

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI *ASTERACEAE* TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN
ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ**

Şüheda KOÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

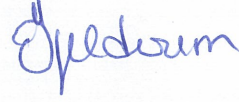
**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Şüheda KOÇ tarafından hazırlanan “**Bazı Asteraceae Türlerinden Elde Edilen Ekstrelerin Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkileri**” adlı tez çalışması 09.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM



Eş Danışman : Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Fatmagül GEVEN

Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI *ASTERACEAE* TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİ

Şüheda KOÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Eş Danışman: Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Tıbbi bitkiler; alkaloidler, polifenoller ve uçucu yağlar gibi ikincil metabolit bileşikleri içeriklerinden dolayı, günümüzde sentetik ve kimyasal ilâçlar için uygun alternatifler olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, Kastamonu yöresinden toplanan *Asteraceae* ailesine ait bazı bitki türlerinin çiçek, yaprak ve gövdelerinin [*Onopordum acanthium* L., *Carduus acanthoides* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Centaurea solstitialis* L.] aseton, etanol ve metanol özütlerinin antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerinin yanısıra, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriklerini belirlemektir. Türlerin serbest radikal giderici aktivite tayinleri DPPH metodu ile, toplam fenolik ve flavonoid madde miktar tayinleri Folin–Ciocalteu ve Alüminyum Klorür Kolorimetrik metoduyla yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini ise Disk Difüzyon yöntemi ile 5 farklı mikroorganizma (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Candida albicans* ATCC-10231) kullanılarak yapılmıştır. DPPH yönteminden elde edilen sonuçlara göre, *C. arvense* yaprağının metanol özütü 366,5 ng/mL IC₅₀ değeri ile en yüksek radikal giderici etkiyi göstermiştir. Toplam fenolik bileşik bakımından 67,024-90,305 mg/L değerleri ile bu tezde çalışılan diğer tüm bitki kısımlarının tüm özütleri içinde *C. acanthoides*'in çiçek özütleri bakımından en zengin bitki olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 82,562-185,437 mg/L aralığında gösterdiği flavonoid içeriği bakımından da en zengin bitki olduğu gösterilmiştir. Disk Difüzyon yönteminden elde edilen sonuçlara göre, *O. acanthium* yaprağından hazırlanan etanol özütü *B. subtilis* üremesini yüksek düzeyde inhibe etmiştir. Ayrıca, *C. solstitialis* yaprağından izole edilen etanol özütü *B. subtilis* üremesini yüksek oranda inhibe etmiştir. Ancak, *C. albicans* suşuna karşı hiç bir bitki özütü etkili olamamış, inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

Temmuz 2013, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler : Antioksidan aktivite, antimikrobiyal etki, *Asteraceae*, disk difüzyon testi

ABSTRACT

MSc. Thesis

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF EXTRACTS FROM SOME ASTERACEAE SPECIES

Şüheda KOÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Co Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ergin Murat ALTUNER

Today, medicinal plants have been identified as suitable alternatives to synthetic and chemical drugs, since contain secondary metabolites such as polyphenolic compounds, alkaloids and essential oils. The aim of this study was to investigate the antioxidant, antimicrobial activities and total phenolic and flavonoid contents of methanol, ethanol and acetone extracts from flowers, leaves and stems of four *Asteraceae* family species [*Carduus acanthoides* (L.) Scop., *Centaurea solstitialis* L., *Cirsium arvense* L., *Onopordum acanthium* L.], which were collected from Kastamonu region. Free radical scavenging activities and total phenolic and flavonoid contents of the plant samples were assayed by DPPH, Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride Colorimetric methods. The antimicrobial activity was determined by the Disc Diffusion method against five microbial species (*Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Bacillus subtilis* ATCC-6633, *Escherichia coli* ATCC-25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Candida albicans* ATCC-10231). According to the results of DPPH radical scavenging assay, the methanol extract of *C. arvense* leaves showed the strongest antioxidant activity with $IC_{50}=366,5$ ng/mL value. With 67,024-90,305 mg/L of total phenolic compounds, the flower extracts of *C. acanthoides* is found to be the richest in terms of total phenolic compounds among other plant extracts studied in this thesis. Similarly, with 82,562-185,437 mg/L of flavonoid content, it is also demonstrated as the richest in terms of flavonoid contents. According to the results of the disk diffusion method, ethanol extract of *O. acanthium* leaves highly inhibited the growth of *B. subtilis*. Also, the ethanol extract of *C. solstitialis* leaves was found to inhibit the growth of *B. Subtilis* significantly. However, none of the extracts show any inhibition activity against *C. albicans*.

July 2013, 63 pages

Key Words : Antioxidant activity, antimicrobial effects, *Asteraceae*, disc diffusion assay

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca bana araştırma olanağı sağlayan, yardımlarını, bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen, fikirleriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı) en içten saygı ve şükranlarımı sunarım. Şen kahkahalarınız hiç eksik olmasın sayın hocam...

Çalışılan bitkilerin toplanmasında ve antimikrobiyal aktivite analizleri sırasında yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, dinamik ve ılıman tavrıyla kilometrelerce öteden de olsa sorularıma usanmadan yanıt veren eş danışman hocam sayın Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER (Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı)'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında özütleme ve antioksidan aktivite tayini aşamalarında laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açarak, tüm alçak gönüllülüğü ve özverisiyle, pozitif enerjisi, tecrübeleriyle, bana kattığı laboratuvar disipliniyle hep destek olan sayın Yrd. Doç. Dr. Sultan Belgin İŞGÖR (Atılım Üniversitesi, Kimya Mühendisliği ve Uygulamalı Kimya Bölümü) hocama teşekkürü bir borç bilirim. Antioksidan çalışmalarım sırasında gönülden desteği, özverisi, sabrı, eşsiz deney tecrübeleri ve laboratuvar disipliniyle beni geliştiren, pratik fikirlerin azizesi sayın Doç. Dr. Yasemin Gülgün İŞGÖR (Ankara Üniversitesi, SHMY) hocama da en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yine antimikrobiyal aktivite analizleri sırasında laboratuvarının kapısını açan değerli hocam Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e ve ekibine, çalışmam sırasında kullanılan mikroorganizmaları edinmemizi sağlayan A.Ü.E.F. Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof. Dr. Nurten ALTANLAR'a, çalıştığım bitkilerin toplanmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Talip ÇETER (Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve bitkilerin teşhisini yapan Yrd. Doç. Dr. Kerim GÜNEY (Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm tez çalışmam boyunca yardımını, emeğini esirgemeyen, yaptığı işe gönlünü koyan, çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, aynı kültürden, milletten, ırktan olmaktan çok öte değerlerin varlığını defalarca bana gösteren sevgili arkadaşım Yüksek Biyolog Naznoosh SHOMALİ MOGHADDAM'a içtenlikle teşekkür ediyorum. Dayanışma içerisinde, eğlenmeyi de bilen, çalışmaya uygun huzurlu bir laboratuvar ortamı yaratan tüm laboratuvar arkadaşlarıma bu huzur ve güven ortamı için teşekkür ediyorum.

Doğduğum günden beri hayatta kendime bir yer açıp kendi ayaklarımın üzerinde ilerleyebilmem ve her insanın özünde tek amacı olan mutlu bir yaşama benim de sahip olmam için maddi ve manevi her türlü fedakarlığı gösterip destek olan, insanlığa faydalı bir birey olmam için yetiştiren değerli annem-babam Fikriye ve Hüseyin KOÇ'a, ablalarım Şelale AKKAYA, Şule KOÇ ve abim Çağlar KOÇ'a sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum. İyi ki ailem sizlersiniz...

Şüheda KOÇ
Ankara, Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Tez Çalışması Kapsamında İncelenen <i>Onopordum acanthium</i> L., <i>Carduus acanthoides</i> L., <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. ve <i>Centaurea</i> <i>solstitialis</i> L. Türlerinin Sistematiği ve Biyolojik Özellikleri.....	5
2.1.1 <i>Onopordum acanthium</i> L.	5
2.1.2 <i>Carduus acanthoides</i> L.	7
2.1.3 <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	8
2.1.4 <i>Centaurea solstitialis</i> L.	10
2.2 Bitkilerin İkincil Metabolitleri.....	12
2.2.2 Fenolik bileşikler	13
2.3 Serbest Radikaller	16
2.4 Antioksidanlar	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1 Materyaller	20
3.1.1 Bitki örnekleri	20
3.1.2 Kullanılan kimyasal ve cihazlar.....	20
3.2 Yöntem	22
3.2.1 Çalışılan bitkilerin toplanması ve teşhisi	22
3.2.2 Çalışılan bitkilerin özütleme işlemi	20
3.2.3 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	23
3.2.4 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi.....	23
3.2.5 Antioksidan aktivite analizi.....	24
3.2.6 Antimikrobiyal aktivite analizi	25
3.2.6.1 Mikroorganizmaların üremesi için besiyerlerinin hazırlanması.....	26

3.2.6.1.1 Kùltürlerinin hazırlanması	26
3.2.6.1.2 Bitki özütlerin disklere emdirilmesi	26
3.2.6.1.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi	24
3.2.6.1.4 Mikroorganizmaların besiyerine inokùlasyonu ve disklerin yerleştirilmesi	27
3.2.6.1.5 İnhibisyon zonların ölçümü.....	28
3.2.6.1.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontroller	29
4. BULGULAR	30
4.1 Toplam Fenolik Madde Tayini	30
4.2 Toplam Flavonoid Tayini	31
4.3 Antioksidan Aktivite Testleri	32
4.4 Antimikrobiyal Aktivite Testleri	36
5. TARTIŞMA SONUÇ	43
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ.....	63

SİMGELER DİZİNİ

ABTS	2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit)
AlCl ₃	Alüminyum klorür
Amp	Ampisilin
ATCC	American Type Culture Collection
BaCl ₂	Baryum klorür
BHT	Butil Hidroksi Toluen
ClO ⁻	Hipoklorit anyonu
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat
°C	Celsius derece
dH ₂ O	Distile Su
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOH	Etanol
GA	Gallik asit
Gent	Gentamisin
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
HOCl	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRO ₂	Hidroperoksil radikali
IC ₅₀	Inhibitory Concentration
Kana	Kanamisin
KCl	Potasyum klorür
Lin	Linkomisin
MEA	Malt Extract Agar
MEB	Malt Extract Broth
MeOH	Metanol
Mero	Meropenem
MIC	Minimum Inhibition Consantration
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mm	Milimetre
NA	Nurient Agar
NaCl	Sodyum klorür
NB	Nutrient Broth
NO ⁻	Nitrikoksit
NO ₂ ⁻	Nitrojen dioksit
OD	Optical Density
Oflo	Ofloksazin
OH	Hidroksil
ONOO ⁻	Peroksinitrit
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
RNT	Reaktif Nitrojen Türevleri
RO ₂	Peroksil radikali

RONOO	Alkil peroksinirat
ROT	Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
Seft	Seftazidim
Strep	Streptomisin
Tetra	Tetrasiklin
vb.	Ve benzeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Onopordum acanthium</i> L.	6
Şekil 2.2 <i>Onopordum acanthium</i> L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları	7
Şekil 2.3 <i>Carduus acanthoides</i> L.	8
Şekil 2.4 <i>Carduus acanthoides</i> L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları	8
Şekil 2.5 <i>Cirsium arvense</i> L.	9
Şekil 2.6 <i>Cirsium arvense</i> L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları	10
Şekil 2.7 <i>Centaurea solstitialis</i> L.	11
Şekil 2.8 <i>Centaurea solstitialis</i> L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları	12
Şekil 2.9 Fenolik asitler, yapısal özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır	14
Şekil 2.10 Flavonoidler iskelet yapılarının farklılık gösterir	15
Şekil 2.11 Flavonollere bazı örnekler	16
Şekil 3.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü ve DPPH’in gallik asitle indirgenme basamakları	24
Şekil 3.2 Disklerin ekim yapılmış besiyerlerine yerleştirilmesi	28
Şekil 3.3 İnhibisyon zonları ve mm cinsinden ölçülmesi	28
Şekil 4.1 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart eğrisi grafiği	30
Şekil 4.2 Toplam flavonoid tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği	31
Şekil 4.3 Gallik asit, askorbik asit ve kuersetin kalibrasyon eğrisi grafiği	33
Şekil 4.4 Tüm bitki örneklerinin DPPH giderici etkisini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon bar grafiği	34
Şekil 4.5 Tüm bitkilerin çiçek kısımlarının 3. doz olarak belirlenen konsantrasyonlarının konsantrasyon-% inhibisyon ön tarama bar grafiği	35
Şekil 4.6 Yüksek inhibisyona göre seçilen bitki örnekleriyle tekrar edilmiş DPPH testinde, %50 inhibisyonun (IC ₅₀) belirlendiği grafik	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bitki örneklerinin etiket isimleri listesi.....	20
Çizelge 3.2 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi	29
Çizelge 4.1 Gallik asit konsantrasyonları ve absorbands değerleri.....	30
Çizelge 4.2 Tüm bitki örneklerinin özütlendikleri çözgenlere göre içerdikleri toplam fenolik bileşik miktarları (mg/L)	31
Çizelge 4.3 Kuersetin konsantrasyonları ve absorbands değerleri.....	32
Çizelge 4.4 Tüm bitki örneklerinin özütlendikleri çözgenlere göre içerdikleri toplam flavonoid miktarları (mg/mL)	32
Çizelge 4.5 <i>Onopordum acanthium</i> L.'un çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)	38
Çizelge 4.6 <i>Carduus acanthoides</i> L.'in çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)	39
Çizelge 4.7 <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.'nin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)	40
Çizelge 4.8 <i>Centaurea solstitialis</i> L.'in çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)	41
Çizelge 4.9 Pozitif kontrol olarak seçilen antibiyotik disklerin inhibisyon zonları (mm).....	42

1. GİRİŞ

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

Bitkiler, antik çağlardan günümüze kadar çeşitli şekillerde hastalıklara karşı kullanılmıştır. Modern ilâçların % 50'den fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun günümüzde etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Örneğin gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık gereksinimi için öncelikle geleneksel tıbbi bitkilere başvurmaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünüldüğünde, toplam dünya nüfusunun % 64'ünün bitkilere tedavi amaçlı başvurdukları anlaşılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise reçete ile satılan ilâçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Principe 1991, Babaoğlu vd. 2002). Dünya genelinde diğer alternatif tıbbi tedaviler kadar, bitki ekstraktlarının kullanımı 1990'ların sonlarında, artış göstermeye başlamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bitkisel ilâç satışı sadece 1995'ten 1996'ya kadar olan bir süreçte % 37 artmıştır (Cowan 1999). Avrupa Birliği üye ülkelerindeki bazı araştırma sonuçlarına göre ise yaklaşık olarak 1400 adet bitkisel preparatın özellikle Almanya, Fransa, Belçika ve Hollanda'da temel sağlık hizmetlerinde kullanıldığı bildirilmiştir (Hoareau ve Da Silva 1999).

1940'larda antibiyotiklerin ortaya çıkışından sonra bitkisel ekstraktların antibiyotik olarak kullanımında düşüş gözlenmiştir (Cowan 1999). Oysa tıp otoriteleri, antibiyotiklerin infeksiyon hastalıklarını tamamen bitireceğine inanmaktaydı. Ancak antibiyotik kullanımı dünya genelinde arttıkça, bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdikleri direnç de tüm dünyada artış göstermeye başlamıştır. Direnç mekanizmaları göz önüne alınarak geliştirilen her yeni ilâca karşı bakteriler de kısa sürede direnç kazanmayı başarmaktadır. Antimikrobiyallere karşı direnç kazanan bazı mikroorganizma türleri şunlardır: *E. coli*, *Proteus sp.*, *P. aeruginosa*, *Shigella*

dysenteriae, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *C. albicans* (Barbour vd. 2004).

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde antimikrobiyal maddelerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, dirençli suşların lehine bir seleksiyon oluşturmuştur (Akalin 1994). Antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların çoklu direnç geliştirmesi ve bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisindeki başarısızlıklar, alternatif yeni antimikrobiyal kaynak arayışına neden olmuştur. Antibiyotiklerin kullanımı ile ilgili problemlerin ortaya çıkmasının sonucu olarak, antimikrobiyal özelliklere sahip bitkilere olan ilgi yeniden canlanmaktadır (Emor ve Gaynes 1993, Pannuti ve Grinbaum 1995). Baytop'a (1999) göre; tıbbi bitkilere olan ilginin bu denli artmasının başlıca sebepleri özetle şunlardır,

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

Tüm bu gibi sebeplerden dolayı bilim adamları son yıllarda bitki türlerinden izole edilen ve patojenik mikroorganizmaları yok etme özelliğine sahip, biyolojik yönden aktif bileşenlerle ilgilenmektedirler.

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında bulunan ve ikincil metabolit olarak adlandırılan kimyasallardan kaynaklanmaktadır (Philipson 1990). *In vitro* koşullarda yapılmış pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin ve bu özütlerden saflaştırılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Pacheco vd. 1993, Ratnakar ve Murthy 1995, Saxena ve Sharma 1999, Djipa vd. 2000, Loy vd. 2001, Medeiros vd. 2003, Okeke vd. 2001, Rios ve Recio 2005, Canales vd. 2007, Sibanda ve Okoh 2007).

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra antioksidan özellikleri ile de ilgilenilmektedir. Oksidatif metabolizma sonucunda, hücrede serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Serbest radikaller reaktif oksijen türevleridir ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein ve karbonhidratların oksidasyonuna yol açacak hücresel yaşlanma, kanser ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedirler. Bununla birlikte hücreler reaktif oksijen türlerini ortadan kaldıracak çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Ancak bu savunma mekanizmaları yetersiz kaldığı zamanlarda; oksidatif stres canlı bünyesinde kanser, inflamasyon, romatoid artrit gibi çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabilmektedir (Mantle vd. 1998, Eryılmaz 2001).

Günümüzde besin endüstrisinde ticari olarak kullanılan çeşitli sentetik antioksidan maddeler mevcuttur. Ancak bu sentetik antioksidanların olumsuz sağlık sorunlarını tetikleyeceğine dair bir takım bilgiler bulunmaktadır (Koleva vd. 2002). Sentetik antioksidanların sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı kullanımlarının azaltılmasına yönelik eğilim, doğal maddelerin antioksidan özelliklerinin araştırılmasına yönelik *in vitro* çalışmaların artmasına ve bu bakımdan bitkilerin odak noktası olmasına neden olmuştur (Özcan 1999, Eryılmaz 2001, Exarchou vd. 2002, Dorman vd. 2003, Dorman ve Hiltunen 2004, Miliauskas vd. 2004, Sarıçoban ve Özcan 2004, Sahin vd. 2004, Tepe vd. 2004, 2005, 2006, 2007, Capecka vd. 2005, Kosar vd. 2005, Skerget vd. 2005, Erdemoğlu vd. 2006, Harput vd. 2006, Eminağaoğlu vd. 2007).

Bugün, Türkiye florasında tanımlanmış tohumlu bitki türü sayısı günümüzde Avrupa'daki 12500 tür sayısına yakın ve 10000 civarındadır. Tür ve tür altı takson sayısı ise 12000'e ulaşmıştır (Özhatay vd. 2009, Atik vd. 2010). Türkiye sahip olduğu türlerin %34'ü (3925) endemiktir (Atik vd. 2010). Bu bitkilerin yaklaşık 1000 türü ilaç ve baharat olarak kullanılmaktadır, halbuki bir çoğunun tıbbi özellikleri keşfedilmemiştir. Türkiye'de tıbbi bitkiler, çoğunlukla; *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Resedaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Zygophyllaceae*, *Brassicaceae*, *Rosaceae* ve *Euphorbiaceae* ailelerinde yer almaktadır (Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010, Çakılcıoğlu vd. 2011).

Bu bilgiler doğrultusunda planladığımız çalışmada, *Asteraceae* familyasına ait dört farklı türün çiçek, yaprak ve gövde kısımlarından 3 farklı çözgenle elde edilen özütlerinin Disk Difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerine genel bir bakış sağlanması, fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu, flavonoid içerikleri Alimünyum Klorür Kolorimetrik Yöntemi ile belirlenmesi, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemi ile de toplam antioksidan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tez Çalışması Kapsamında İncelenen *Onopordum acanthium* L., *Carduus acanthoides* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop. ve *Centaurea solstitialis* L. Türlerinin Sistematik ve Biyolojik Özellikleri

Asteraceae (*Compositae*) familyası, yaklaşık 1100 cins ve 20.000 türle, dünyada en fazla türü olan familyadır. *Asteraceae* familyasının Türkiye’de doğal olarak yetişen 130 cins ve 1130 türü bulunmaktadır (Grierson 1975). Dünyada ve Anadolu’da geniş yayılım gösteren *Asteraceae* familyasına ait birçok türün farmakolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu familyadaki bitkiler, diterpenler ve flavonoidlerin yanısıra ağırlıklı olarak antibakteriyal, antifungal, antihelmintik, antienflamatuar, insektisit, antitümör gibi pekçok biyolojik aktiviteye sahip seskiterpen laktonlar içerirler (Picman 1986, Shing vd. 2002, Ertürk 2003).

Tez çalışmamda *Asteraceae* (*Compositae*) familyasının bu özellikleri göz önüne alınarak seçilmiş *Onopordum acanthium* L., *Carduus acanthoides* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop. ve *Centaurea solstitialis* L. bitkileri çalışılmıştır.

2.1.1 *Onopordum acanthium* L.

Onopordum acanthium L., *Asteraceae* familyasına ve *Onopordum* cinsine ait olan ve iki yıllık otsu bir bitki türüdür (Şekil 2.1). Halk arasında Galagan ya da Kalagan (Erciş-Van) olarak tanınan *O. acanthium* L.’un; kayalık yamaç, çağılık, temizlenmiş orman, yolkenarı ve tarlalar (yaramaz ot) doğal habitatıdır. Genel olarak Orta Asya, Batı Avrupa, Kuzey Amerika’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise Doğu Anadolu, Kuzey Anadolu, Güney Batı Anadolu’da bulunmaktadır (www.turkherb.ibu.edu.tr).

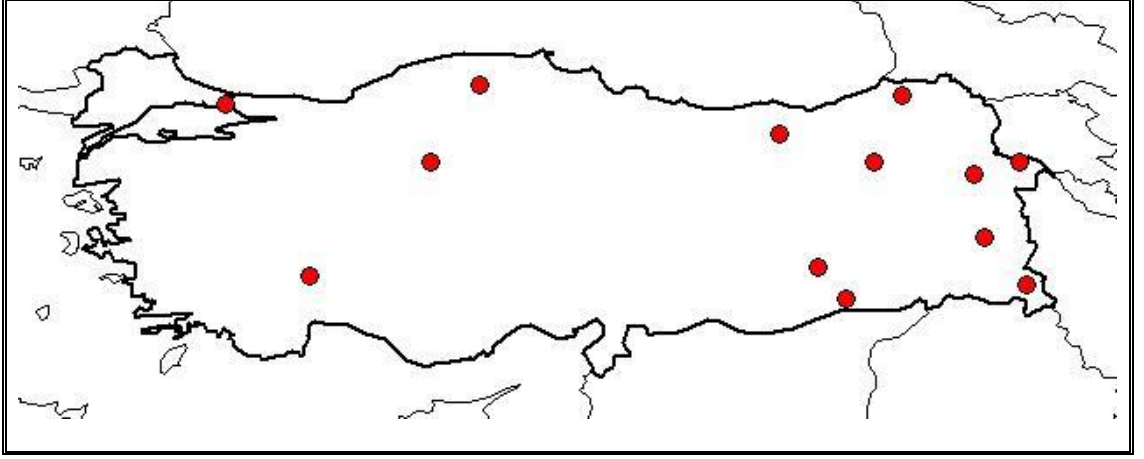
Onopordum cinsine ait bazı bitkiler halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. *O. acanthium*’un çiçekli dalları diüretik, antipiretik olarak, kökleri ise yine diüretik, antipiretik, karın ağrısı giderici ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999,

Uğur vd. 2011). Birkaç türünün de antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir (Barbour 2004, Montoro 2005).



Şekil 2.1 *Onopordum acanthium* L. (<http://turkherb.ibu.edu.tr>)

Kingdom:	Plantae
Subkingdom:	Tracheobionta
Division:	Magnoliophyta
Class:	Magnoliopsida
Subclass :	Asteridae
Order:	Asterales
Family:	Asteraceae
Genus:	<i>Onopordum</i>
Species:	<i>Onopordum acanthium</i> L.



Şekil 2.2 *Onopordum acanthium* L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları; İstanbul, Iğdır, Hakkari, Mardin, Kastamonu, Ağrı, Ankara, Artvin, Diyarbakır, Erzurum, Gümüşhane, Isparta, Van (<http://turkherb.ibu.edu.tr>)

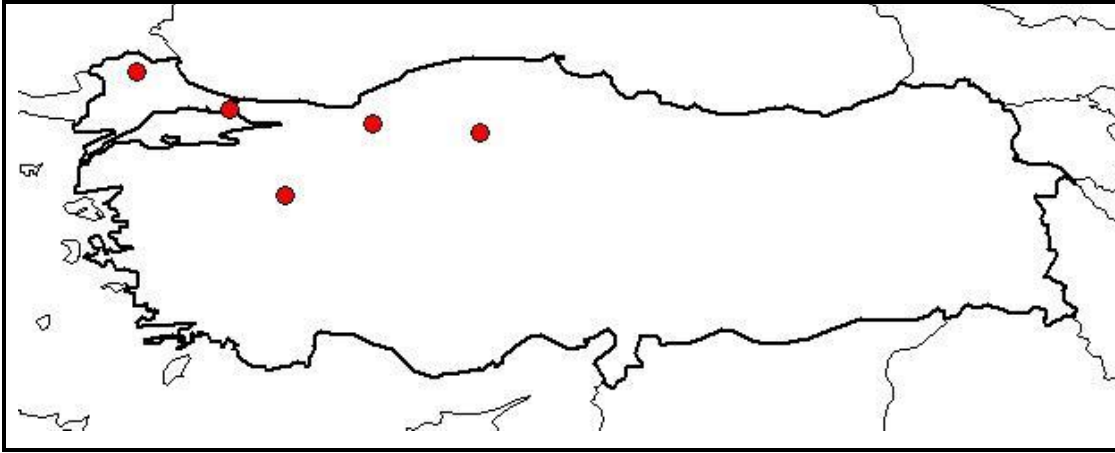
2.1.2 *Carduus acanthoides* L.

Carduus acanthoides L., *Asteraceae* familyasına ve *Carduus* cinsine ait olan iki yıllık otsu bir bitki türüdür (Şekil 2.3). Halk arasında eşek dikenini olarak tanınan *C. acanthoides* L. ; tarla kenarı, yolkenarı, killi alan ve çakıllık alanlar doğal habitatıdır. Genel olarak Avrupa’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise Kuzey Batı Anadolu ve Orta Anadolu çevresinde dağılım göstermektedir. (www.turkherb.ibu.edu.tr)

Kingdom:	Plantae
Subkingdom:	Tracheobionta
Division:	Magnoliophyta
Class:	Magnoliopsida
Subclass :	Asteridae
Order:	Asterales
Family:	Asteraceae
Genus:	<i>Carduus</i>
Species:	<i>Carduus acanthoides</i> L.



Şekil 2.3 *Carduus acanthoides* L. (www.turkherb.ibu.edu.tr)
(www.dnr.stat.ilus/stewardship)



Şekil 2.4 *Carduus acanthoides* L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları; İstanbul, Bolu, Çankırı, Kırklareli, Kütahya (www.turkherb.ibu.edu.tr)

2.1.3 *Cirsium arvense* (L.) Scop.

Cirsium arvense (L.) Scop., *Asteraceae* familyasına ve *Cirsium* cinsine ait olan, çok yıllık otsu bir bitki türüdür (Şekil 2.5). Halk arasında köy göçerten (<http://tr.wikipedia.org>) olarak tanınan *C. arvense*; yolkenarları, dere kıyıları, hendekler, otlaklar, ekili alanlar, buğday ve mısır tarlaları ve çay ekim alanlarında doğal habitatıdır. Genel olarak Avrupa, Kafkasya, İran, Afganistan, Kuzey Asya, Kuzey

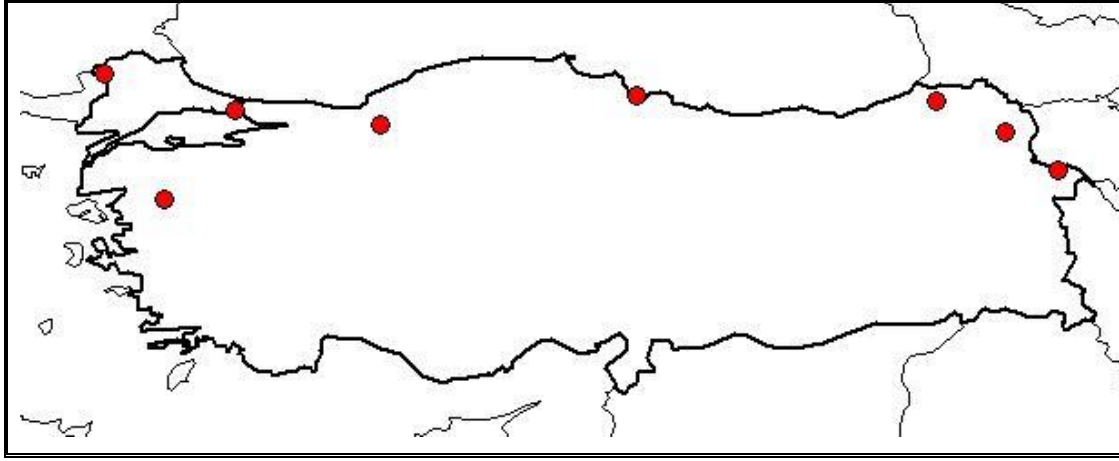
Amerika’da dağılım göstermektedir. Türkiye’nin ise kuzeyinde, kuzey batısında ve Doğu Anadolu’da bulunmaktadır (Şekil 2.6) (www.turkherb.ibu.edu.tr).

C. arvense bitkisi Polonya’da halk arasında diüretik, hemostatik, anti-inflamatuvar ve kanamaları durdurucu tıbbi bir bitki olarak kullanılmaktadır (Ozorawski ve Jaroniewski 1989, Nazaruk 2008). Dünya’nın bazı kesimlerinde de *C. arvense* yapraklarının suyunun, yaralara bölgesel olarak uygulanarak iyileştirici etkilerinin olduğu bilinmektedir (Raven ve Edwards 2001, Zouhar 2001, Khan 2011).

Kingdom:	Plantae
Subkingdom:	Tracheobionta
Division:	Magnoliophyta
Class :	Magnoliopsida
Subclass :	Asteridae
Order :	Asterales
Family :	Asteraceae
Genus :	Cirsium
Species :	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.



Şekil 2.5 *Cirsium arvense* (L.) Scop. (www.discoverlife.org, www.commanster.eu)



Şekil 2.6 *Cirsium arvense* (L.) Scop. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları: Bolu, İstanbul, Iğdır, Kars, Artvin, Edirne, Giresun, Samsun (www.turkherb.ibu.edu.tr)

2.1.4 *Centaurea solstitialis* L.

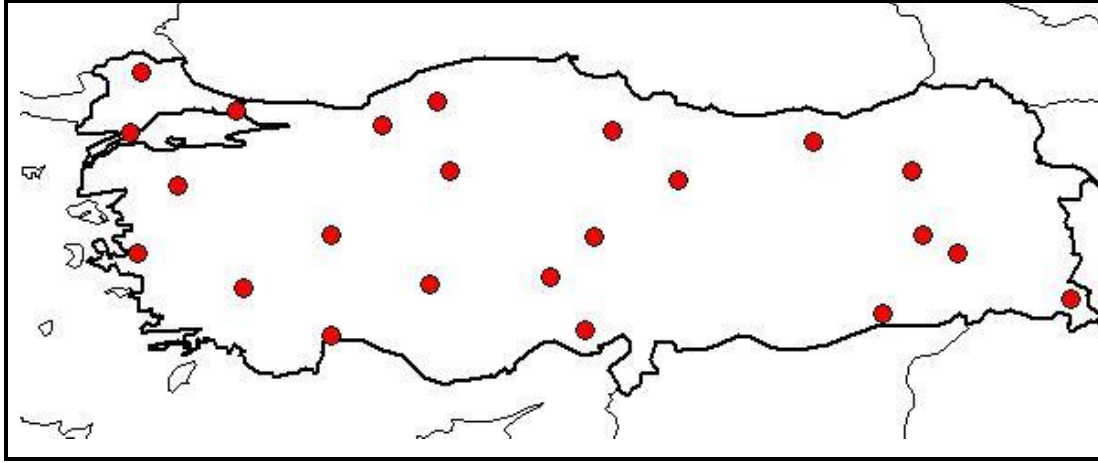
Centaurea solstitialis L., *Asteraceae* familyasına ve *Centaurea* cinsine ait olan, tek yıllık otsu bir bitki türüdür (Şekil 2.7). Halk arasında Sarı Peygamber Dikeni ya da Zerdali dikeni olarak tanınan *C. solstitialis*; çam ormanları, kurak yamaçlar, nadas tarlaları ve boş alanlarda yetişmektedir. Genel olarak Güney Avrupa, Güney Rusya, Kırım, Kafkasya, Lübnan, İran, Amerika, Batı ve Orta Avrupa’da dağılım göstermektedir. Türkiye’de ise genel bir yayılıma sahiptir (www.turkherb.ibu.edu.tr) (Şekil 2). *Centaurea* cinsinde yer alan bazı bitki türleri de halk arasında Peygamber Çiçeği, Çoban Kaldıran, Acı Süpürge ve Timur Dikeni gibi isimler ile tanınmaktadır (Arif vd. 2004, Çakılcıoğlu ve Türkoğlu 2010, Çakılcıoğlu vd. 2011).

Centaurea cinsinin bazı türlerinin toprak üstü kısımları dünya çapında geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Antidiyabetik, antidiyaretik, antiromatizmal, anti-inflamatuvar, antipiretik, analjezik, safra söktürücü, sindirime yardımcı, karın ağrısı giderici, diüretik, spazm giderici, kanama durdurucu, sitotoksik, düşük tansiyon rahatsızlığı ve antibakteriyal olarak kullanımlarının olduğu bilinmektedir (Kaij-A-Kamb vd. 1992, Farrag vd. 1993, Barrero vd. 1997, Orallo vd. 1998, Akkol vd. 2009, Koca vd. 2009)

Kingdom: Plantae
Subkingdom: Tracheobionta
Division: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Subclass: Asteridae
Order: Asterales
Family: Asteraceae
Genus: Centaurea
Species: *Centaurea solstitialis* L.



Şekil 2.7 *Centaurea solstitialis* L. (<http://swbiodiversity.org>)



Şekil 2.8 *Centaurea solstitialis* L. bitkisinin Türkiye’deki yayılış alanları: Adana, Bolu, İstanbul, Hakkari, Mardin, Karabük, Bitlis, Afyonkarahisar, Amasya, Ankara, Antalya, Balıkesir, Denizli, Erzurum, Gümüşhane, İzmir, Kayseri, Kırklareli, Kocaeli, Konya, Muş, Niğde, Sivas (www.turkherb.ibu.edu.tr) Asteraceae

familyasında bulunan bitkilerin birçoğu tıbbi ve biyolojik aktiviteye sahiptirler. *Centaurea* cinsinde yer alan birçok bitki türünün yıllardan beri geleneksel tıpta çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanımı belgelenmiştir. Bu cinste yer alan bir çok bitki türü halk arasında antidiyabetik, antidiyaretik, antiromatizmal, antienflamatuvar, diüretik, adet söktürücü, hipotensif, sitotoksik ve antibakteriyal olarak kullanılmaktadır (Arif vd. 2004, Koca vd. 2009).

2.2 Bitkilerin İkincil Metabolitleri

Bitkiler, birincil metabolitlerinin aksine besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değer taşımayan ve bitki büyüme, gelişiminde doğrudan görev almayan organik maddeler üretmektedirler. Bu maddeler “ikincil metabolitler” olarak isimlendirilmekte ve ikincil metabolizma süreci sonucunda üretilmektedirler (Sökmen ve Gürel 2001).

İkincil metabolitler, bitki hücresinin yapısında bulunan ve canlılığın sağlanmasında temel göreve sahip karbonhidrat, lipid, protein ve nükleik asit gibi birincil metabolizma ürünlerinden farklılık göstermektedirler (Briskin 2000). İkincil metabolitler fitokimyasallar olarak da adlandırılmaktadır (Huang 2009). İlk keşfedildiklerinde bugün

ki kadar önemli oldukları düşünülmemiştir. İkincil metabolitler, kimyasal yapılarının ve çeşitliliğinin bilinmesine rağmen birçok botanikçi tarafından, bitkiler için önemsiz ve hatta atık metabolitler olarak kabul edilmekteydiler (Hartmann 1996).

Başta organik kimyacılar olmak üzere birçok branştan bilim insanı, 1850'lerden beri bu ürünlerin kimyasal özelliklerini araştırmış ve yeni fitokimyasal ürünleri günümüzde ayırıştırma tekniklerinin daha çok gelişmesi ile araştırmalarını ilerletmektedir. Bu çalışmalar sonucunda ikincil metabolitlerin bitki yapısındaki ekolojik işlevi de aydınlatılmaya başlanmış ve bu kimyasalların bitkinin çevresiyle olan etkileşiminde önemli rolleri olduğu saptanmıştır. Günümüzde ikincil metabolitlerin bitkiyi herbivor ve patojen saldırılarına karşı koruduğu, allelopatide aktif rol oynadığı ve palinatörleri cezbetmede önemli işlevlere sahip olduğu bilinmektedir (Babaoğlu 2002).

Organik kimya alanındaki gelişmelerle sanayide boya, zambak, tutkal, parfümeri, tatlandırıcı ve polimer alanlarında kullanılması, onları endüstriyel alanda da önemli kılmaktadır. İkincil metabolitler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda biyolojik etkilerinin aydınlatılmasıyla bu kimyasallar bugün herbisit, insektisit, ilaç ve alternatif antibiyotik ajan araştırmalarının konusunu oluşturmaktadır (Buchanan 2000). Bitkilerden elde edilen bu doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin araştırılması bu alanla ilgili pek çok çalışmaya ışık tutmaktadır. Etnofarmakolojik araştırmaların sonuçlarına göre, bitkilerden elde edilen özütlerin çeşitli biyolojik aktiviteler ile antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konmaktadır.

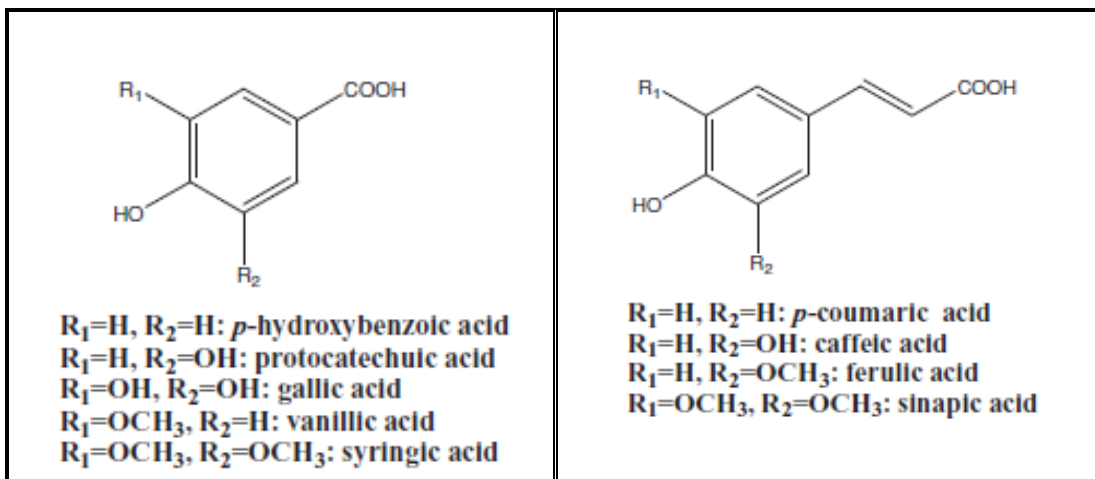
İkincil metabolitler; fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenoidler, uçucu yağlar, glikozitler ve polisakkaritler olarak sınıflandırılmışlardır (Lokova vd. 2001).

2.2.1 Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler bir ya da daha fazla aromatik halka içeren ve bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grup içeren bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde en fazla bulunan ikincil metabolitler olarak, genellikle bitkilerin meyve, yaprak, tohum, çiçek, kök ve

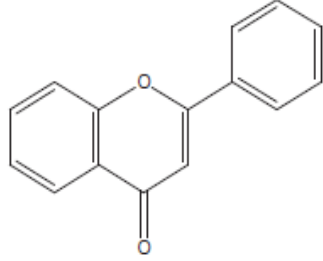
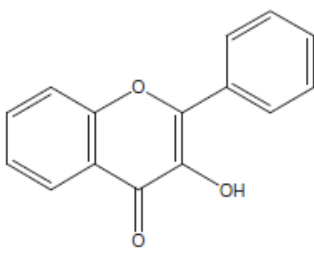
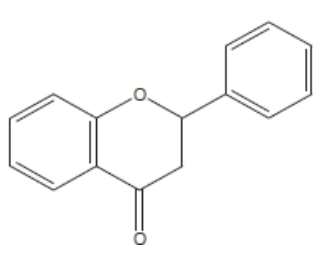
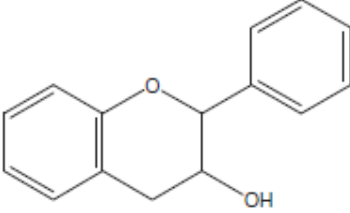
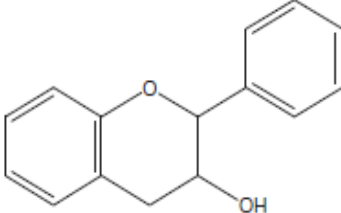
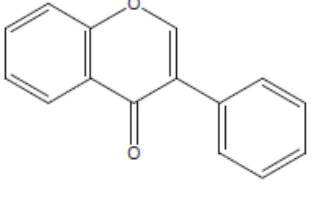
gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenmektedirler. Bugüne kadar 8.000'den fazla fenolik bileşik ve türevleri tanımlanmıştır. Bu bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, kumarinler, lignanlar, kuinonlar ve kurkuminoidler olarak sınıflandırılmaktadır (Fresco vd. 2006, Huang vd. 2009).

Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin en önemli üyesi olarak tanınıp, yapısal özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.9). Birinci grupta yer alan bileşiklerin kimyasal yapılarında hidroksi benzoik asit grubu bulunmaktadır. Gallik asit bu grubun önemli üyelerindendir (Şekil 2.9). Gallik asit tıbbi bitkilerin kimyasal yapılarında yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin, *Barringtonia racemosa*, *Cornus officinalis*, *Cassia auriculata*, *Polygonum aviculare*, *Punica granatum*, *Rheum officinale*, *Rhus chinensis*, *Sanguisorba officinalis* ve *Terminalia chebula*'da veya günlük diyetle kullanılan baharatlarda örneğin, karanfilde ve kekikte yüksek miktarda bulunmaktadır. İkinci grubun üyeleri ise, hidroksi sinamik asit grubunu içermektedirler (Şekil 2.9). Kafeik asit ve kumarik asit bu grubun önemli bileşiklerindendir. Bu bileşikler, genel olarak tıbbi bitkilerde, baharatlarda, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır (Cai vd. 2004, Huang vd. 2009). Kırmızı meyveler örneğin; yaban mersini, böğürtlen, çilek, ahududu, kiraz ve kuşüzümü yüksek miktarda kafeik asit ve kumarik asit bileşiklerini içermektedir (Jakobek vd. 2007, Huang vd. 2009).



Şekil 2.9 Fenolik asitler, yapısal özelliklerine göre iki gruba ayrılmaktadır

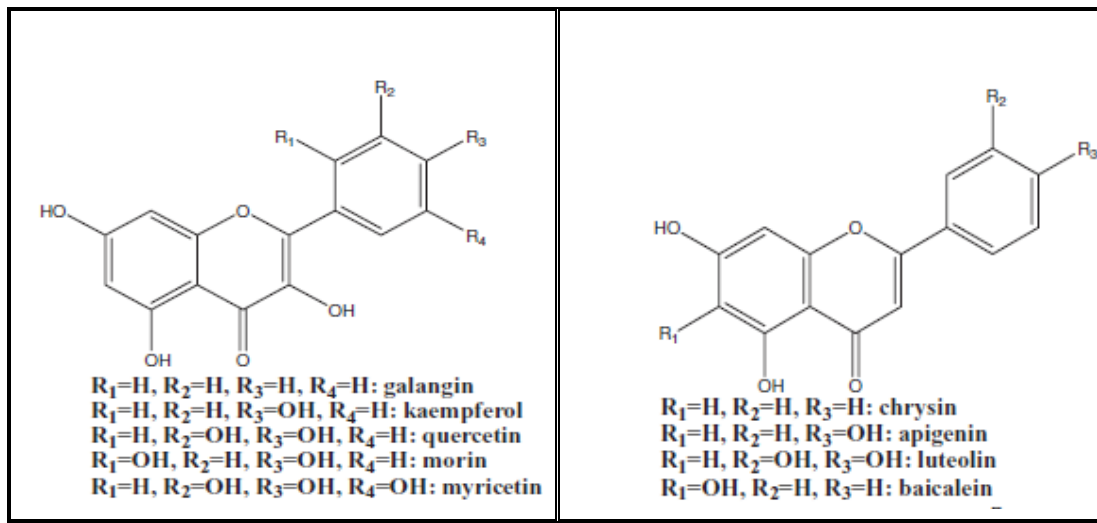
Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan, fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkilerde tat, koku ve renk gibi özelliklerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu bileşiklerin temel yapısı 2 tane aromatik fenil benzo piren halkasından oluşmaktadır. Bu aromatik halkalar 3 karbon içeren bir zincir ile birbirleriyle bağlantı kurmaktadır (Cai vd. 2004, Huang vd. 2009). Flavonoidler iskelet yapılarının farklı olmasından dolayı; flavonlara, flavononlara, flavanonollara, flavanollara, antosiyaninlere, izoflavonoidlere ve biflavonoidlere ayrılmaktadırlar (Cai vd. 2004, 2006, (Şekil 2.10 Huang vd. 2009).

		
Flavonlar	Flavonoller	Flavanonlar
		
Flavanonoller	Flavanoller	İzoflavonlar

Şekil 2.10 Flavonoidler iskelet yapılarının farklılık gösterir

Luteolin, apigenin, krisin flavonların en önemli bileşikleri olarak tanınıp, *Asteraceae* ve *Lamiaceae* familyasında yer alan bitkilerin yapılarında bulunmaktadır. Ayrıca flavonlar, maydonoz, kekik, kiraz, çay, zeytin ve brokolide bulunmaktadır (Ren vd. 2003, Fresco vd. 2006, Huang vd. 2009). Kuersetin, kaempferol, mirisetin, morin ve galangin flavonol grubunda yer almaktadır (Şekil 2.11). Flavonoller soğan, kiraz, elma, brokoli, lahana, patates, dut, çay, kırmızı şarap ve kimyonda bulunmaktadır. Ayrıca, flavonoller antikanser etki gösteren tıbbi bitkilerde örneğin; *Sophora japonica* ve *Rosa chinensis*'in

çiçeklerinde ve *Crataegus pinnatifida*'nın meyvesinde bulunmaktadır (Cai vd. 2004, Shan vd. 2005, Huang vd. 2009). Flavanonlara örnek naringenin ve hespertin verilmektedir. Flavanonlar genel olarak üzümde sentezlenmektedirler. Flavanollerin önemli üyelerinden kateçin ve epikateçin olup, çay, elma, dut ve kokada bulunmaktadır (Cai vd. 2004, Shan vd. 2005, Huang vd. 2009). Siyanidin, delfinidin ve malvidin antosiyaninlerin önemli bileşiklerinden olup, üzüm, dut, kırmızı lahana ve mısırdada sentezlenmektedir (Cai vd. 2004, 2006, Huang vd. 2009).



Şekil 2.11 Flavanollere bazı örnekler

Flavonoidler doğada genellikle serbest, glikozit ve bazen aglikonlar halinde bulunmaktadırlar (Hollman ve Katan 2000, Huang vd. 2009). Flavonoidler genellikle bir veya daha fazla şeker bileşiği ile –OH grubu veya karbon – karbon bağları ile bağlanıp, O – glikozitler ve C – glikozit bileşiklerini oluşturmaktadır (Cai vd. 2006, Fresco vd. 2006, Huang vd. 2009).

2.3 Serbest Radikaller

Atomlardaki elektronlar orbitaller olarak bilinen enerji seviyelerinde bulunmaktadır. Her bir orbital zıt yönde hareket eden 2 adet elektron tutabilir ve atom ancak bu şekilde

stabilitesini koruyabilmektedir. Ancak atom veya molekül dış yörüngesinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeriyorsa bu durumda radikal adını almaktadır. Yapısında bulunan çiftleşmemiş elektron veya elektronlar molekülün kimyasal aktivitesini değiştirmektedir. Bu serbest radikaller hücre harabiyetine neden olan etkenlerin başında yer almaktadır. Serbest radikaller bir dizi reaksiyon sonucunda aktif radikallere dönüşerek; doku hasarı, organ fonksiyonunun bozulması ve radikal hasarına bağlı hücre ölümlerine neden olabilmektedirler (Eryılmaz 2001, Halliwell vd. 1989).

Çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak hücrelerdeki lipit, protein, karbohidratlar, DNA, nükleotid koenzimler gibi biyolojik materyallerle reaksiyona girerek zincir reaksiyonlara yol açmaktadır. Bu reaksiyonlar, hücre bileşiklerin bozulmasına, hücre fonksiyon kaybına ve sonuçta da hastalıklara sebep olmaktadır (Diplock 1998, Koca ve Karadeniz 2003).

Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, sigara, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi bir çok etmen oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır.

Serbest radikaller iki ana gruba ayrılabilir;

1.ROT (Reaktif Oksijen Türevleri)

2.RNT (Reaktif Nitrojen Türevleri)

ROT grubu birçok radikal olan ve olmayan grubu içermektedir. Süperoksit anyonu (O_2^-), Hidroksil radikali (OH^-), peroksil radikali (RO_2^-), Hidroperoksil radikali (HRO_2^-), Hipoklorit anyonu (ClO^-) gibi radikaller ve Hidrojen peroksit (H_2O_2), Hipoklorik asit ($HOCl$) gibi radikal olmayan veya nötral bileşikler örnek olarak verilebilir. RNT grubuna ise Nitrikoksit (NO^-), Nitrojen dioksit (NO_2^-) gibi serbest radikaller ve Peroksinitrit ($ONOO^-$), alkil peroksinitrat ($RONOO$) gibi radikal olmayan moleküller örnek verilebilir (Maritim vd. 2003).

2.4 Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” denmektedir. Antioksidanlar ROT’ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiğı hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılmaktadır. Antioksidan moleküller eksojen ve endojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğı hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirmektedirler.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirmektedirler;

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek. Antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz, glutatyon redüktaz, S-transferaz, sitokrom oksidaz gibi) ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive ederek. Vitaminler (C ve E vitamini gibi), flavonoidler, polifenoller, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak ve inaktive ederek.
4. Onarma etkisi (Repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onararak (Halliwell 1995, Eryılmaz 2001, Gökpınar vd. 2006).

Oksidatif hastalıkların tedavisinde doğal antioksidanlar en önemli kaynak olarak gösterilmektedir (Halliwell vd. 1992).

Sentetik antioksidan maddelerin olumsuz etkilerinden dolayı doğal kaynaklı antioksidanlar ilgi odağı olmuştur. Bitkilerden izole edilen fenoller (flavonoid, tokoferol), azotlu bileşikler (alkaloid, aminoasit ve aminler), karotenoidler ve askorbik asit doğal kökenli antioksidanlar olarak kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanların kanser vb. gibi çeşitli hastalıkları tetikleyebileceğı şüphesinden dolayı, bitkiler alternatif antioksidan madde araştırmaları için önemli birer kaynak olmuştur (Velioğlu vd. 1998).

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar (Rice-Evans vd. 1997). En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler, sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller ve fenolik asitlerdir.

Fenolik doğal bileşenler, sahip oldukları radikal süpürücü etkileri nedeniyle potansiyel antioksidan maddeler olarak bilinmektedir. Bu nedenle flavonoidler gibi fenolik doğal bileşenler antioksidan aktivite açısından ilgi çekici fitokimyasallardır. Serbest radikal süpürücü etkiye sahip antioksidanlar özellikle kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma ve kanser hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Eryılmaz 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Bitki örnekleri

Bu tez kapsamında çalışılan bitki türleri *Onopordum acanthium* L., *Carduus acanthoides* L., *Cirsium arvense* (L.) Scop. ve *Centaurea solstitialis* L. olup, *Asteraceae* familyasına ait türlerdir. Haziran ve Temmuz aylarında Kastamonu'da 41° 25' 51.6252" N ve 33° 46' 37.6386" E lokasyonlarından toplanmıştır. Kurutma işleminden sonra bitki örnekleri etiketlenmiş ve uygun saklama kutularına alınmıştır. Çizelge 3.1'de bitki örneklerinin etiket isimleri verilmiştir.

Çizelge 3.1 Bitki örneklerinin etiket isimleri listesi

Bitkiler	Bitki Kısımları	Etiket İsimleri
<i>Onopordum acanthium</i> L.	Çiçek	ONA-C
	Yaprak	ONA-Y
	Gövde	ONA-G
<i>Carduus acanthoides</i> L.	Çiçek	CAA-C
	Yaprak	CAA-Y
	Gövde	CAA-G
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	Çiçek	CIA-C
	Yaprak	CIA-Y
	Gövde	CIA-G
<i>Centaurea solstitialis</i> L.	Çiçek	CES-C
	Yaprak	CES-Y
	Gövde	CES-G

3.1.2 Kullanılan kimyasal ve cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan; Malt Extract Agar (MEA) ve Nutrient Agar (NA) İğs firmasından, % 99'luk Aseton, Malt Extract Broth (MEB), Alüminyum klorür ($AlCl_3$), Bakır sülfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Baryum klorür ($BaCl_2$), % 99'luk Etanol (EtOH), Gallik

asit (GA), Nutrient Broth (NB), Potasyum klorür (KCl), Sodyum asetat, Sodyum klorür (NaCl) ve Sülfürik asit Merck firmasından, Dimetil sülfoksit (DMSO) ve % 99'luk metanol (MeOH) Riedel-de Haen firmasından, Folin-Ciocalteu reaktifi, Askorbik asit ve Kuersetin dihidrat Sigma firmasından, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Calbiochem firmasından temin edilmiştir.

Tüm deneylerde kullanılan mikropipet uçları ve mikrosantrifüj tüpleri Biohit firmasından temin edilmiştir. Ayrıca, antimikrobiyal deneylerinde bitkilerden izole edilen özütleri emdirmek amacıyla Oxoid marka 6 mm steril boş diskleri kullanılmıştır.

Tez çalışmaları boyunca; bitki özütlerin hazırlanması için döner buharlaştırıcı (Büchi B-490), ekstraktların toplam polifenol ve flavonoid bileşiklerin tayininde spektroskopik ölçümler almak amacıyla UV-vis spektrofotometre (HP 8453 A) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılmış kimyasalların miktarını tartmak amacıyla hassas terazi (Denver Inst), ısıtma veya karıştırma amacıyla kullanılan ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Heidolph Mr Hei), deneylerin sağlıklı bir ortamda yapılması için kullanılan çeker ocak, deneylerde kullanılan saf su elde etmek için saf su cihazı (Millipore) ve ultra saf su sistemi (Millipore) kullanılmıştır. Deneyler sırasında, kullanılan kimyasalları doğru bir şekilde muhafaza etmek amacıyla kullanılan buz dolabı (Bosch), antioksidan etki çalışmalarında buz makinesi (Scotsman AF80), multimod mikrolaka okuyucu (Specra Max M2e) ve mikrolakalar (Brandplate) kullanılmıştır. Deneylerde malzeme ve kimyasal sterilizasyonu için kullanılan yatay otoklav, mikroorganizmaların inkübasyonu için inkübatör (Mettler), ısıya karşı hassas kimyasalların saklanması için kullanılan derin dondurucu (-20 °C, Bosch) kullanılmıştır. Homojen karışımlar hazırlamak için vorteks (Heidolph) ve araştırmalar süresinde kullanılan otomatik pipetlerden (Gilson ve Biohit) faydalanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Çalışılan bitkilerin toplanması ve teşhisi

Tez kapsamında çalışılan bitki örnekleri Haziran ve Temmuz (2009) aylarında Doç. Dr. Ergin Murat ALTUNER ve Yrd. Doç. Dr. Talip ÇETER tarafından Kastamonu'nun çeşitli bölgelerinden toplanmış ve tür teşhisi Yrd. Doç. Dr. Kerim GÜNEY tarafından yapılmıştır.

3.2.2 Çalışılan bitkilerin özütleme işlemi

Çalışılan bitki örnekleri öncelikle çiçek, gövde, yaprak olmak üzere üç kısma ayrılmış ve daha sonra sıvı azotla havanda ezilerek tamamen toz haline getirilmiştir. 15 mL ve 50 mL'lik santrifüj tüplerinde stok olarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Özütleme aşamasında toz halinde olan bitki örneklerinin, polar ve apolar bileşiklerce zengin şekilde özütlenmesi için % 99,9'luk metanol, % 99,5 etanol ve % 99 aseton organik çözücüler de olmak üzere 3 çözügen madde kullanılmıştır. Bitki özütleme işlemi 2 gr toz bitki örneğine 20 mL çözügen (toz ağırlık-çözügen hacim oranı 1:10 olacak şekilde) eklenmesiyle başlamıştır (Dülger 1999, Benli 2005). Hazırlanan karışımlar 30 dakika manyetik karıştırıcıyla karıştırıldıktan sonra 24 saat süreyle 4 °C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışımlar 6000 devir, 4 °C'de ve 20 dakika süre içinde santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra, tüplerde oluşan çökelti atılarak sıvı fazdaki çözügen alınmış ve 40 °C'de uygun basınçta (metanol 337 mbar, etanol 175 mbar, aseton 556 mbar) döner buharlaştırıcı yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen konsantre özüt 2 ml DMSO'da çözünmüştür. Çözünen bitki özütleri mikrosantrifüj tüplerine ayrılarak -20 °C'de saklanmıştır (Ertürk 2003).

3.2.3 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik madde tayini spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Slinkard ve Singleton 1977). Bu yöntemde Folin-Ciocalteu reaktifine ek olarak % 2'lik sodyum karbonat çözeltisi ve fenolik madde standardı olarak da gallik asit (GA) kullanılmıştır. Oluşan reaksiyona bağlı renk değişimleri ise 750 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Fenolik madde standardı olarak, DMSO ile hazırlanan gallik asit (1 g/L) çözeltisinden 50, 100, 200 ve 400 mg/L olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Fenolik madde miktarı tayini için 100 µl kör (sadece DMSO), standart bileşik (GA) ve bitki özütü içeren tüplere 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve iyice karıştırılan solüsyonlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda özütlere, standart ve kör tüplerine 1 mL % 2'lik sodyum karbonat eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra da 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, tüm solüsyonların 750 nm'de köre karşı absorbans ölçümleri (OD_{750}) alınmıştır. Gallik asitin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD_{750} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır (Slinkard ve Singleton 1977, Sarıkürkçü vd. 2008). Deney iki tekrarlı çalışılmıştır.

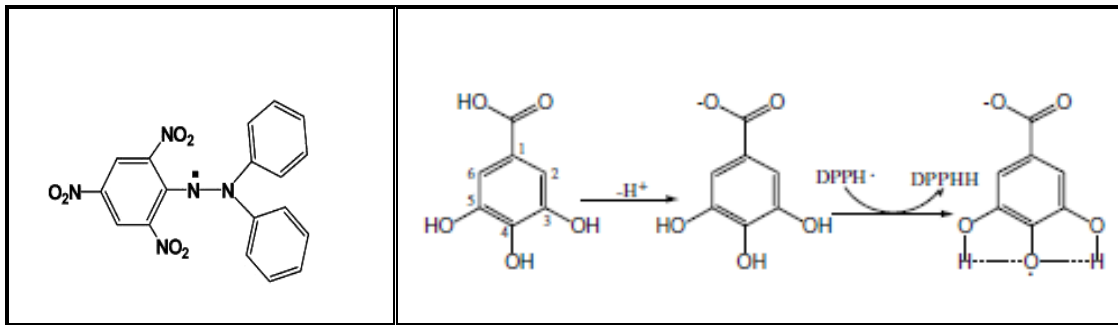
3.2.4 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi

Bitki özütlerinde toplam flavonoid madde miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir (Woisky ve Salatino 1998). Bu yöntemde % 95'lik etanol, %10'luk alüminyum klorür ve 1M sodyum asetat çözeltileri kullanılmıştır. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi, 1998 yılında Woisky ve Salatino tarafından kullanılmış, sonraki yıllarda bir takım değişiklikler yapılmıştır. Kuersetin standart olarak kullanılmış ve kalibrasyon eğrisi bu standarta göre çizilmiştir. 10 mg kuersetin, 10 mL % 80'lik etanol içerisinde çözülerek 25, 50 ve 100 µg/mL'ye seyreltilmiştir. Flavonoid madde tayini için tüpler içine 0.5 mL kör (% 95'lik etanol), standart kuersetin solüsyonları veya bitki özütü koyulmuş, üzerine 1.5 mL % 95'lik etanol, 0.1 mL % 10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL sodyum asetat (1M) ve 2.8 mL DMSO ilave edilerek, 30

dakika karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, tüm solüsyonların 415 nm’de köre karşı absorbans ölçümleri (OD_{415}) alınmıştır (Woisky ve Salatino 1998, Chang vd. 2002). Kuersetinin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD_{415} değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon eğrisi grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır. Deney iki tekrarlı çalışılmıştır.

3.2.5 Antioksidan aktivite analizi

Bu çalışmada antioksidan aktivite belirleme yöntemi olarak, hazırlanan özütlerdeki fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılmıştır (Bois 1958). DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)’in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından giderilmesi (süpürülmesi, temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahip ise metanolik DPPH çözeltisinin rengini o kadar çok açması beklenir. Farklı numune konsantrasyonuyla muamele edilen DPPH’nin absorbansındaki değişim ölçülerek, ölçülen absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı ng/mL cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir.



Şekil 3.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü ve DPPH’in gallik asitle indirgenme basamakları

Bu yöntem mikropalaklarda çalışılmıştır. Hazırlanan özütlerin çeşitli konsantrasyonlarda (300, 200, 150 µL) metanol içinde hazırlanmış +4 °C’de saklanan 6 µL’lik çözeltileri, 144 µL metanol ve 50 µL’lik DPPH metanol (200 µM) çözeltisi ile karıştırılmıştır. 25 dakika, oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 517 nm’de (OD₅₁₇) özütlerin DPPH absorpsiyonu okunmuştur. Örneklerin absorpsiyon değeri köre karşı (6 µl DMSO) değerlendirilmiştir (Sharma ve Bhat 2009). IC₅₀ değeri hesaplanmadan önce, farklı dozlarda hazırlanan ekstraktların % antioksidan aktivitesi aşağıda verilen formülden yararlanarak belirlenmiştir (Burits vd. 2001, Burits ve Bucar 2000):

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri örnek derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek seçilen örneklerin % 50 renk açılımını sağlayan derişimleri % 50 inhibisyon (IC₅₀) değeri olarak hesaplanmıştır. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Cuendet vd. 1997, Kirby ve Schmidt 1997, Burits vd. 2001, Burits ve Bucar 2000). Deney üç tekrarlı çalışılmıştır.

3.2.6 Antimikrobiyal aktivite analizi

Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Kirby ve Bauer 1966, Silici ve Koç 2006) . Bu amaçla, Gram (+) bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC-6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram (-) bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 ve *Escherichia coli* ATCC-25922 ile ökaryotik bir maya olan *Candida albicans* ATCC-10231 seçilmiştir. Kullanılan mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Kültür Koleksiyonu’ndan temin edilmiştir. Deney iki tekrarlı çalışılmıştır.

3.2.6.1 Mikroorganizmaların üremesi için besiyerlerinin hazırlanması

3.2.6.1.1 Kùltürlerin hazırlanması

Mikroorganizmaların standardizasyonunda sıvı besiyeri olarak bakteriler için Nutrient Broth ve maya için Malt Ekstrakt Broth kullanılmıştır. Nutrient Broth besiyerinin hazırlanması için 8 gr besiyeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür. Malt Ekstrakt Broth besiyerinin hazırlanması için 17 gr besiyeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür. Sterilizasyon işleminden geçen sıvı besiyeri 16×16 mm’lik steril cam tüplere alınmıştır. Her steril cam tüp 10 mL besiyeri içermiş, daha sonrasında 4 °C’de saklanmıştır (Silici ve Koç 2006, Altuner ve Çetin 2009).

Antimikrobiyal aktivite analizinde bakterilerin üremesi için gerekli olan katı besiyeri için Nutrient Agar ve maya suşunun üremesi için Malt Extract Agar kullanılmıştır. Nutrient Agar besiyeri için 20 gr besiyeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür. Malt Extract Agar’ın hazırlanmasında ise 39 gr besiyeri 1L dH₂O içinde çözülmüştür.

Besiyerleri döküm ve sterilizasyon işlemleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1.2 Bitki özütlerin disklere emdirilmesi

Bitki örneklerinden elde edilen özütler, 6 mm’lik boş ve steril disklere 5µL ve 20µL oranında emdirilmiştir (Altuner ve Çetin 2009). Özütlerin emdirildiği diskler çözücülerin sonucu etkilememesi amacıyla bir gün oda sıcaklığında kapalı santrifüj tüplerinde kurumaya bırakılmıştır (Silici ve Koç 2006).

3.2.6.1.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi

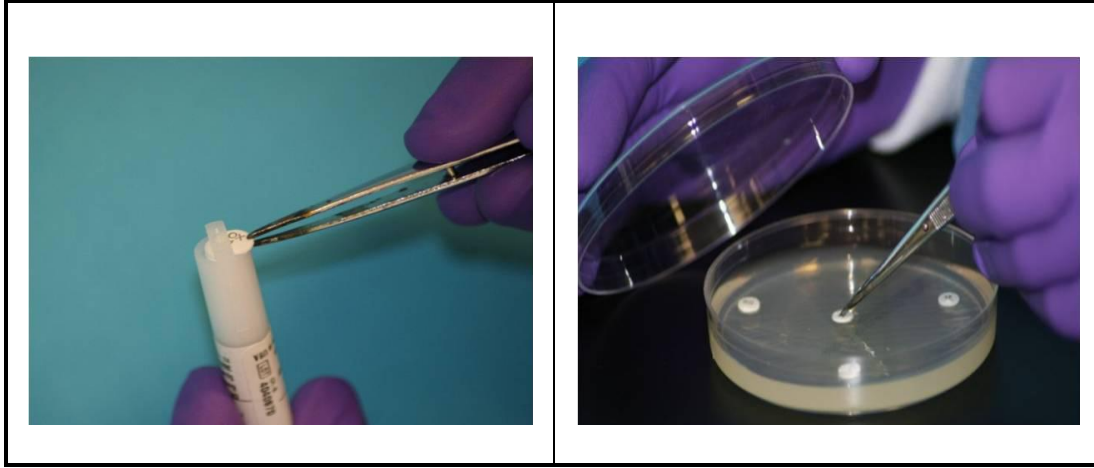
Disk difüzyon yönteminde, besiyerlerine yayılan mikroorganizma kültürlerinin standart miktarda mikroorganizma içermesi gerekmektedir. Bu amaçla McFarland No 0.5 standardı hazırlanmıştır.

McFarland No 0.5 standardının hazırlanması için; 0.0999 gr BaCl_2 tartılarak 10 mL dH_2O içinde çözülmüştür. Sonra, 100 mL 0.36 N H_2SO_4 (%1 v/v) çözeltisi hazırlanarak, BaCl_2 çözeltisinden 0.5 mL alınmış ve 0.36 N H_2SO_4 'den 99.5 mL ile karıştırılmıştır.

Mikroorganizma kültürleri izole koloniler elde etmek amacıyla agar ortamına ekilmiştir. Bakteriler için 37 °C'de 24 saat, maya için 27 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra 4-5 tane iyi derecede izole olmuş koloni, öze yardımıyla broth besiyerine alınmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu daha önce hazırlanmış olan 0.5 McFarland standardı ile karşılaştırılarak süspansiyonun bulanıklığı ayarlanmıştır. 0.5 McFarland standardının bulanıklığına göre ayarlama yapıldığında, tüp içindeki canlı hücre sayısı 1×10^7 - 1×10^8 CFU/mL arasında olmaktadır (Şenol vd. 2007).

3.2.6.1.4 Mikroorganizmaların besiyerine inokülasyonu ve disklerin yerleştirilmesi

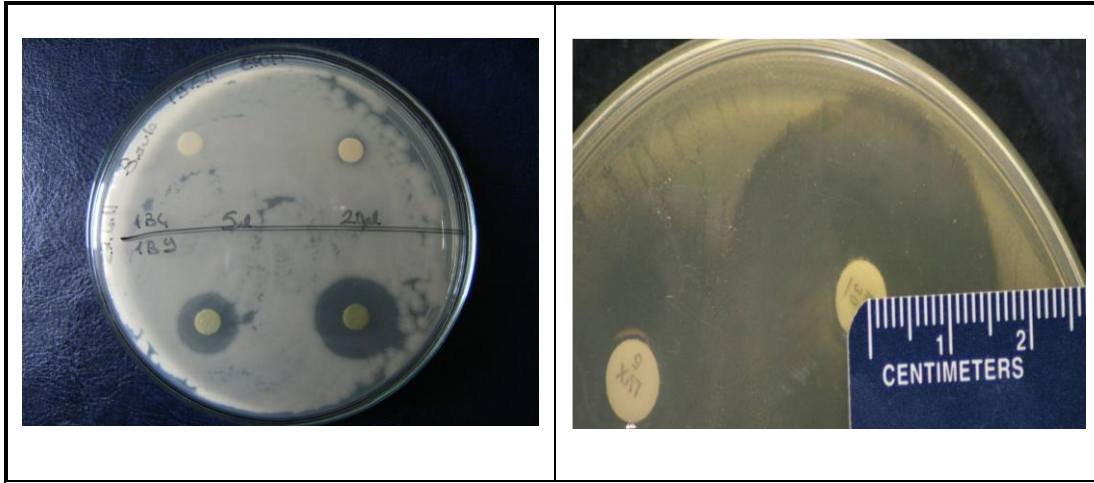
İnokülasyon aşamasında, hazırlanan ve standardize edilen mikroorganizma süspansiyonlarından 100 µL alınmış ve drigalski özesi yardımıyla süspansiyon besiyerinin üzerine homojen olarak yayılmıştır (Ertürk vd. 2006). Mikroorganizma süspansiyonu yayılan petriler, bitki özütü içeren diskler uygulamadan önce 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Özüt içeren diskler, inhibisyon zonlarının okunmasını engellemek amacıyla agar üzerinde aralıklarla dizilmiştir. Disk yerleştirilmesi işleminden 15 dakika sonra bakteriler için petriler 37 °C'de 24 saat, maya için 27 °C'de 48 saat olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Disklerin ekim yapılmış besiyerlerine yerleştirilmesi (<http://microbelibrary.org> 2013)

3.2.6.1.5 İnhibisyon zonların ölçümü

İnhibisyon sürecinin sonunda disklerin etrafında inhibisyon zonlarının oluşup oluşmadığı gözlenerek, inhibisyon zonları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülerek milimetre (mm) cinsinden kaydedilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 İnhibisyon zonları ve mm cinsinden ölçülmesi (<http://microbelibrary.org> 2013)

3.2.6.1.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontroller

Negatif kontrol olarak, % 99 metanol, % 99,5 etanol, % 99 aseton ve DMSO disklerle emdirilerek kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise standart antibiyotik diskler kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotik disklerin listesi çizelge 3.2’de sunulmuştur

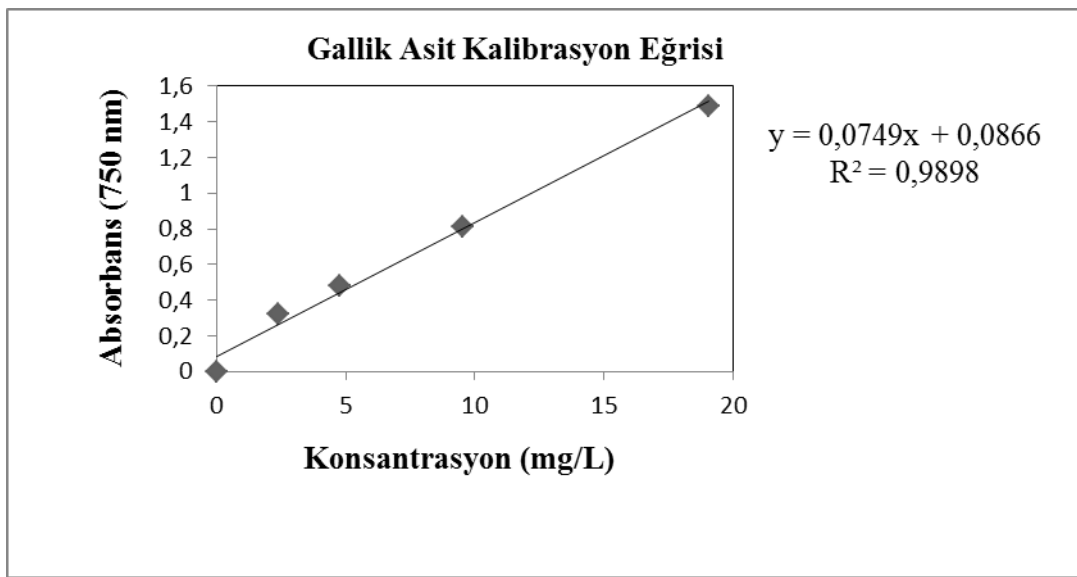
Çizelge 3.2 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi

Antibiyotik Disk	Madde Miktarı
Ampisilin	10 µg
Gentamisin	10 µg
Streptomisin	10 µg
Meropenem	10 µg
Tetrasiklin	30 µg
Kanamisin	30 µg
Seftazidim	30 µg
Ofloksasin	5 µg
Linkomisin	2 µg

4. BULGULAR

4.1 Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Standart bileşik olarak gallik asit 4 farklı konsantrasyonda kullanılmıştır (Şekil 4.1, Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart eğrisi grafiği

Çizelge 4.1 Gallik asit konsantrasyonları ve absorbans değerleri

Ana Konsantrasyon (mg/L)	Final Konsantrasyonu (mg/L)	Absorbans (750 nm)
0	0	0
50	2,381	0,323
100	4,762	0,482
200	9,524	0,814
400	19,048	1,49

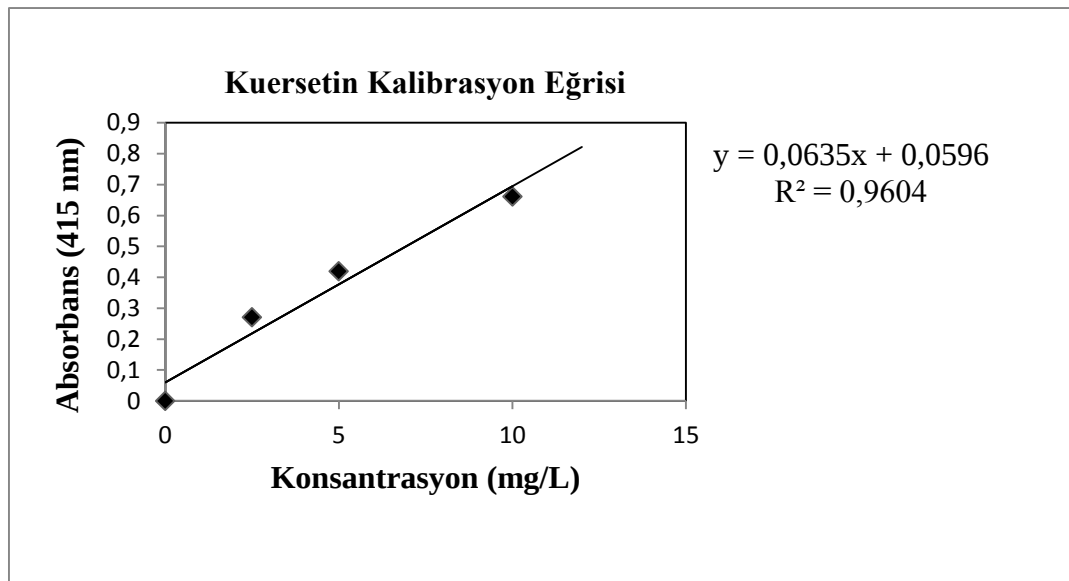
Tüm bitki örneklerinin içerdikleri fenolik bileşik miktarı gallik asit standardı referans alınarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Tüm bitki örneklerinin özütledikleri çözümlere göre içerdikleri toplam fenolik bileşik miktarları (mg/L)

Toplam Fenolik Bileşik Miktarları (mg/L)			
Bitkiler	EtOH	MeOH	Aseton
ONA-C	19,719	24,706	13,948
ONA-Y	26,344	30,476	36,674
ONA-G	10,172	13,235	5,371
CAA-C	74,062	67,024	90,305
CAA-Y	21,927	23,494	22,141
CAA-G	9,246	12,808	8,035
CIA-C	20,075	18,864	11,383
CIA-Y	14,803	8,035	12,452
CIA-G	9,602	11,668	13,235
CES-C	18,436	39,097	23,779
CES-Y	13,663	15,658	26,914
CES-G	8,818	15,373	12,238

4.2 Toplam Flavonoid Tayini

Toplam flavonoid tayini de spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Standart bileşik olarak kuersetin 4 farklı konsantrasyonda kullanılmıştır (Şekil 4.2, Çizelge 4.3).



Şekil 4.2 Toplam flavonoid tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği

Çizelge 4.3 Kuersetin konsantrasyonları ve absorbens değerleri

Ana Konsantrasyon (mg/L)	Final Konsantrasyonu (mg/L)	Absorbans (415 nm)
0	0	0
25	2,5	0,27
50	5	0,419
100	10	0,661

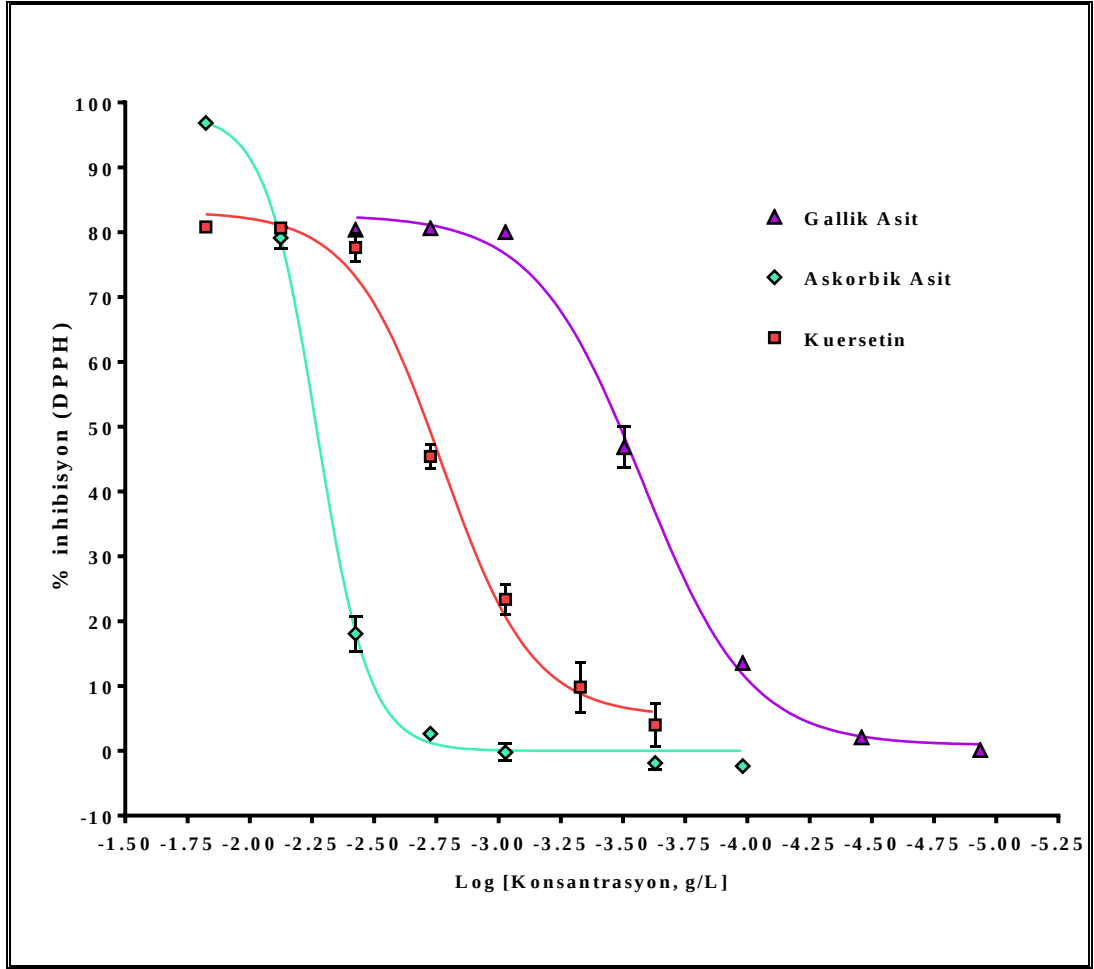
Çizelge 4.4 Tüm bitki örneklerinin özütlendikleri çözgenlere göre içerdikleri toplam flavonoid miktarları (mg/mL)

Toplam Flavonoid Miktarları (mg/mL)			
Bitkiler	EtOH	MeOH	Aseton
ONA-C	30,375	42,093	32,406
ONA-Y	40,062	53,187	85,375
ONA-G	22,093	19,906	12,921
CAA-C	123,562	82,562	185,437
CAA-Y	52,875	38,968	66,625
CAA-G	30,218	31	34,437
CIA-C	41,468	18,031	38,656
CIA-Y	42,406	28,343	56,156
CIA-G	28,187	21,781	37,718
CES-C	48,343	48,812	58,812
CES-Y	49,593	36,937	79,593
CES-G	26,625	30,843	41,625

4.3 Antioksidan Aktivite Testleri

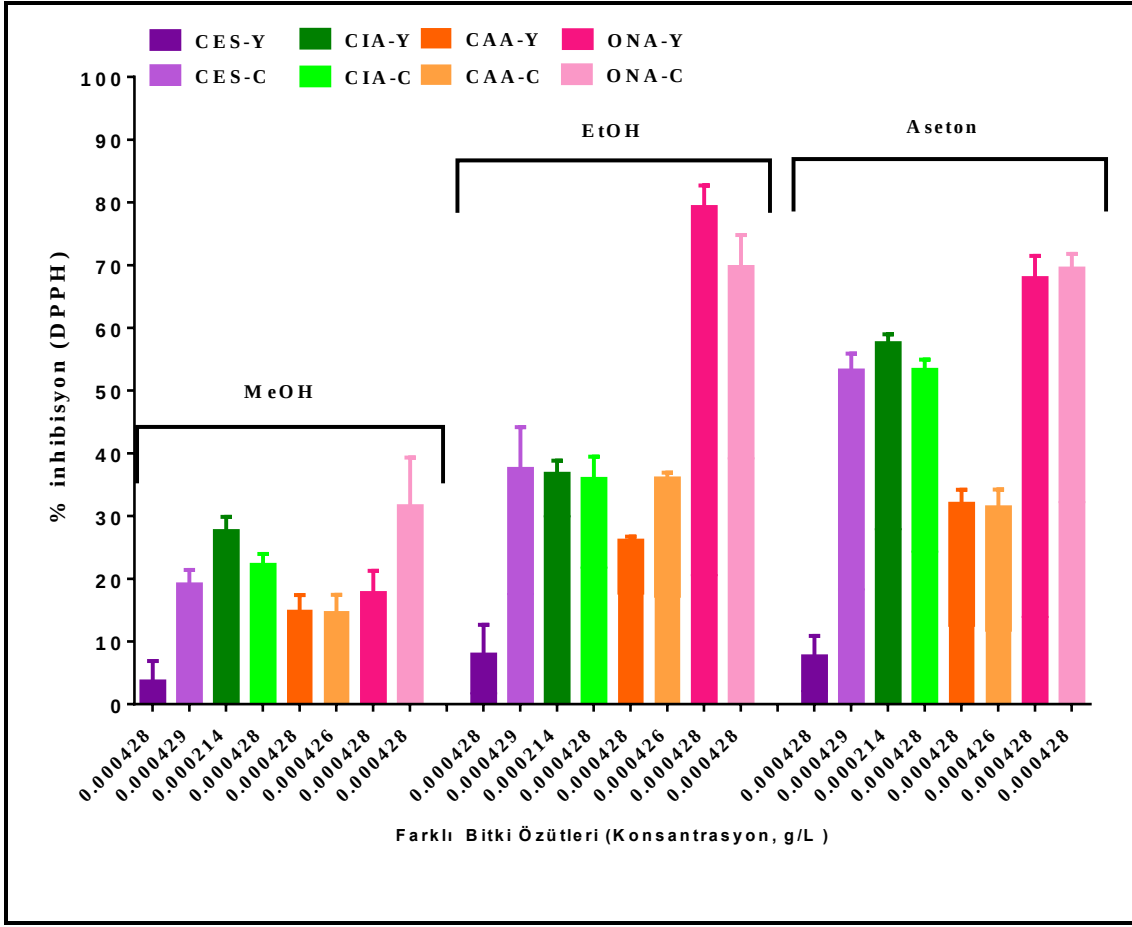
Bu çalışma, *O. acanthium*, *C. acanthoides*, *C. arvense*, *C. solstitialis* bitkilerinin çiçek ve yaprak kısımlarının metanol, etanol ve aseton ekstraktlarının DPPH radikalini giderici etkilerini saptamak amacıyla yapılmıştır. Tüm grafik çizimleri Graphpad Prism 6 programıyla yapılmıştır.

Öncelikle birer polifenol olan gallik asit, askorbik asit ve kuersetin standart olarak kullanılmış, DPPH giderici etkisine bakılmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.3).



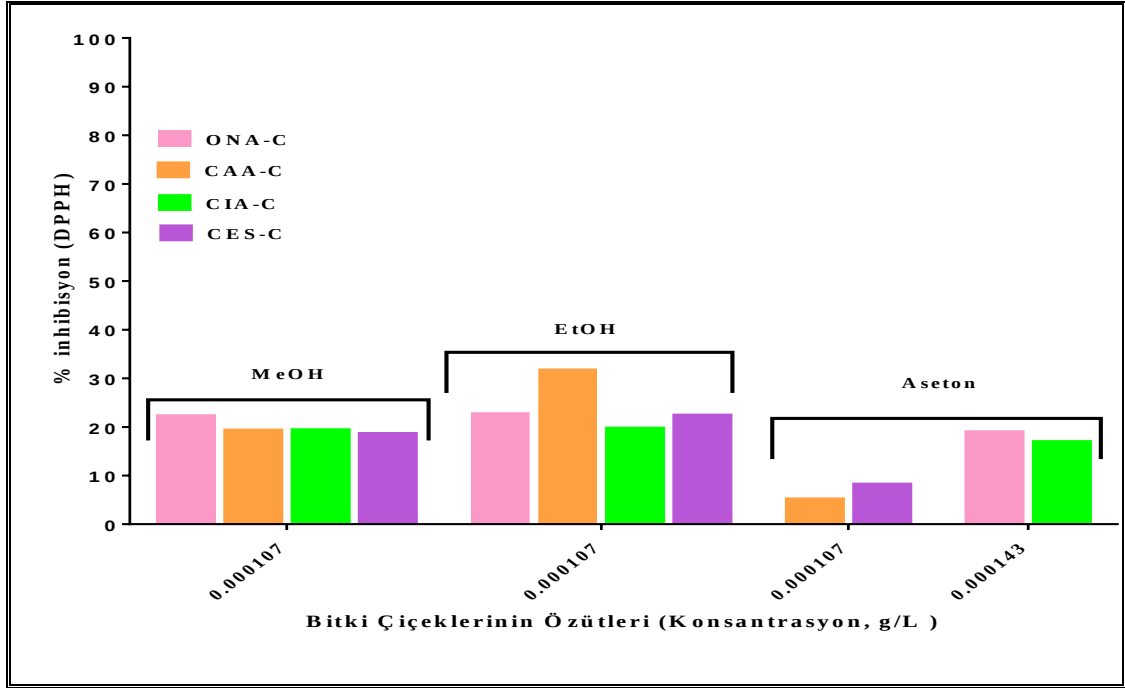
Şeki 4.3 Gallik asit, askorbik asit ve kuersetin kalibrasyon eğrisi grafiği

Tüm bitki kısımlarının üç çözügendeki özütlerinin DPPH giderici etkisine bakılmıştır. Çözgen bakımından etanol ve asetonunda özütlenen bitki kısımları daha çok DPPH giderici etki gösterirken, ONA-Y ve ONA-C örnekleri, diğer örneklere göre daha çok DPPH giderici etki göstermiştir (Şekil 4.4) .



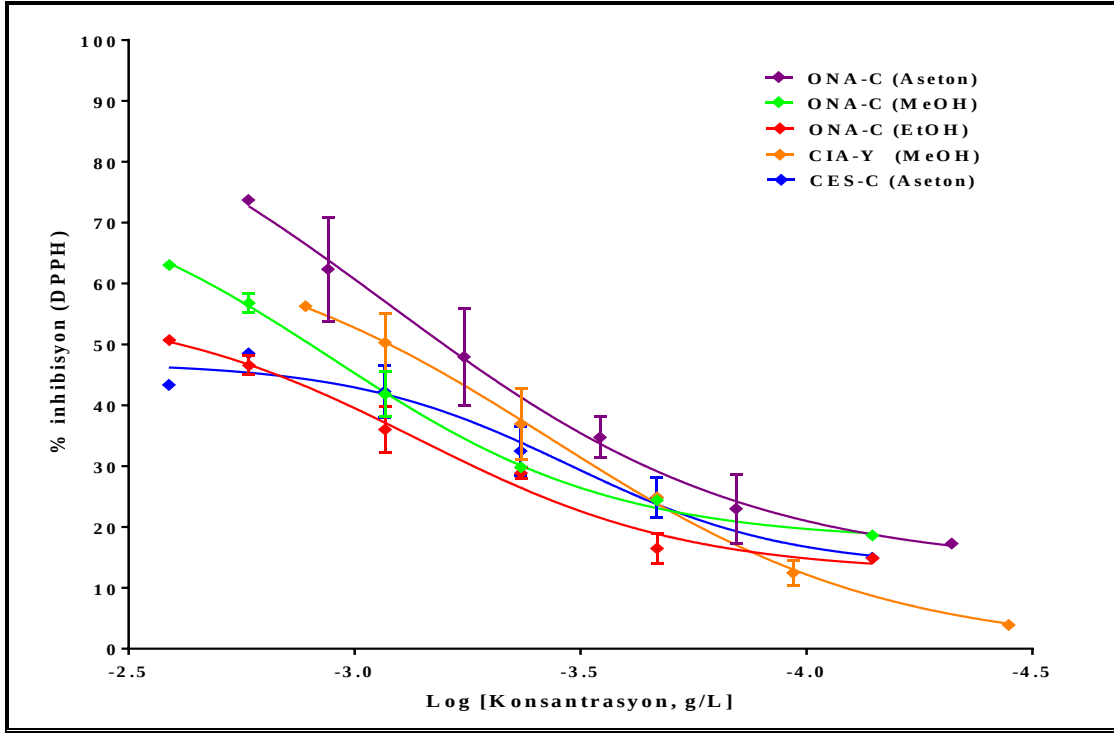
Şekil 4.4 Tüm bitki örneklerinin DPPH giderici etkisini gösteren konsantrasyon-% inhibisyon bar grafiği

Tüm bitki kısımlarından 3 farklı çözügede elde edilen özütler, 6 konsantrasyonda seyreltilmiştir. Tüm bitkilerin çiçek kısımlarının 3. doz olarak belirlenen konsantrasyonlarında (Asetonda ONA-C ve CIA-C hariç. Bu örnekler fenolik içerik bakımından daha seyreltik oldukları için 2. dozları çalışılmıştır) ön tarama amacıyla DPPH giderici etkilerine bakılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Tüm bitkilerin çiçek kısımlarının 3. doz olarak belirlenen konsantrasyonlarının konsantrasyon-% inhibisyon ön tarama bar grafiği

DPPH'in kalibrasyon eğrisinden ve özütlerin konsantrasyona bağlı değişim grafiklerinden faydalanılarak radikalın yarısının giderildiği andaki bitki özütlerinin konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmış, Graphpad Prism 6 programında Şekil 4.6'daki gibi grafiğe geçirilmiştir. IC_{50} değerleri ONA-C ve CES-C'nin aseton özütlerinde sırasıyla; 0,0008425 g/L ve 0,0003343 g/L olarak bulunmuştur. ONA-C ve CIA-Y'nin metanol özütlerinde sırasıyla; 0,001120 g/L ve 0,0003665 g/L olarak bulunmuştur. ONA-C etanol özütünde ise 0,0007236 g/L bulunmuştur. Düşük bir konsantrasyonda yüksek absorbans yüksek bir antioksidan aktiviteye işaret etmektedir.



Şekil 4.6 Yüksek inhibisyona göre seçilen bitki örnekleriyle tekrar edilmiş DPPH testinde, %50 inhibisyonun (IC_{50}) belirlendiği grafik

4.4 Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Bu çalışmada, *O. acanthium*, *C. acanthoides*, *C. arvense*, *C. solstitialis* bitkilerinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarının metanol, etanol ve aseton ekstraktlarının Gram (+), Gram (-) bazı bakteriler ve maya suşu üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve özütlerin kullanılan suşlara karşı oluşturdukları inhibisyon zonları Çizelge 4.1 - 4.4 arasında verilmiştir. Pozitif kontrol olarak seçilen; Streptomisin (10 µg) , Tetrasiklin (30 µg), Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Linkomisin (2 µg), Ampisilin (10 µg), Meropenem (10 µg), Seftazidim (30 µg), Ofloksasin (5 µg) antibiyotik disklerinin inhibisyon zonları da Çizelge 4.5’de verilmiştir. Negatif kontrol olarak ekim yapılmış hiçbir petride % 99 metanol, % 99,5 etanol, % 99 aseton ve DMSO emdirilen diskler çevresinde zon görülmemiştir. 5 µL özüt emdirilen hiçbir bitki örneğinin diskleri çevresinde önemli ölçüde zon gözlemlenemediği için sonuçlara dahil edilmemiştir. İnhibisyon zonları, disk çapını (6

mm) içerecek şekilde ölçülerek milimetre (mm) cinsinden kaydedilmiştir. Deney iki tekrarlı çalışılmıştır.

Çizelge 4.5 *Onopordum acanthium* L.'un çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)

<i>Onopordum acanthium</i> L.	<i>B. subtilis</i> ATCC-6633			<i>S. aureus</i> ATCC-25923			<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853			<i>E. coli</i> ATCC-25922			<i>C. albicans</i> ATCC-10231		
ÇİÇEK	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton
Paralel 1	8*	9	9	10	9	7	-	9	-	9	8	-	-	-	-
Paralel 2	10	10	9	8	8	7	-	-	-	10	-	-	-	-	-
Ortalama	9	9,5	9	9	8,5	7	-	4,5	-	9,5	4	-	-	-	-
Standart hata	1,414	0,707	-	1,414	0,707	0	-	6,363	-	0,707	5,656	-	-	-	-
YAPRAK															
Paralel 1	20	17	- **	10	10	9	-	8	-	8	9	-	-	-	-
Paralel 2	18	13	-	8	9	9	-	-	-	21	-	-	-	-	-
Ortalama	19	15	-	9	9,5	9	-	4	-	14,5	4,5	-	-	-	-
Standart hata	1,414	2,828	-	1,414	0,707	0	-	5,656	-	9,192	6,363	-	-	-	-
GÖVDE															
Paralel 1	10	9	-	10	9	-	-	10	-	7	9	-	-	-	-
Paralel 2	10	-	-	8	8	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-
Ortalama	10	4,5	-	9	8,5	-	-	5	-	8	4,5	-	-	-	-
Standart hata	0	6,363	-	1,414	0,707	-	-	7,071	-	1,414	6,363	-	-	-	-

* Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

** İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

Çizelge 4.6 *Carduus acanthoides* L.'in çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)

<i>Carduus acanthoides</i> L.	<i>B. subtilis</i> ATCC-6633			<i>S. aureus</i> ATCC-25923			<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853			<i>E. coli</i> ATCC-25922			<i>C. albicans</i> ATCC-10231		
ÇİÇEK	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton
Paralel 1	8*	9	8	11	10	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	14	15	8	8	10	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	11	12	8	9,5	10	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	4,242	4,242	0	2,121	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YAPRAK															
Paralel 1	- **	7	15	11	10	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	8	-	15	10	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	4	3,5	15	10,5	9	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	5,656	4,949	0	0,707	1,414	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GÖVDE															
Paralel 1	7	9	8	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	7	-	8	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	7	4,5	8	8,5	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	0	6,363	0	2,121	1,414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

** İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

Çizelge 4.7 *Cirsium arvense* (L.) Scop.'nin çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlерinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)

<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	<i>B. subtilis</i> ATCC-6633			<i>S. aureus</i> ATCC-25923			<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853			<i>E. coli</i> ATCC-25922			<i>C. albicans</i> ATCC-10231		
ÇİÇEK	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton
Paralel 1	7*	-	8	9	9	7	-	7	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	11	13	8	8	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	9	6,5	8	8,5	4,5	7	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	2,828	9,192	0	0,707	6,363	0	-	4,949	-	-	-	-	-	-	-
YAPRAK															
Paralel 1	-**	-	8	8	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	-	-	8	7	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	-	-	8	7,5	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	-	-	0	0,707	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GÖVDE															
Paralel 1	0	-	8	8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	7	-	8	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	3,5	-	8	7,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Standart hata	4,949	-	0	0,707	0,707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

**İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

Çizelge 4.8 *Centaurea solstitialis* L.'in çiçek, yaprak ve gövde kısımlarının etanol, metanol ve aseton çözgenleriyle elde edilen özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi (mm)

<i>Centaurea solstitialis</i> L.	<i>B. subtilis</i> ATCC-6633			<i>S. aureus</i> ATCC-25923			<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853			<i>E. coli</i> ATCC-25922			<i>C. albicans</i> ATCC-10231		
ÇİÇEK	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton	EtOH	MeOH	Aseton
Paralel 1	10*	-**	7	10	10	7	7	9	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	12	11	7	8	10	7	-	-	-	11	-	-	-	-	-
Ortalama	11	5,5	7	9	10	7	3,5	4,5	-	5,5	-	-	-	-	-
Standart hata	1,414	7,778	0	1,414	0	0	4,949	6,363	-	7,778	-	-	-	-	-
YAPRAK															
Paralel 1	14	8	12	10	9	8	-	8	-	-	-	-	-	-	-
Paralel 2	14	10	12	7	8	8	-	-	-	14	-	-	-	-	-
Ortalama	14	9	12	8,5	8,5	8	-	4	-	7	-	-	-	-	-
Standart hata	0	1,414	0	2,121	0,707	0	-	5,656	-	9,899	-	-	-	-	-
GÖVDE															
Paralel 1	8	10	-	9	8	7	-	-	-	7	-	-	-	-	-
Paralel 2	11	7	-	7	9	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	9,5	8,5	-	8	8,5	7	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-
Standart hata	2,121	2,121	-	1,414	0,707	0	-	-	-	4,949	-	-	-	-	-

*Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

**İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

Çizelge 4.9 Pozitif kontrol olarak seçilen antibiyotik disklerin inhibisyon zonları (mm)

	Strep (S)	Gent (CN)	Amp (AM)	Tetra (T)	Kana (K)	Seft (CAZ)	Mero (MEM)	Oflo (OFX)	Lin (L)
<i>B. subtilis</i> ATCC-6633	15*	15	-**	20	15	25	35	25	-
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	25	18	30	13	25	-	30	30	12
<i>P. aeruginosa</i> ATCC-27853	20	30	20	13	20	-	35	30	10
<i>E.coli</i> ATCC-25922	23	-	20	35	20	30	40	30	-
<i>C. albicans</i> ATCC-10231	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Zon çapları disk çapını (6 mm) içerecek şekilde ölçülmüştür

**İnhibisyon zonu gözlenmemiştir

5. TARTIŞMA SONUÇ

Bu çalışmada ülkemizde yetişen *Asteraceae* familyasına ait *O. acanthium*, *C. acanthoides*, *C. arvense* ve *C. solstitialis* bitkilerinin çiçek, gövde ve yaprak kısımlarının metanol, etanol ve aseton özütlerinin 5 farklı mikroorganizma üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal etkilerine ve antioksidan etkilerini saptamak amacıyla aynı bitki kısımlarının özütlerinin toplam fenolik madde içerikleri ve flavonoid içerikleri tespit edilerek DPPH radikali üzerinde etkileri araştırılmıştır.

Toplam fenolik madde tayini çalışmasında görülmüştür ki; *O. acanthium* bitkisi çiçeğinin aseton özütü aynı bitkinin diğer kısımlarının etanol ve metanol özütlerine göre daha fazla (36,674 mg/L) fenolik bileşik içermektedir.

C. acanthoides bitkisi çiçeği ise çalıştığımız diğer bitkilerin tüm kısımlarının çalışılan tüm özütlerine göre oldukça fazla fenolik içerik göstermiştir (Çiçeğinin etanol özütü 74,062 mg/L, metanol özütü 67,024 mg/L, aseton özütü 90,305 mg/L). Bu bakımdan *C. acanthoides* bitkisi çiçeği oldukça dikkat çekicidir.

C. arvense bitkisi çiçeği etanol özütü, bitkinin diğer kısım ve tüm özütlerine göre daha fazla fenolik içerik gösterirken (20,075 mg/L), *C. solstitialis* bitkisinin çiçeğinin de metanol özütü, bitkinin diğer kısım ve tüm özütlerine göre en yüksek fenolik içeriğe (39,097 mg/L) sahip olduğu gösterilmiştir.

Çalıştığımız bitkilerde bir fenolik bileşik olan flavonoidin, tayini çalışması sonucunda *O. acanthium* bitkisi yaprağının aseton özütünün, bitkinin diğer kısım ve tüm özütlerine göre daha fazla flavonoid içerdiği saptanmıştır (85,375 mg/L).

C. acanthoides bitkisi çiçeğinin etanol, metanol ve aseton özütlerinin hepsi flavonoid bakımından diğer tüm bitki kısım ve özütlerine göre daha zengin bulunmuştur (etanol özütü 123,562 mg/L, metanol özütü 82,562 mg/L, aseton özütü 185,437 mg/L).

C. arvense bitkisi ve *C. solstitialis* bitkisi yapraklarının aseton özütleri de bu bitkilerin diğer kısım ve özütlerine göre en yüksek flavonoid içeriği gösteren bitki özütleridir (sırasıyla; 56,156 ve 79,593 mg/L).

Sonuç olarak; toplam fenolik bileşik ve flavonoid tayini çalışmasında *C. acanthoides* bitkisi çiçeğinin etanol, metanol ve aseton özütlerinin diğer bitki kısım ve özütlerine göre önemli derecede bu bileşikleri içerdiği görülmüştür.

O. acanthium, *C. acanthoides*, *C. arvense* ve *C. solstitialis* bitkilerinin antioksidan etkilerini saptamak amacıyla da çiçek ve yaprak kısımlarının metanol, etanol ve aseton özütlerinin DPPH radikali üzerinde etkilerine bakılmıştır. Gövde kısımları çalışma dışı bırakılmıştır. Çünkü gövdeler özütleme işlemi öncesi bütün olarak parçalanarak toz haline getirilmiş ve böylece iletim demetleri içerisindeki toprak elementleri de özüt içerisinde kalmıştır. DPPH radikali giderici etkinin sağlıklı bir şekilde ölçülemeyeceği düşünülmüş, bu yüzden bitkilerin gövde kısımları çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çalışma kapsamında bitki özütlerinin konsantrasyonları bitkilerin toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş olup (14,25 µg/mL, 9,50 µg/mL, 7,13 µg/mL), konsantrasyon-% inhibisyon bar grafikleri oluşturulmuştur. En yüksek inhibisyon gösteren bitki örnekleri özütlerinin %50 inhibisyon yapan konsantrasyonları (IC₅₀), bu standardize değerler üzerinden g/L olarak hesaplanmıştır.

Toplam fenolik bileşik miktarlarına göre konsantrasyonları (14,25 µg/mL, 9,50 µg/mL, 7,13 µg/mL) standardize edilmiş bitki özütleri 1/2 oranında 6 doz dilüye edilmiştir. Ön tarama amacıyla, tüm bitkilerin çiçek kısımlarının tüm özütlerinin 3. dozlarına (3,55 µg/mL, deney içinde konsantrasyonu 0,000107 g/L) DPPH testi uygulanmıştır. Fakat *O. acanthium* ve *C. arvense* bitkileri çiçeklerinin aseton özütlerinin sadece 2. dozları kullanılmıştır. Çünkü diğer örneklere göre, bu örneklerin en yüksek dozlarının toplam fenolik bileşik miktarı yani konsantrasyonu düşüktür. Bu durumda diğer bitkilerle standardizasyon sağlamak için 3. değil, bu doza en yakın konsantrasyon olan 2.

dozlarına (4,75 µg/mL, deney içinde final konsantrasyonu 0,000143 g/L) DPPH testi uygulanmıştır.

Toplam fenolik bileşik miktarına göre konsantrasyonları (14,25 µg/mL, 9,50 µg/mL, 7,13 µg/mL) standardize edilmiş bitki özütleri 1/2 oranında 6 doz dilüye edilmiştir. 6 doz hazırlanan tüm bitki kısım ve özütlerinden en yüksek konsantrasyonları kullanılmıştır (0,000428 g/L, 0,000426 g/L, 0,000214 g/L). Tüm bitki kısım ve özütleri içerisinde, *O. acanthium* bitkisi çiçek ve yaprağının etanol ve aseton özütlerinin en iyi inhibisyon gösteren örnekler olduğu görülmüştür. *O. acanthium* bitkisi yaprak etanol özütünün 0,000428 g/L konsantrasyondaki özütü % 79 inhibisyon gösterirken, aynı çözümden ve aynı konsantrasyonda çiçek özütü % 69 inhibisyon göstermiştir. Aynı bitkinin yaprağının aseton özütü % 67 inhibisyon gösterirken, çiçek özütü % 69 inhibisyon göstermiştir. *C. arvense* bitkisi, *O. acanthium* bitkisi yaprak ve çiçeğinin etanol ve aseton özütünden sonra ikinci en yüksek inhibisyon değerlerini gösteren bitkidir. *C. arvense* bitkisi 0,000214 g/L konsantrasyondaki yaprak aseton özütü % 57 inhibisyon gösterirken, aynı çözümden 0,000428 g/L konsantrasyondaki çiçek özütü % 53 inhibisyon değerlerini göstermiştir. En düşük inhibisyon yüzdesini % 3 ile *C. solstitialis* bitkisi yaprağının metanol özütü göstermiştir.

DPPH yöntemiyle çalışılan bitkilerde diğer özütlere karşı etanol ve aseton özütlerinin serbest radikal temizleme yeteneklerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. IC₅₀ değerleri ONA-C ve CES-C'nin aseton özütlerinde sırasıyla; 842,5 ng/mL ve 334,3 ng/mL olarak tespit edilmiştir. ONA-C ve CIA-Y'nin metanol özütlerinde sırasıyla; 1120 ng/mL ve 366,5 ng/mL olarak bulunmuştur. ONA-C etanol özütünde ise 723,6 ng/mL bulunmuştur. IC₅₀ değerleri ne kadar küçükse antioksidan aktivitesi de o kadar etkilidir. Yani düşük bir absorban yüksek bir antioksidan aktiviteye işaret etmektedir (Pourmorad vd. 2006, Tekeli vd. 2008). Bu durumda % 50 inhibisyonu sağlayan derişimler (IC₅₀) hesaplandığında bitkiler içerisinde en yüksek aktivitenin 366,5 ng/mL IC₅₀ değeri ile *C. arvense*'nin yaprağının metanol özütü olduğu gözlenmiştir. CES-C'nin aseton özütü 334,3 ng/mL değeri, *C. arvense*'nin yaprağının metanol özütü değerinden küçüktür fakat farklı konsantrasyonlarda yüksek bir inhibisyon farkı gözlemlenemediği

için bu bakımdan daha iyi olan *C. arvense*'nin yaprağının metanol özütü 366,5 ng/mL değeriyle antioksidan aktivitesi en iyi örnek olarak gözlemlenmiştir.

Kiselova ve arkadaşlarının 2006 yılında *O. acanthium* bitkisi ile yaptıkları çalışmada bitkinin çiçeğinin sulu methanollü özütlerinin toplam fenolik içeriklerine kuersetin standardı kullanılarak Folin-Ciocalteu yöntemi ile antioksidan aktivitesine ise troloks standardı kullanılarak ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) yöntemi ile ölçülmüştür. Yapılan çalışmada, çalışılan diğer bitkilerle kıyaslandığında *O. acanthium*'un toplam fenolik içeriği ile orantılı olarak orta düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Uğur ve arkadaşları 2011 yılında *Onopordum caricum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde ettikleri hekzan, kloroform, etilasetat, ve etanol özütlerinin antimikrobiyal etkilerini araştıran bir çalışma yapmışlardır. *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarına karşı etanol ve kloroform özütleri iyi ölçüde inhibisyon göstermiştir. Ayrıca kloroform özütlerinde kolon ve gaz kromatografi yöntemleriyle seskiterpen ve triterpen ailesine ait olan heksahidrofarneşil aseton, betulin, lupeol, β -amirin bileşikler izole edilmiştir. Tez çalışmalarında *O. acanthium*'un da toprak üstü kısımları çalışılmış ve etanol özütünün *P. aeruginosa* ve *C. albicans* dışında kullanılan tüm suşlara karşı etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle yaprak etanol özütünün *B. subtilis* üzerinde oldukça etkin olduğu görülmüştür.

C. acanthoides bitkisi ile ilgili olarak antimikrobiyal etki bakımından herhangi bir çalışmaya rastlanmazken, Zheleva-Dimitrova ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmaya göre *C. acanthoides*'in de içinde yer aldığı 6 farklı *Carduus* türü antioksidan etkileri bakımından incelenmiştir. Bu yayınlı *Carduus* türlerinin radikal giderici etkileri ve bu türlerden izole edilen anthodia bileşiğinin lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkisi ilk kez yayınlanmıştır. *Carduus* türlerinin askorbik asit standardına göre antioksidan etkileri nispeten az bulunurken, hepsinin lipit peroksidasyonu BHT'den daha güçlü bulunmuştur. Suda çözünabilen toplam fenolik bileşik içeriklerine göre *C. acanthoides* orta düzeyde bir içeriğe sahipken, DPPH testine göre etanolik özütleri, askorbik asit ve BHT standartlarından sonra 3. derecede iyi antioksidan etki gösteren

bitkidir. ABTS testine göre ise askorbik asit ve BHT den sonra en güçlü antioksidan etki gösteren tür *C. acanthoides* olarak belirtilmiştir.

Tez kapsamında çalışılan bitkiler içinde *C. acanthoides* bitkisinin çiçek özütleri, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içeriği bakımından en zengin bitki olduğu görülmüştür. Antioksidan aktivite tayini deneyinde genel taramada etkin bir aktivite görülmemiştir. Nazaruk'un 2008'de *Cirsium* cinsi üzerine yaptığı çalışmasında *C. arvense* bitkisi çiçek ve yaprak kısımlarının metanollü özütlerinin kloroform, dietileter, etilasetat ve n-butanol fraksiyonlarının kitler ile toplam antioksidan etkilerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda dietileter, etilasetat, butanol ve metanol özütünde orta düzeyde fenolik içeriği olduğu ve antioksidan etkisinin varlığı gösterilmiştir. Nazaruk'un aynı yılda yine *Cirsium* cinsi üzerine yaptığı çalışmasında, içlerinde *C. arvense*'nin de olduğu 5 farklı türün sulu özütlerinin fenolik içerikleri, antimikrobiyal, antioksidan etkileri araştırılmıştır. Antioksidan etki ABTS metoduyla incelenmiş yine bu sonuçlara göre orta seviyede fenolik bileşik içerdiği ve yine orta düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Antimikrobiyal testlerde ise *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* suşlarına karşı etkileri araştırılmış ve en yüksek etki *Cirsium palustre* (L.) Scop. türü yapraklarının sulu özütlerinde görülürken *C. arvense* türünde yine orta düzeyde bir antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir.

Khan vd. (2011) yaptıkları çalışmada ise *C. arvense* bitkisinin tüm kısımlarının metanollü özütlerinin kloroform, n-heksan, etilasetat ve n-butanol fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivitelerine, agar kuyu difüzyon yöntemiyle bakılmıştır. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus* ve *Enterobacter* olmak üzere 6 suş kullanılmıştır. Sonuç olarak tüm fraksiyonlar suşların üremesini inhibe etmiş ancak en iyi inhibisyon kloroform fraksiyonun *Enterobacter*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*'a karşı olan inhibisyon olarak görülmüştür.

Bu tez kapsamında da *C. arvense*'nin orta düzeyde fenolik içeriği olduğu fakat DPPH testinde yapraklarının metanol özütlerinin antioksidan etkisinin, etkin bir IC₅₀ değerine sahip olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal etki bakımından da *C. albicans*'a karşı etki

göstermezken, *P. aeruginosa*'a karşı sadece çiçek metanol özütleri etki göstermiştir. *C. arvense* yaprağının etanol ve metanol özütleri *B. subtilis*'e etki göstermezken, gövdenin metanol özütü de bu suşa etki göstermemiştir. Diğer kısımların bu suşa karşı etkileri de kayda değer boyutlarda değildir. *S. aureus*'a karşı gövde aseton özütü etki göstermezken yine aynı şekilde diğer bitki kısımlarının özütleri de kayda değer bir inhibisyon zonu göstermemiştir.

Yeşilada vd. (1999) yaptıkları çalışmada *C. solstitialis* bitkisinin toprak üstü kısımları metanol özütlerinin, kloroform fraksiyonu *Helicobacter pylori* üzerinde inhibitör aktivite potansiyelinin olduğunu göstermişlerdir (Yeşilada vd. 2004, Özçelik vd. 2007).

Özçelik vd. (2007) yaptıkları çalışmada *C. solstitialis*'in çiçek kısmından izole ettikleri 3 seskiterpen lakton bileşiğinin (klorofizopifolin A, klorojanerin, 13-asetil solstitialin A) *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* suşları üzerine etkilerini incelemiştir. Yapılan MIC testi sonucunda 13-asetil solstitialin A bileşiği zayıf derecede, centaurepensin ve klorojanerin orta derecede *S. aureus* suşuna etki gösterdiği belirtilmiştir. Genel olarak bu 3 seskiterpen lakton bileşiğinin deneyde kullanılan tüm Gram (+), Gram (-) suşlarına ve mayaya zayıf düzeyde etki gösterdiği görülmüştür.

Şen vd. (2013) yaptıkları çalışmada ise *C. stenolepis*, *C. kilaea*, *C. iberica*, *C. cuneifolia*, *C. solstitialis* olmak üzere, 5 farklı *Centaurea* türü üzerinde yaptıkları çalışmada kapitulum ve kapitulumsuz toprak üstü kısımlardan hazırlanan metanol özütlerinin DPPH yöntemi ile antioksidan etkisi, MIC yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik içerikleri araştırılmıştır. Antioksidan testlerinde askorbik asit standardına göre bu türlerin antioksidan aktivitelerinin düşük olduğu görülmüştür. Ancak bu türler içerisinde *C. solstitialis*'in antioksidan aktivitesi iyi düzeydedir. *C. solstitialis*'in içerdiği toplam fenolik bileşik miktarı da az miktarda bulunmuştur. *C. solstitialis*'in kapitulumlu toprak üstü kısımlarının metanol özütleri deneydeki hiç bir suşa etki göstermezken, kapitulumsuz

toprak üstü kısımlarının metanol özütleri *P. aeruginosa*'a karşı düşük düzeyde de olsa etki etmiştir.

Bu tez kapsamında ise *C. solstitialis*'in tüm özütleri *B. subtilis*'e karşı etkili olmuştur. Özçelik ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmalarıyla uyumlu olarak da *S. aureus*'a karşı etkili olmuştur. Bitki kapitulumlu olarak çalışılmıştır. Özellikle yaprak etanol özütünün *B. subtilis*'e karşı olan etkisi dikkat çekicidir. Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Streptomisin (10 µg)'in *B. subtilis*'e karşı olan etkisine yakın bir etki görülmektedir. Ancak bu çalışmada *P. aeruginosa*'a karşı hiçbir özütünün etkisi gözlenmemiştir. Fenolik içerik bakımından Şen ve arkadaşlarının 2013 çalışmasıyla uyumluluk göstermektedir. Nitekim bu bakımdan *C. solstitialis* zengin bir içeriğe sahip olmadığı görülmüştür.

Çalışılan *O. acanthium* bitkisinin çiçek kısımlarının etanol, metanol, aseton olmak üzere, tüm özütlerinin *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çiçeğinin metanol ve etanol özütü *E. coli* suşuna etki gösterirken, metanol özütü *P. aeruginosa*'ya karşı etki göstermiştir.

Aynı bitki yaprağının her üç özütü *S. aureus*'a karşı etki gösterirken, etanol ve metanol özütleri *B. subtilis* ve *E. coli*'ye karşı etki göstermiştir. Özellikle etanol özütünün *B. subtilis* üzerindeki etkisi dikkate değerdir. *P. aeruginosa*'ya karşı ise sadece metanol özütü etki göstermiştir. *O. acanthium* bitkisi yaprağının etanol özütünün *B. subtilis*'e olan etkisinin pozitif kontrol olan Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Streptomisin (10 µg)'e göre daha etkin ve Tetrasiklin (30 µg)'e yakın etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

O. acanthium bitkisi gövdesi etanol ve metanol özütleri *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına etki gösterirken *P. aeruginosa*'ya karşı ise sadece metanol özütü etki göstermiştir. Gövdenin etanol özütünün *B. subtilis*'e olan etkisinin, çiçeğinin etanol ve metanol özütlerinin etkisine yakın bir inhibisyon zonu göstermesi, gövdenin bir iletim organı olması bakımından önemli bir sonuçtur.

Çalışılan *C. acanthoides* bitkisi çiçeğinin metanol özütü diğer bitki kısımlarına, özütlerine ve suşlara göre en fazla etkiyi *B. subtilis*'e karşı göstermiştir. *C. acanthoides* tüm kısım ve özütleri, gövdesinin aseton özütü hariç, *S. aureus*'a da etki göstermiştir. Ancak *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarına karşı hiçbir etki göstermemiştir.

C. arvense çiçeğinin tüm özütlerinin genel olarak antimikrobiyal sonuçları dikkat çekici olmamasına rağmen *B. subtilis*'e ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisi gözlenmiştir. *P. aeruginosa*'ya karşı ise sadece metanol özütü etki göstermiştir. *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarına karşı ise hiçbir bitki kısmı ve özütünün etki göstermediği saptanmıştır. *C. arvense*'nin tüm yaprak özütleri, *S. aureus*'a karşı etki gösterirken, *B. subtilis*'e karşı sadece aseton özütü etki göstermiştir.

Bitkinin gövdesinin etanol ve aseton özütleri *B. subtilis*'e karşı, yine etanol ve de metanol özütleri *S. aureus*'a karşı etki göstermiştir.

Çalışmada *C. solstitialis* bitkisi çiçeklerinin, tüm özütlerinin *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir. *P. aeruginosa*'ya karşı ise etanol ve metanol özütü etki gösterirken, *E. coli* suşlarına karşı sadece etanol özütü etki göstermiştir.

Aynı bitkinin yapraklarının yine tüm özütleri *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı etkili olmuştur. Özellikle yaprak etanol özütünün *B. subtilis*'e karşı olan etkisi dikkat çekicidir. Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Streptomisin (10 µg)'in *B. subtilis*'e karşı olan etkisine yakın bir etki görülmektedir. *P. aeruginosa*'ya karşı sadece metanol özütü etki gösterirken, *E. coli* suşlarına karşı sadece etanol özütü etki göstermiştir.

C. solstitialis bitkisi gövdesinin etanol ve metanol özütleri *B. subtilis*'e, bunlara ek olarak aseton özütleri de *S. aureus*'a karşı etkili olmuştur. *P. aeruginosa*'ya karşı herhangi bir inhibisyon zonu görünmezken, *E. coli* suşuna karşı sadece etanol özütü etki göstermiştir.

C. albicans mayasına karşı ise üzerinde çalışılan hiçbir bitki kısmı özütü etkili olamamış, inhibisyon zonu gözlenmemiştir.

Antimikrobiyal aktivite test sonuçları, bitkisel kökenli antimikrobiyal ajanlara karşı Gram (+) bakterilerin Gram (-) bakterilerden daha dirençli olduğunu gösterir. Mikroorganizmaların Gram boyanma özelliklerinin, antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri dirençlilik ile yakından ilgili olduğuna dair değişik görüşler mevcuttur. Zaika'ya (1998) göre Gram (+) bakteriler, uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerine karşı Gram (-) bakterilerden daha dirençli iken, yapılan başka bir çalışmada (Deans ve Ritchie 1987, Deans vd. 1995) Gram faktörünün inhibisyon üzerinde daha az etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Ancak bitkisel kökenli bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesine ilişkin diğer araştırmalar bitkisel kökenli antimikrobiyal ajanlara karşı Gram (-) bakterilerin Gram (+) bakterilerden daha dirençli olduğunu göstermektedir (Sivropoulou vd. 1996, Aligiannis vd. 2001, Haznedaroğlu vd. 2001, Karaman vd. 2001). Çalışmada kullanılan *Asteraceae* familyasının 4 farklı türüne ait değişik bitki kısımlarına ait özütlerden elde edilen sonuçlara göre genel anlamda birer Gram (+) bakteri olan *B. subtilis*'e ve *S. aureus*'a karşı daha etkili oldukları görülmüştür. Özellikle *O. acanthium* bitkisi yaprağının etanol özütünün *B. subtilis*'e olan etkisinin pozitif kontrol olan Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Streptomisin (10 µg)'e göre daha etkin ve Tetrasiklin (30 µg)'e yakın etki göstermesi etken maddesinin araştırılmasına ışık tutacak sonuçlar olarak görülebilir. Ayrıca *C. solstitialis* bitkisinin yapraklarının etanol özütünün yine *B. subtilis*'e karşı olan etkisi dikkat çekicidir. Kanamisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Streptomisin (10 µg)'in *B. subtilis*'e karşı olan etkisine yakın bir inhibisyon zonu göstermesi de gelecekte yapılacak olan ayrıntılı çalışmalar için fikir verecek verilerdir.

Sonuç olarak; ülkemiz florasında yetişen bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan etkileri bakımından değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında yer alan bitkiler gibi ülkemiz florasında doğal olarak yetişen türlerin, test edilen mikroorganizmalara karşı farklı derecelerde antimikrobiyal etkileri olduğunun tespit edilmesi ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, bu bitkilerin radikal önleyici

ve/veya temizleyici etkilerinin öncelikle ilâç sektörü olmak üzere değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Antioksidan aktivite testlerinde DPPH yöntemi bitki özütlerinin serbest radikal temizleme yeteneğini gösterir. Bu çalışmada değerlendirilen bitkilerin IC₅₀ değerine göre, polar çözügen olan metanol özütünün, antioksidan aktivitesi yüksek bulunmuştur. Doğada bol olarak yetişen bu türlerin üretimi ve hammadde amaçlı kullanımı düşünülebilir. Ancak antioksidan aktivitede etken maddenin/maddelerin saflaştırılarak antimikrobiyal etkinin ve antioksidan aktivite etki mekanizmasının bundan sonraki çalışmalar için aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abascal, K. and Yarnell, E. 2002. Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes. *Alternative & Complementary Therapies*, Part: 1; 237-241.
- Akalın, E. 1994. Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevleri Ltd. Şti., 386, Ankara
- Akkol, E.K., Arif, R., Ergun, F. and Yesilada, E. 2009. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 122; 210-215.
- Aliagiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I. B. 2001. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49; 4168-4170.
- Altuner, E.M. and Çetin, B. 2009. Antimicrobial Activity of *Thuidium delicatulum* (Bryopsida) Extracts. *Kafkas Üniv. Fen Bil. Enst. Derg.*, 2(2); 85-92.
- Anonymous. 2013. American Society for Microbiology. Web Sitesi: <http://www.microbelibrary.org>, Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Anonymous. 2013. Discover life. Web Sitesi: <http://www.discoverlife.org>, Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Anonymous. 2013. Illinois department of natural resouces. Web Sitesi: <http://www.dnr.stat.ilus/stewardship>, Erişim Tarihi: 28.05.2013.
- Anonymous. 2013. Jim Lindsey. Web Sitesi: <http://www.commanster.eu>, Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Anonymous. 2013. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Web Sitesi: www.turkherb.ibu.edu.tr. Erişim Tarihi: 28.05.2013.
- Anonymous. 2001. Zouhar, K. *Cirsium arvense*. In: Fire Effect Information System (Online). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Web Sitesi: <http://www.fs.fed.us/database/feis>, Erişim Tarihi: 10.06.2013.
- Arif, R., Küpeli, E. ve Ergun, F. 2004. The Biological activity of *Centaurea* L. Species. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 17(4); 149-164.
- Atik, A., D., Öztekin M. ve Erkoç, F. 2010. Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki Endemik Bitkilere Örnekler. *GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 30(1); 219-240.

- Babaoğlu, M., Gürel, E. and Özcan, S. 2002. Bitki Biyoteknolojisi I. Sel-Ün yayınları, 374, Konya
- Barbour, E. K., Al Sharif, M., Sagherian, V. K., Habre, A. N., Talhouk, R. S. and Talhouk, S.N. 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93; 1-7.
- Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M. and Gravalos, D.G. 1997. Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. *Fitoterapia*, 68; 281-283.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitapevleri, 480, Ankara
- Benli, M. ve Yiğit, N. 2005. Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Animikrobiyal Aktivitesi. *Orlab on-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (8); 1-8.
- Briskin, D.P. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*, 124; 507-514.
- Buchanan, B., Gruissem W. and Jones R. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. 1250-1318.
- Burits, M. and Bucar, F., 2000. Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. *Phytotherapy Research*, 14; 323-328.
- Burits, M., Asres, K. and Bucar, F. 2001. The Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*, 15; 103-108.
- Bois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181; 1199-1200.
- Cai, Y. Z., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74; 2157-2184.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. and Corke, H. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 78; 2872-2888.
- Canales, M., Hernandez, T., Serrano, R., Hernandez, L.B., Duran, A., Rios, V., Sigrist, S., Hernandez, H.L.H., Garcia, A.M., Angeles-Lopez, O., Fernandez-Araiza M.A. and Avila, G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *Journal of Pharmacology*, 110; 343-347.

- Capecka, E., Mareczek, A. and Leja, M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 93; 223-226.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3); 178-182.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12; 564-582.
- Cuendet, M., Hostettmann, K. and Potterat, O. 1997. 85. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagvaea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80; 1144-1152.
- Çakılcıoğlu, U. and Türkoğlu, I., 2010. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132; 165-175.
- Çakılcıoğlu, U. Khatun, S., Türkoğlu, I. and Hayta, Ş. 2011. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 137; 469-486.
- Deans, S.G. and Ritche, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5; 165-180.
- Deans, S. G., Noble, R. C., Hiltunen, R., Wuryani, W. and Penzes, L. G. 1995. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.). *Flavour and Fragrance Journal*, 10(5); 323-328.
- Dığrak, M., İlçim, A. and Alma, M.H. 1999. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research*, 13; 584-587.
- Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59 .
- Djipa, C.D., Delmee, M. and Leclercq, J.O. 2000. Antimicrobial Activity of Bark Extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston. *J. of Ethnopharmacol.*, 71; 307-313.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88; 308-316.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo Hiltunen, R. and Tikkanen, M.J. 2003. Characterization of antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, 83; 255-262.
- Dölger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M. ve Uğurlu, E. 1999. *Artemisia absinthium* L.(Pelin)' un Antimikrobiyal Aktivitesi. *Tr. J. of Biology*, 23; 377-384.

- Eminağaoğlu, Ö., Bektas, T., Yumrutaş, Ö., Askın Akbulut, H., Daferera, D., Polissiou, M. and Sökmen, A. 2007. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch) Boiss. And *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chemistry, 100; 339-343.
- Emor, T.G. and Gaynes, R.P. 1993. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiol. Laboratory. Clin. Microbiol. Rev., 6; 428-442.
- Erdemoğlu, N., Turan, N.N., Çakıcı, I., Sener, B. and Aydın, A. 2006. Antioksidant activities of some *Lamiaceae* plant extracts. Phytotherapy Research, 20; 9-13.
- Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z. 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (*Compositae*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Çev Kor., 12 (47); 27-31.
- Ertürk, Ö., Katı, H., Yaylı, N. and Demirbağ, Z. 2006. Antimicrobial properties of *Silene multifida* (Adams) Rohrb plant extracts. Turk J Biol, 30; 17-21.
- Eryılmaz, B. 2001. *Capsicum annuum* (L.) *Solanaceae* meyvelerinin antioksidan aktivite açısöndan değeriendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, 102, Ankara
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. and Boskou, D. 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano. Greek sage. and summer savory. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50; 5294-5299.
- Fresco, P., Borger, F., Diniz, C. and Marques, M.P.M. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. Med. Res. Rev., 26, 747-766.
- Gökpınar, G., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. 2006. Algal Antioksidanlar. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 23; 85-89.
- Grierson, A.J.C. 1975. *Tanacetum* L. In: Flora of Turkey and East Aegean Islands (ed. P.H. Davis), Edinburgh University Press, 5; 256-291.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. 2. nd Ed., Clarendon Press, 416-494, Oxford
- Halliwell, B. 1995. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. 1341-1348.
- Harput, Ş.Ü., Çalış, İ., Saraçoğlu, İ., Dönmez, A.A. and Nagatsu, A. 2006. Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities. Turkish Journal Of Chemistry, 30; 383-390.

- Hartmann, T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80; 177-188.
- Haznedaroğlu, M.Z., Karabay, U. and Zeybek, U. 2001. Antibacterial Activity of *Salvia tomentosa* Essential Oil. *Fitoterapia*, 72; 829-831.
- Hoareau, L. and DaSilva, J.E. 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2; 56-70.
- Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. 2000. Flavonols, flavones, and flavanols-nature occurrence, and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80; 1081-1093.
- Huang, W.Y. , Cai, Y.Z. and Zhang, Y. 2009. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1); 1-20.
- Jakobek, L., Seruga, M., Novak, I. and Medvidovic-Kosanovic, M. 2007. Flavonols, phenolic acids, and antioxidant activity of some red fruits. *Deut Lebensm-Runsch*, 103; 369-378.
- Kaij-A-Kamb, M., Amoros, M. and Girre, L. 1992. Chemical and biological activity of the genus *Centaurea*. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 67; 178-188.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U. and Ilcim, A. 2001. Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76; 183-186.
- Khan, A., Amin, A., Khan, M. A. and Ali, I. 2011. In Vitro Screening of *Cirsium arvense* for Potential Antibacterial And Antifungal Activities. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 24(4); 519-522.
- Kirby, A. J. and Schmidt, R.J. 1997. The Antioxidant Activity of Chinese Herbs Eczema and of Placebo Herbs. *Journal of ethnopharmacology*, 56; 103-108.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Galunska, B., Chervenkov, T., Gerova, D. and Yankova, T. 2006. Polyphenol Content And In Vitro Antioxidant Activity Of Aqueous-Alcoholic Extracts From Bulgarian Herbs. *Bulletin Of The Medical Institute After Mehrabyan*, 78-83.
- Koleva, I., Van Beek, T., Linssen, J.P.H., Groot, A. and Evstatieva, L.N. 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 13; 8-17.
- Kosar, M., Dorman, H.J.D. and Hiltunen, R. 2005. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91; 525-533.

- Koca, N. ve Karadeniz, F. 2003. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 16; 32-37.
- Koca, U., Peşin Süntar, İ., Keles, H., Yesilada, E. and Küpeli Akkol E. 2009. *In vivo* anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. Journal of Ethnopharmacology, 126; 551-556.
- Lokova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S.M. and Klimenteva, N. I. 2001. Chemical Features of Medicinal Plants. Biochemistry and Microbiology, 37(3); 229-237.
- Loy, G., Cottiglia, F., Garau, D., Deidda, D., Pompei, R. and Bonsignore, L. 2001. Chemical Composition and Cytotoxic and Antimicrobial Activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves. Il Farmaco., 56; 433-436.
- Mantle, D., Anderton, J.G., Folkos, G., Barnes, M., Jones, P. and Perry, E.K. 1998. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 121; 385-391.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A. and Watkins, J.B. 2003. 3 rd Diabetes, oxidative stress, and antioxidants. 17; 24-38.
- Medeiros, J.R., Campos, L.B., Mendonça, S.C., Davin, L.B. and Lewis, N.G. 2003. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils From Invasive Species of the Azores, *Hedychium gardnerianum* and *Pittosporum undulatum*. Phytochem., 64; 561-565.
- Montoro, P., Braca A., Pizza C. and De Tommasi, N. 2005. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food Chemistry, 92; 349-355.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85; 231-237.
- Navarro, V., Villarreal, M.L., Rojas, G. and Lozoya, X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. Ethnopharmacol, 53; 143-147.
- Nazaruk, J., Czechowska, S.K., Markiewicz, R. and Borawska, M.H. 2008. Polyphenolic Compounds and In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts From Leaves of Some *Cirsium* Species. Natural Product Research. 22; 1583-1588.
- Okeke, M.I., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S. and Esimone, C.O. 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 78; 119-127.

- Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriarte, E. and Calleja, M. 1998. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*. *Planta Medica*, 64; 116-119.
- Ozarowski, A. and Jaroniewski, W. 1989. Ros'liny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Warszawa: Instytut Wydawniczy Związko'w Zawodowych.
- Özcan, M. 1999. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts on natural olive and sesame oils. *Grasas y Aceites*, 50; 355-358.
- Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoğlu, T. and Yeşilada, E. 2007. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiological Research*, 164; 545-552.
- Özhatay, N., Kültür, Ş. and Aslan, S. 2009. Check-list of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey IV., *Turk J. Bot.*, 33; 191-226.
- Pacheco, P., Sierra, J., Schmedahirschmann, G., Potter, C.W., Jones, B.M. and Moshref M. 1993. Antiviral Activity of Chilean Medicinal Plant-extracts. *Phytother. Res.*, 7(6); 415-418.
- Pannuti, C.S. and Grinbaum, R.S. 1995. An Overview of Nosocomial Infection Control in Brazil. *Infect Control. Hosp. Epidemiol.*, 16; 170-174.
- Philipson, J.D. 1990. Plants as sources of valuable products. In *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, eds. Charlwood, B.V. & Rhodes, M. J. , Oxford: Clarendon Press., pp. 1-22.
- Picman, A. K., 1986. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones, *Biochem.Systematic and Ecology*, 14(3); 225-281.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11); 1142-1145.
- Principe, P.P. 1991. Valuing the biodiversity of medicinal plants. In *Conservation of Medicinal Plants*. eds. Akerele, O., Heywood, V. & Synge, H., pp. 79-124. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ratnakar, P. and Murthy, P.S. 1995. Purification and Mechanisms of Action of Antitubercular Principle From Garlic (*Allium sativum*) Active Against Isoniazid Suceptible and Resistant *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. *Indian J. of Clin. Biochem.*, 10; 14-18.
- Raven, J.A. and Edwards, D. 2001. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *J. Experi. Bot.*, 52; 381-401.

- Ren, W.Y., Qiao, Z.H., Wang, H.W., Zhu, L. and Zhang, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23; 519-534.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, 2; 152-159.
- Rios, J.L. and Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100; 80-84.
- Sarıçoban, C. and Özcan, M. 2004. Antioxidative activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia fruticosa* L.) essential oils in chicken fat. *Journal of Essential Oil Bearing*, 7(1); 91-95.
- Sarıkürkçü, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. and Harmandar, M. 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (*Lamiaceae*) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*, 99; 4239-4246.
- Saxena, V.K. and Sharma, R.N. 1999. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Lankana aculeata*. *Fitoterapia*, 70(1); 59-60.
- Sibanba, T. and Okoh, A.I. 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *Africa J. Biotech.*, V: 6(25); 2886-2896.
- Silici, S. and Koc, A.N. 2006. Comparative study of in vitro methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Letters in Applied Microbiology*, 43; 318-324.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44; 1202-1205.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simoncic, M. and Knez, Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89; 191-198.
- Sharma, O.P. and Bhat, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113; 1202–1205.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem.*, 53; 7749 -7759.
- Shing, B., Sahu, P. M. and Sharma, M. K. 2002. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Ness., *Phytomedicine*, 9; 355-359.

- Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28; 49-55.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, G. and Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15; 549-557.
- Şen, A., Bitiş, L., Birteksöz-Tan, S. and Bulut, G. 2013. In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of some *Centaurea* L. species. *Marmara pharmaceutical Journal*, 17; 42-45.
- Şenol, G., Kiraklı, C. and Halilçolar, H. 2007. In vitro antibacterial activities of oral care products against ventilator-associated pneumonia pathogens. *American Journal of Infection Control*, 35(8); 531-535.
- Tekeli, Y., Sezgin, M. ve Şanda, M.A. 2008. Konya’da yetişen *Centaurea pterocaula* Truatt. in Fenolik Yapısı ve Antioksidan Etkisi. *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 3; 35-41.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M. and Sökmen, A. 2004. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and various extracts of *Origanum syriacum* L. var *bevanii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84; 1389-1396.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M. and Polissiou, M. 2005. Antimicrobial ve antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*, 90; 333-340.
- Tepe, B., Eminagaoglu, Ö., Askın Akbulut, H. and Aydın, E. 2007. Antioxidant potential and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *Salvia verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Frey & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100; 985-989.
- Toroğlu, S. ve Çenet, M. 2006. Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2); 12-20.
- Velioğlu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46; 4113-4117.
- Woisky, R. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 37; 99-105.

- Yeşilada, E., Gürbüz, I. and Shibata, H. 1999. Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 66; 289-293.
- Yeşilada, E., Gürbüz, İ., Bedir, E., Tatlı, İ. and Khan, I.A. 2004. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 95; 213-219.
- Zaika, L.L. 1998. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Nutrition*, 9; 97-118.
- Zheleva-Dimitrova, D., Zhelev, I. and Dimitrova-Dyulgerova, I. 2011. Antioxidant Activity of Some *Carduus* Species Growing in Bulgaria. *Open access*, 1(4); 15-20.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şüheda KOÇ

Doğum Yeri : Konya

Doğum Tarihi : 08.02.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çağrıbey Anadolu Lisesi (2003)

Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat 2009-Temmuz 2013)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Dokay Mühendislik ve Danışmanlık Ltd. Şti. (Temmuz 2011- Ocak 2013)