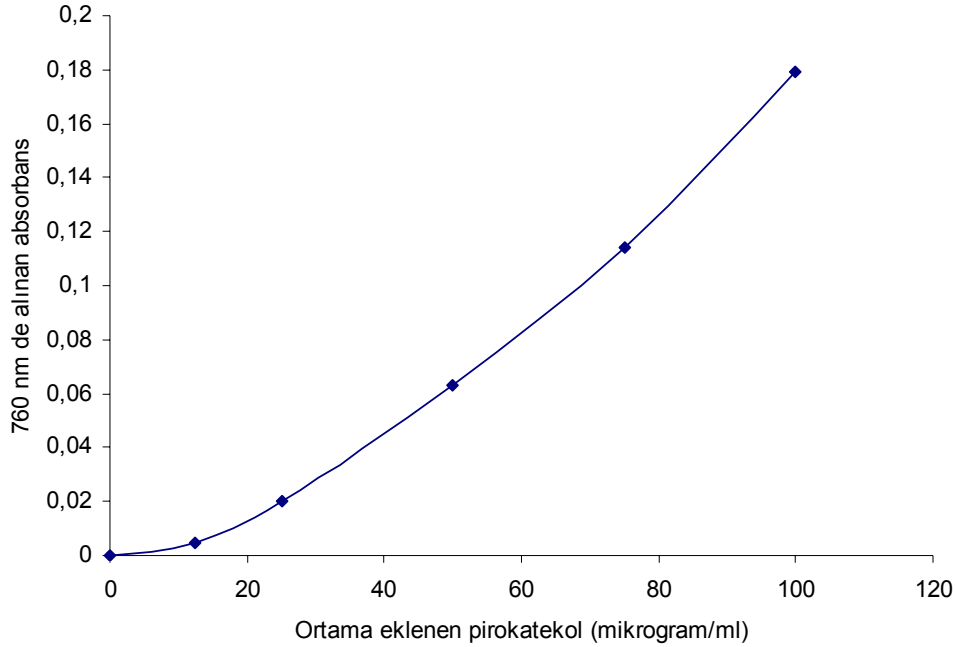
Fenoller (hidroksil grupları sayesinde) radikal süpürücü aktiviteye sahip olduklarından, bitkilere antioksidan özellik kazandıran oldukça önemli bileşiklerdir. Aşağıdaki tabloda fenolik bir standart olan pirokatekolün 0–100 mikrogram/ml arasında değişen miktarlarda 760 nm'deki absorbans değişimlerine ait üç ortalamanın çizelgesi verildi (Çizelge 4.4) ve buda bir grafik haline getirildi (Şekil 4.4). Ortamda bulunan fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Ortama eklenen 1 mg *Marrubium cordatum* bitkisi özütünün 760 nm'de absorbans değeri 0,031 olarak bulunmuştur. *Marrubium cordatum* bitkisi metanol özütünün toplam fenolik madde içeriği standart Pirokatekol grafiğinden elde edilen ve aşağıda verilen eşitliğin kullanılmasıyla mikrogram pirokatekole eş fenolik madde olarak belirlendi.

$$\text{Absorbans} = 0,00182 \mu\text{gr pirokatekol} - 0,016 \quad (R^2=0,972).$$

Buradanda 1 mgr *Marrubium cordatum*'un 25,82 µgr pirokatekol eşlenik madde içerdiği tespit edildi.

Çizelge 4.4. Standart Pirokatekol için üç deneme sonrası absorbans ortalamaları

Ortama eklenen Pirokatekol miktarı (mikrogram/ml)	760 nm de spektrofotometrede alınan absorbans (ortalama±standart sapma)
0	0
12,5	0,005±0,010
25	0,020±0,010
50	0,063±0,030
75	0,114±0,020
100	0,179±0,010



Şekil 4.4. Pirokatekol standart grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tezde, *Marrubium cordatum* bitkisinin metanol özütünün doza bağılı olarak ortamda bulunan serbest radikalleri süpürdüğü, standart antioksidan maddeler ile karşılaştırıldığında da etkin bir antioksidan aktivitesinin olduğu tespit edildi. Bu bitki türü üzerinde fazlaca araştırma olmaması nedeniyle bulunan sonuçlarımız dikkat çekicidir. Deneyler sonucunda elde edilen verilerden ortamdaki DPPH radikalının %50' sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değerinin 263 mikrogram/ml olduğu tespit edilmiştir. NO radikalının %50'sini süpüren *Marrubium cordatum* bitkisinin IC₅₀ değeri ise 303 mikrogram/ml'dir. Bitki aynı zamanda doza bağılı olarak bir indirgeyici güç sergilemiştir ki bu da onun antioksidan yeteneğinin olduğunun bir başka delilidir. Ayrıca yapısında içermiş olduğu polifenolik maddeler ona bu özelliğini vermiş olabilir. Fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında bulunan polifenolik komponentlerdir, en yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir. Bunların besinlerde bulunan ve kolayca oksitlenebilen maddelerin oksidasyonunu engellediği bildirilmiştir [34]. Fenolik bileşiklerin, bitkilerin antioksidan aktivitelerine doğrudan katkıda bulunabildikleri rapor edilmiştir [35].

Birçok hastalığın oluşmasında serbest radikallerin rolü oldukça iyi bilinmektedir. Vücüdümüzde meydana gelen birçok kimyasal reaksiyon reaktif oksijen türlerini oluşturur ve bunlar da önemli biyolojik moleküllere zarar verebilmektedirler. Eğer bu radikaller ortamdaki kaldırılmazlarsa hastalıkların gelişimine yol açabilirler [36]. Bununla birlikte serbest radikallerin zararlı etkileri, serbest radikalleri süpürme yeteneğinde olan ve organizmadan onları detoksifiye edebilen antioksidan maddeler ile bloklanabilmektedir. Serbest radikaller üzerine yapılan çalışmalar kardiovasküler hastalıklar, kanserler, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde antioksidanlar açısından zengin olan besinlerin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur [37]. Son yıllarda oksidatif stresin işe karıştığı hastalıkların kontrolünde antioksidanlar

büyük önem kazanmıştır. Birçok bitki özütü ve fitokimyasalların farklı sınıfları antioksidan aktivite göstermektedir.

Örneğin; Urticaceae familyasına ait *Urtica dioica* bitkisinden elde edilen su özütünün antioksidan, antimikrobiyal, anti-ülser ve analjezik özellikleri üzerinde çalışılmıştır. Bitki özütünün antioksidan aktivitesi, indirgeyici güç, serbest radikal süpürücü, hidrojen peroksit süpürücü, süperoksit anyon radikali süpürücü ve metal bağlayıcı aktiviteleri gibi farklı antioksidan testlerinin kullanılmasıyla değerlendirilmiş ve *Urtica dioica* özütünün oksidatif sistemlere karşı oldukça güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [38].

Yine Rajeshwar ve ark. [39], Fabaceae familyası türlerinden *Mucuna pruriens* bitkisinin tohumlarından elde edilen metanol özütünün DPPH, hidroksil radikali ve nitrik oksiti inhibe etmesi ve süperoksit anyon radikali ile hidrojen peroksit radikalini süpürmesiyle güçlü antioksidan aktivite gösterdiğini, ayrıca BHT, L-Askorbik asit, Curcumin, Quercetin ve α -tokoferol gibi antioksidan özelliğe sahip maddeler ile karşılaştırıldığında indirgeyici güç aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada özütün toplam fenolik maddeleri önemli miktarda içerdiği ve bunların da bitkinin antioksidan aktivitesi üzerinde çok önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada, Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) cinsine ait 4 farklı türün; Huang Harnng Jyur (HHJ), Bai Harnng Jyur (BHJ), Gan Harnng Jyur (GHJ) ve Kung Harnng Jyur (KHJ) su özütlerinin antioksidan kapasiteleri araştırılarak, türlerin toplam fenolik bileşiklerine ve radikal süpürücü aktivitelerine bakılmıştır. Bu çalışmada, Harnng Jyur varyetelerinden elde edilen su özütlerinin serbest radikalleri süpürmede oldukça önemli bir aktiviteye sahip olduğu görülmüş ve bunların serbest radikal inhibitörleri olduğu ve serbest radikaller ile reaksiyon verebilen temel antioksidanlar olduğu kanısına varılmıştır [35].

Kumar ve ark. [30], *Bauhinia racemosa* metanol özütünün radikal süpürücü aktivitesini DPPH ve NO \cdot radikalinin inhibe edilmesi, toplam fenolik içerikleri ve indirgeyici gücüne

bağlı olarak değerlendirmişlerdir. Bitki özütünün, DPPH radikalini önemli ölçüde ortamdan süpürdüğü ve NO radikalini inhibe ettiği rapor edilmiştir ve özütün artan konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan aktivitesinin de arttığı bildirilmiştir. Fenolik bileşiklerin, hidroksil gruplarının radikal süpürücü aktivitelerinin *Bauhinia racemosa* bitkisinin antioksidan aktivitesinden sorumlu olabileceği kanısına varmışlardır.

Gülçin ve ark. [40], Pinaceae familyasına ait *Pinus nigra* türlerinde mevcut turpentin (TPN) maddesinin antioksidan özelliklerini metamazol, BHT, BHA, quercetin ve α -tokoferol gibi farklı standartlar ile karşılaştırdıklarında bu maddenin, analjezik aktiviteye, hidrojen peroksit süpürücü aktiviteye, metal bağlama yeteneğine, serbest radikal süpürücü aktiviteye, süperoksit anyon radikalini süpürücü aktiviteye, indirgeyici güce ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. TPN'nin bu çeşitli antioksidan mekanizmalarını, TPN'nin hidrojen verme yeteneğine bağlı olduğu kanısına varmışlardır ve TPN'nin antioksidan aktivitesinden TPN'deki mevcut fenolik bileşiklerin sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar TPN'nin farmakötikal ve sağlık sektöründe bir besin bileşeni olarak veya doğal antioksidanların ve analjeziklerin kolayca elde edilebilen bir kaynağı olarak kullanılabileceği kanısına varmışlardır.

Bu araştırmalara ilaveten özellikle bitki kökenli yeni doğal antioksidanların araştırılması oldukça artmıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde *Marrubium* türlerinin araştırılmasında çalışmalara yeni açılımlar getirecektir. Giriş kısmında belirttiğimiz gibi Labiatae familyasına ait bitkiler tıbbi açıdan kullanılan bitkilerdir. Yapılan çalışmalarda *Marrubium cordatum* bitkisinin ait olduğu familya olan Labiatae'daki bitkilerin antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Erdemoğlu ve ark. [41], Türkiye'de yetişen Labiatae familyasına ait 4 bitki türü olan *Salvia viridis*, *Salvia multicaulis*, *Stachys byzantina* ve *Eremostachys laciniata*'nın serbest radikal süpürücü aktivitelerini bilinen antioksidanlar ile karşılaştırdıklarında oldukça yüksek radikal süpürücü aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir. Özellikle bu bitkilerin

içerdikleri flavonoidlerin, fenolik asitlerin, esasi yağların ve terpenlerin bu antioksidan aktiviteye neden oldukları kanısına varmışlardır.

Yine Sotelo-Felix ve ark. [42], Labiatae familyasına ait olan *Rosmarinus officinalis* bitkisi özütünün ratlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan akut karaciğer hasarına olan etkisini araştırmışlar ve bitkinin karbon tetraklorür hasarı kaynaklı karaciğer lipit peroksidasyonunu önlediğini, buna karşın karaciğerdeki histopatolojik değişimleri ise kısmen önlediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bitkinin bu özelliğinin karbon tetraklorür indüklü serbest radikal oluşumunu süpürme ile yaptığı sonucuna varmışlardır.

Pavela [43], Labiatae familyasına ait olan 8 bitki türünün (*Origanum majorana*, *Ocimum basilicum*, *Cnicus benedictus*, *Marrubium vulgare*, *Hyssopus officinalis*, *Salvia splendens*, *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*) metanol özütlerinin *Spodoptera littoralis* larvaları üzerine insektisidal aktivitelerini araştırmıştır. Araştırmacı bütün bitki özütlerinin larvalar üzerinde toksik etkiye farklılıklar göstererek sahip olduğunu bildirmiştir. Özütlerden *Origanum majorana*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* larvalara oldukça yüksek toksik etki göstermiştir.

Labiatae familyasına ait *Melissa officinalis*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, *Satureja hortensis* ve *Majoranna hortensis* türlerinin toplam antioksidan güçleri plazmanın demir indirgeyici yeteneği (FRAP) testi ile araştırılmış ve bu bitkilerin antioksidan aktivitelerinin olduğu bu metodla belirlenerek yapılan diğer araştırmalara destek sağlanmıştır [44].

Kumaran ve ark. [6], Labiatae familyasına ait *Coleus aromaticus* türünün yapraklarından elde edilen su özütünün antioksidan özelliklerini DPPH ve NO radikal süpürücü aktiviteleri ile bitkinin indirgeme kapasitesine bağlı olarak değerlendirmişlerdir. DPPH radikalinin, antioksidan özelliğe sahip bir madde ile aynı ortamda bulunması, metanolik DPPH solüsyonundan bir hidrojen atomunun açığa çıkmasına ve böylece non-radikal DPPH-H formunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Araştırmacılar *Coleus aromaticus* bitki

özütünün benzer şekilde, bir antioksidan olarak işlev gördüğü ve hidrojen verme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada *Coleus aromaticus* bitki özütünün NO radikalının süpürülmesinde benzer şekilde bir aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca araştırmacılar *Coleus aromaticus* bitki özütünün serbest radikal süpürücü aktivitesinin bitkinin indirgeyici gücüne bağlı olarak geliştiğini rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak; *Marrubium cordatum* yapraklarının metanol özütünün *in vitro* deney ortamlarında çeşitli serbest radikal süpürücü sistemlerle yapılan denemeleriyle elde edilen veriler, bu bitkinin anlamlı şekilde hem serbest radikal süpürücü hem de antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte *Marrubium cordatum* bitkisinin *in vitro* sistemlerde elde edilen bu sonuçlarının, *in vivo* sistemlerde çeşitli patolojilerde, hastalıklarda veya toksik çalışmalarda denenerek yararlılığının da ortaya konulması gerektiği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Cowan, M.M., “Plants products as antimicrobial agents”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582 (1999).
2. İlçım, A., Dığrak, M. ve Bağcı, E., “Bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması”, *Turk. J. Biol.*, 22: 119-125 (1998).
3. Ateş, D. A. ve Erdoğan, Ö. T., “Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts”, *Turk. J. Biol.*, 27: 157-162 (2003).
4. Iqbal, A., Zafar, M. and Faiz, M., “Screening of some indian medicinal plants for their antimicrobial properties”, *J. Ethnopharmacol.*, 62: 183-193 (1998).
5. Block, G., Patterson, B. and Subar, A., “Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence”, *Nutr. Cancer*, 18: 1–29 (1992).
6. Kumaran, A. and Joel Karunakaran, R., “Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*”, *Food Chem.*, 97: 109–114 (2006).
7. Cheesman, K. H. and Slater, T. F., “Introduction to free radical biochemistry”, *Br. Med. Bull.*, 49 (3): 481-493 (1993).
8. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M., "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex", *Anal. Biochem.*, 269: 337-341 (1999).
9. Tsimidou, M. and Boskou, D., “Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In ‘Spices, Herbs and Edible Fungi’”, (Edited By G. Charalambous), *Elsevier*, New York, pp. 273–284 (1994)

10. Kılınç, K., “Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri”, *Biyokimya Dergisi*, X: 60-89 (1985).
11. Cuppett, S.L. and Hall, C.A 3rd., “Antioxidant activity of the Labiatae”, *Adv. Food Nutr. Res.*, 42: 245-271 (1998).
12. Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M. and Lundberg, W.O., “The antioxidant properties of natural spices”, *Food Res.*, 17: 46-55 (1952).
13. Farag, R.S., Badel, A.Z.M.A. and El Baroty, G.S.A., “Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66: 800–804 (1989).
14. Akgül, G., “*Marrubium* L.(Lamiaceae) Cinsinin Revizyonu”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2004).
15. Mabberley, D.J., “The Plant-Book”. 2nd ed. (ISBN: 0-521-4142-0). (*Cambridge University Press*, 40 W. 20th St., New York, NY 10011-4211) xvi, 858 pp. (1997).
16. Rabelo M., Souza E.P., Soares P.M.G., Miranda A.V., Matos F.J.A. and Criddle D.N., “Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in mice”, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36: 521-524 (2003) (Short Communication).
17. Ghazanfar, S. A., “Handbook of Arabian Medicinal Plants, *CRC Press*, Boca Raton, (1994).
18. Farzaneh, Naghib, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M. and Abdolbaset, Ghorbani., “Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology”, *I.J.P.R.*, 2: 63-79 (2005).

19. Blumenthal, M., Goldberg, A., and Brinckmann., “Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs”, **Copyright American Botanical Council. Publ. by Integrative Medicine Communications**, 1029 Chestnut Street, Newton, MA 02464. Pp. 130-133 (2000).
20. Baytop, T., “Türkçe Bitki Adları Sözlüğü”, **Türk Tarih Kurumu Basımevi**, Ankara, s.52 (1994).
21. Zeybek, N. ve Zeybek, U., “Farmasotik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri”, 2. Baskı, **Ege Üniversitesi Basımevi**, İzmir, s.374 (1994).
22. Çitoğlu, G.S. ve Akşit, F., “*Marrubium trachyticum* Boiss. Üzerine Farmakognozik Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara (2000).
23. Şener, B., “*Marrubium anisodon* C. Koch Üzerine Farmakognozik Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, **Farmakognozi A.B.D.**, Ankara (1988).
24. Citoğlu, G. S., Çoban, T., Sever, B. ve İşcan M., “Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey”, **J. Ethnopharmacol.**, 92: 275-280 (2004).
25. Özkan, G., Kuleaşan, H., Çelik, S., Göktürk, R.S. ve Ünal, O., “Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *Pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities”, **Food Control**, 18: 509–512 (2007).
26. Triantaphyllou, K., Blekas, G. and Boskou, D., “Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae”, **Int. J. Food Sci. Nutr.**, 52: 313-317 (2001).

27. Mokbel, M.S. and Hashinaga, F., “Antibacterial and antioxidant activities of banana (Musa, AAA cv. Cavendish) fruits peel”, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 1: 126–132 (2005).
28. Shyu, Y.S. and Hwang, L.S., “Antioxidant activity of the crude extracts of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal”, *Food Res. Intern.*, 35: 357-365 (2002).
29. Badami, S., Gupta, M.K. and Suresh, B., “Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*”, *J. Ethnopharmacol.*, 85, 227-230 (2003).
30. Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Saravanan, S., Kumar, M.S., Muruges, K. and Kumar, K., “Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. Stem bark”, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 1015-1024 (2005).
31. Gren, L.C., Wagner, D.A., Giogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.K. and Tannenbaum, S. R., “Analysis of nitrate, nitrite and 15N nitrate in biological fluids”, *Anal. Biochem.*, 126: 131-138 (1982).
32. Oyaizu, M., “Studies of products browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine”, *Jpn. J. Nut.*, 44: 307-315 (1986).
33. Slinkard, K. and Singleton, V.L., “Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 28: 49-55 (1977).
34. Shahidi, F. and Naczk, M., Food Phenolics: Sources; Chemistry; Effects; Applications, Technomic Publishing Inc. ISBN 1-56676-279-0 Lancaster, PA pp. 235–277 (1995)
35. Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C., “Antioxidant activity of water extract of harn jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)”, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 32: 269-277 (1999).

36. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.", *Methods. Enzymol.*, 186: 1-85 (1990) Review.
37. Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E. and Etherton, T.D., "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer", *Am. J. Med.*, 30;113 Suppl 9B:71S-88S (2002) Review.
38. Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Oktay, M. ve Büyükokuroğlu, M.E., "Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.)", *J. Ethnopharmacol.*, 60: 205-215 (2004).
39. Rajeshwar, Y., Kumar, G. P. S., Gupta, M. and Mazumder, U.K., "Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds", *European Bulletin of Drug Research*, 13: 31-39 (2005).
40. Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., "Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. Subsp. *Pallsiana* (Lamb.) Holmboe", *J. Ethnopharmacol.*, 86: 51–58 (2003).
41. Erdemoglu, N., Turan, N.N., Cakıcı, I., Sener, B. and Aydın, A., "Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts", *Phytother. Res.*, 20: 9–13 (2006).
42. Sotelo-Felix, J. I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, D. and Yahuaca, P., "Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat", *J. Ethnopharmacol.*, 81(2):145-54 (2002).
43. Pavela, R., "Insecticidal activity of certain medicinal plants", *Fitoterapia*, 75(7-8): 745-9 (Dec. 2004).

44. Szöllösi, R. and Varga, I.S., “Total antioxidant power in some species of Labiatae (adaption of FRAP method)”, *Acta Biol. Szeged.*, 46: 125-127 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kars'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. 2000 yılında girdiği Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.

