

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



**KAZDAĞLARI'NDA YETİŞEN LAMIACEAE FAMILİYASININ  
BAZI TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BARIŞ ATALAY**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

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



**KAZDAĞLARI'NDA YETİŞEN LAMIACEAE FAMILİYASININ  
BAZI TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

**YÜKSEK LISANS TEZİ**

**BARIŞ ATALAY**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Barış ATALAY** tarafından hazırlanan **“KAZDAĞLARI'NDA YETİŞEN LAMIACEAE FAMILİYASININ BAZI TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ”** adlı tez çalışmasının savunma sınavı 06.06.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof.Dr. Serap DOĞAN

Üye  
Prof. Dr. Fatih SATIL

Üye  
Doç. Dr. Tuncay DİRMENCI



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Cihan ÖZGÜR

.....

## ÖZET

**KAZDAĞLARI'NDA YETİŞEN LAMIACEAE FAMILYASININ BAZI  
TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BARIŞ ATALAY  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. SERAP DOĞAN)**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2014**

Günlük diyet ile alınan bitki çayları besin sanayisinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Kazdağları'ndan toplanan bazı Lamiaceae türlerinin (*Salvia tomentosa* Miller., *Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden., *Sideritis trojana* Bornm., *Stachys tmolea* Boiss. ve *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil.) antioksidan kapasite, toplam fenol ve flavonoid miktarı, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin yanında toplam protein miktarları araştırılmıştır. Antioksidan kapasite için 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) reaktifi, toplam fenolik içerik için Folin-ciocalteu methodu, toplam flavonoid miktarı ise; Ramful ve arkadaşlarına ait yöntem kullanılarak belirlenmiş olup, disk difüzyon metodu ile de bir gram negatif (*Escherichia coli* ATCC-8739) ve bir gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC-6538) bakteri türleri kullanılarak bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Sitotoksik aktivite ise Smitha ve arkadaşlarına ait metot ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak en yüksek antioksidan aktivite *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*'ya (% 94.71) aittir. Toplam fenol madde miktarı en yüksek olan bitki *S. trojana* (30.87 mg/g) olarak tespit edilmiştir. *E.coli* ATCC-8739 ile yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçlarında *S. perfoliata* ssp. *athoa*, 1.93 µm ve en yüksek aktiviteyi verirken, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 ile yapılan çalışmada *Sideritis trojana* en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. En yüksek sitotoksik aktiviteyi ise *S. trojana* (%95) göstermiştir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Lamiaceae, antioksidan kapasite, toplam fenolik ve flavonoid, antimikrobiyal aktivite, sitotoksik aktivite ve protein içeriği.

## ABSTRACT

### BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME SPECIES OF LAMIACEAE FAMILY GROWING IN KAZDAGI

MSC THESIS

BARIŞ ATALAY

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SERAP DOĞAN

BALIKESİR, JUNE 2014

Daily dietary herbal teas are important part of the food industry. In this study, antioxidant capacity, total phenolic and flavonoid contents, antimicrobial and cytotoxic activities and also total protein content of some of the Lamiaceae species (*Salvia tomentosa* Miller., *Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papan. & Kokkini), *Sideritis trojana* Bornm., *Stachys tmolea* Boiss. ve *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil.) that are obtained from Kazdagı were studied. Their antioxidant capacity, total phenolic and flavonoid contents were determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) method, Folin-Ciocalteu method and by the method of Ramful et. al, respectively. Moreover, by the disc diffusion method a gram-positive and a gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC-8739, *Staphylococcus aureus* ATCC-6538) were studied to determine antimicrobial activity of plant extracts. Cytotoxic activity is investigated by the method of Smitha et. al.

As a result, *S. perfoliata* ssp. *athoa* showed the highest antioxidant activity (94.71%). With respect to the total phenolic content the highest activity was determined with *S. trojana* (30.87 mg/g). According to the results of the antimicrobial activity tests with *E.coli* ATCC-8739 *S. perfoliata* ssp. *athoa* showed the highest activity (1.93  $\mu$ m), while *S. trojana* showed the highest activity with *Staphylococcus aureus* ATCC-6538. among all species. We found that the highest antimicrobial activity of *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa* (1.934 mm) was with *E. coli* ATCC-8739 and for *Sideritis trojana* (1.972 mm) it was with *Staphylococcus aureus* ATCC-6538. With respect to the results of cytotoxic activities *S. trojana* showed the highest cytotoxicity (95%).

**KEYWORDS:** Lamiaceae, antioxidant capacity, phenolic content, flavonoids, antimicrobial activity, cytotoxic activity and protein content.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Lamiaceae Familyası .....	2
1.1.1 <i>Salvia tomentosa</i> Miller. (Adaçayı, Boş Yaprağı, Moşapla Sage).3	
1.1.2 <i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini) Baden (Kedi Kuyruğu Çayı, Kandil Çayı, Dağ Çayı) .....	4
1.1.3 <i>Sideritis trojana</i> Bornm. (Sarıköz çayı, Kazdağı çayı) .....	5
1.1.4 <i>Stachys tmolea</i> Boiss. (Dağ çayı, Eşekotu, Tüylü çay) .....	6
1.1.5 <i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil. (Dağ çayı, Eşekotu, Tüylü çay).....	7
1.2 Serbest Radikaller .....	9
1.2.1 Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları .....	9
1.2.2 Reaktif Oksijen Türleri.....	10
1.2.2.1 Süperoksit ( $O_2^{\bullet}$ ) .....	11
1.2.2.2 Hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) .....	11
1.2.2.3 Peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ ).....	11
1.2.2.4 Alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ).....	11
1.2.2.5 Hidroperoksil ( $HO_2^{\bullet}$ ) .....	12
1.2.3 Reaktif Azot Türleri (RNS) .....	12
1.2.3.1 Nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ) .....	12
1.2.3.2 Nitrik dioksit ( $NO_2^{\bullet}$ ).....	12
1.3 Antioksidanlar .....	13
1.3.1 Antioksidanların Serbest Radikallere Etkileri .....	14

1.3.2	Antioksidan Savunma Sistemi Hücre İçi ve Hücre Dışı Olarak İkiye Ayrılır .....	14
1.4	Fenolik Bileşikler .....	15
1.5	Flavonoidler.....	16
1.5.1	Flavonoidlerin Sınıflandırılması .....	17
1.6	Antimikrobiyal Aktivite.....	19
1.6.1	<i>Escherichia coli</i> ATCC-8739.....	19
1.6.2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-6538.....	20
1.7	Sitotoksik Aktivite .....	21
1.7.1	<i>In vitro</i> Sitotoksikite Testlerinin Avantajları .....	22
1.7.2	<i>In vitro</i> Sitotoksikite Testlerinin Dezavantajları .....	22
1.8	Literatür Özeti .....	23
1.9	Çalışmanın Amacı .....	27
<b>2.</b>	<b>MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>28</b>
2.1	Materyal .....	28
2.2	Metot.....	29
2.2.1	Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	29
2.2.2	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	30
2.2.3	Çözeltilerin Hazırlanışı.....	31
2.3	Ekstraktların Hazırlanması.....	32
2.4	Antioksidan Aktivite Tayini.....	32
2.5	Toplam Fenolik İçerik Tayini.....	32
2.6	Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini.....	33
2.7	Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi .....	33
2.8	Sitotoksik Aktivite Belirlenmesi .....	33
2.9	Protein Miktar Tayini.....	34
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
3.1	Toplam Antioksidan Aktivitesine Ait Bulgular .....	35
3.2	Toplam Fenolik Madde İçeriğine Ait Bulgular .....	36
3.3	Toplam Flavonoid Madde Miktarına Ait Bulgular.....	38
3.4	Antimikrobiyal Aktiviteye Ait Bulgular .....	39
3.5	Sitotoksik Aktiviteye Ait Bulgular .....	41
3.6	Protein Tayinine Ait Bulgular .....	42
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>43</b>

4.1	Antioksidan Aktivite.....	43
4.2	Toplam Fenolik İçerik ve Toplam Flavonoid Miktarı.....	44
4.3	Antimikrobiyal Aktivite.....	45
4.4	Sitotoksik Aktivite.....	46
4.5	Toplam Protein İçeriği.....	49
<b>5.</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>52</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 : <i>Salvia tomentosa</i> Miller.....	3
Şekil 1.2 : <i>Sideritis perfoliata</i> ssp. <i>athoa</i> .....	4
Şekil 1.3 : <i>Sideritis trojana</i> Bornm. ....	6
Şekil 1.4 : <i>Stachys tmolea</i> Boiss.....	7
Şekil 1.5 : <i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.....	8
Şekil 1.6 : Fenol Halkası .....	15
Şekil 1.7 : Flavonoidlerin genel yapısı .....	17
Şekil 1.8 : <i>Escherichia coli</i> .....	20
Şekil 1.9 : <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
Şekil 2.1 : Dumas (Protein/Azot Analizörü) .....	34
Şekil 3.1 : DPPH metodu ile antioksidan aktivite tayini.....	36
Şekil 3.2 : Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolik madde tayini.....	37
Şekil 3.3 : Toplam fenolik madde içeriği hesaplanırken kullanılan gallik asit standart eğrisi .....	37
Şekil 3.4 : Toplam flavonoid madde miktarı.....	38
Şekil 3.5 : Toplam flavonoid madde içeriği hesaplanırken kullanılan kuersetin standart eğrisi .....	39
Şekil 3.6 : <i>E. coli</i> ATCC-8739 .....	40
Şekil 3.7 : <i>S. aureus</i> ATCC-6538 .....	40
Şekil 4.1 : Sitotoksik Aktiviteye Ait Sonuçların Karşılaştırılması .....	48

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1.1 : Lamiaceae Familyasının Yayılışı.....	2
Tablo 1.2 : <i>Salvia tomentosa</i> 'nın Yayılışı.....	3
Tablo 1.3 : <i>Sideritis perfoliata</i> ssp. <i>athoa</i> 'nın Yayılışı.....	4
Tablo 1.4 : <i>Sideritis trojana</i> 'nın Yayılışı .....	5
Tablo 1.5 : <i>Stachys tmolea</i> 'nın Yayılışı .....	6
Tablo 1.6 : <i>Stachys cretica</i> 'nın Yayılışı.....	8
Tablo 1.7 : Flavonoidlerin Sınıflandırılması .....	18
Tablo 2.1 : Bitkilerin Toplandığı Mevkii ve Yükseklikler .....	28
Tablo 3.1 : Bitkilerin antioksidan aktiviteleri (%).....	35
Tablo 3.2 : Bitkilerin toplam fenolik içerikleri (mg/g).....	36
Tablo 3.3 : Bitkilerin toplam flavonoid içerikleri (mg/g) .....	38
Tablo 3.4 : Antimikrobiyal aktivite sonuçları ( $\mu$ m).....	40
Tablo 3.5 : Sitotoksik Aktiviteye Ait Sonuçlar .....	41
Tablo 3.6 : Protein Tayinine Ait Bulgular .....	42

## SEMBOL LİSTESİ

<b>ROT</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Süperoksit
<b>OH<sup>•</sup></b>	Hidroksil
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Peroksil
<b>RO<sup>•</sup></b>	Alkoksil
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Hidroperoksil
<b>RNS</b>	Reaktif Azot Türleri
<b>NO<sup>•</sup></b>	Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Azot dioksit
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>GST</b>	Glutasyon s-Transferazlar
<b>GR</b>	Glutasyon Redüktaz
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>G6PD</b>	Gukoz 6-fosfat Dehidrogenaz
<b>Zn</b>	Çinko
<b>OH</b>	Hidroksil
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Peroksi Radikali
<b>NaCO<sub>3</sub></b>	Sodyum karbonat
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-pikril hidrazil

<b>NaNO<sub>2</sub></b>	Sodyum nitrit
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Alüminyum klorit
<b>NaOH</b>	Sodyum hidroksit
<b>BHA</b>	Bütillenmiş hidroksianisol
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Amonyum klorit
<b>tBOOH</b>	Üçüncül bütilatlı hidroperoksid
<b>HBBS</b>	Hanks Balanced Salt Solution
<b>BHT</b>	Butillendirilmiş hidroksi toluen
<b>FCR</b>	Folin-Ciocalteu Reaktifi
<b>LDL</b>	Low-Density Lipoprotein
<b>ABTS</b>	2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit)
<b>ICP-OES</b>	İndüktif eşlenmiş plazma
<b>LDH</b>	Laktat dehidrogenaz

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tezım boyunca bilgi birikimi, tecrübesi ve pozitif enerjisiyle desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Serap DOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Uzm. Mehmet Emin Diken, Dr. Ümran ALAN ve laboratuvar arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tür teşhislerinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Lisandan bu yana kardeşlerim olan Uğur ÖZKAN, Şükrü VAROL, Muharrem TAŞÇI, Ömer Faruk KARASAKAL, Taha YÜKSEK ve Orhan ÇAĞLAR'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem Müzeyyen ATALAY, babam Kemal ATALAY ve ağabeyim Savaş ATALAY'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

BALIKESİR, 2014

Barış ATALAY

# 1. GİRİŞ

Aromatik bitkiler yıllardır gıda, kozmetik, hastalıkların tedavisinde ve daha birçok alanda kullanılmaktadır. 20. yy.'da gelişen bilim ve teknolojiyle birlikte biyoloji ve kimya bilimlerinde meydana gelen gelişmelerin hızlanması sonucu doğal kaynaklı bileşikler sentetik olarak izole edilebilmiş ve bu bitkilerin değişik alanlarda kullanılmasına olanak sağlanmıştır [1]. Tedavi alanında son yıllarda bitkilere olan ilginin artmasıyla, alternatif tedavi arayışları, enfeksiyon etkenlerine karşı antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktlarının destek tedavi olarak kullanımının yaygınlaşması, bitkilerin öneminin daha da artmasına neden olmuştur [2]. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin yanında tek bir etkisinin olması insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçlara yönlendirmiştir [3]. Modern bilimlerin gelişmesi ile birlikte biyoloji, kimya, farmakoloji, toksikoloji gibi alanların kombineli bir şekilde çalışması sonucu halk ilacı olarak kullanılan birçok bitkinin yapısında bulunan doğal bileşiklerin fitokimyasal yapıları aydınlatılmakta ve biyolojik aktiviteleri saptanabilmektedir [4,5]. Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda bitkilerin ekosistemle olan ilişkisinde, çevresel koşullara uyumunda, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli pek çok olayda çeşitli avantajlar sağlayan, sekonder metabolit olarak tanımlanan kimyasal madde içerdikleri saptanmıştır [6]. Sekonder bileşikler (alkoloidler, uçucu yağlar, glikozidler, flavonoidleri, tanenler, fenoller, renk maddeleri ve reçineler) açısından zengin olan bitki türleri tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer almaktadır. Lamiaceae familyasının üyeleri de sekonder metabolitler açısından oldukça zengindir. Familya ile ilgili 1978-1991 yılları arasında 2889 kimyasal içerikli çalışma tespit edilmiştir. Sahip oldukları aromatik bileşikler ve temel yağlar sayesinde parfümeri, gıda sanayii, tıp ve kozmetik gibi çeşitli alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda familyaya ait pek çok tür halk günlük diyet çayı olarak da tüketilmektedir. Ülkemiz çay ve baharat bitki ihracatında dünya pazarında söz sahibi ülkelerden birisidir. Ticareti yapılan bitki familyaları açısından Lamiaceae ilk sırayı almaktadır [7,8].

## 1.1 Lamiaceae Familyası

Lamiaceae; adaçayı, kekik, nane gibi birçok faydalı bitki grubunu kapsayan geniş bir familyadır [9]. Dünyanın belli başlı büyük familyalarından biri olan Lamiaceae familyası ilk kez 1789 yılında De Jussieu tarafından Labiatae olarak adlandırılmış ancak, 1836 yılında Lindley tarafından Lamiaceae olarak değiştirilmiştir. Lamiaceae familyası çok yıllık, otsu, çalimsı ve nadiren de odunsu olan bir yapılanma göstermektedir [10,11]. Dünya'daki kozmopolit familyalardan biri olan Lamiaceae, hemen hemen her habitatta ve yükseklikte yetişebilmekle beraber en çok Akdeniz havzasında yayılış göstermektedir [7,12,13]. Türkiye florası, Lamiaceae familyası için önemli bir yer oluşturmakta ve bu familyaya ait 45 cins, 546 tür ve diğer alt birimlerle birlikte toplam 731 takson ile temsil edilmektedir. Ülkemizde % 44.2'lik endemizm oranı ile en zengin üçüncü familya konumundadır [12].

**Tablo 1.1 : Lamiaceae Familyasının Yayılışı**

Çiçeklenme Dönemi	Nisan-Temmuz
Habitat	<i>Pinus nigra</i> ormanları, kayalık yamaçlar, 500-1750 m
Türkiye'deki Yayılışı	Batı Anadolu
Kazdağları'nda Yayılış	Kapıdağ, Tozlu yayla, Nanekırı

[14].

Hoş kokuları sebebiyle süs bitkisi olarak kullanılabilmeleri bu familyanın önemini bir kat daha arttırarak bir çok cinsinin üyeleri bu maksatla kültüre edilmektedir [15]. Lamiaceae türleri özellikle terpenoit bileşikler yönünden çok zengindir. Ayrıca içerdikleri flavonoidler, uçucu yağlar ve az da olsa kinoit yapıda maddeler sayesinde basit alkaloitleri taşırlar [16].

### 1.1.1 *Salvia tomentosa* Miller. (Adaçayı, Boş Yaprağı, Moşapla Sage)

*Salvia tomentosa*, 1 m'ye kadar uzayabilen, çok yıllık ve yarı çalimsı bir bitkidir [17]. Gövdesi sert, dik, dört köşeli ve genellikle yukarıda dallanmıştır [14].

**Tablo 1.2 :** *Salvia tomentosa*'nın Yayılışı

Çiçeklenme Dönemi	Nisan-Ağustos (Eylül)
Habitat	<i>Pinus brutia</i> , <i>P. nigra</i> , <i>Quercus pubescens</i> birliklerinde, maki, kalkerli alanlarda ya da volkanik yamaçlar, 90-2000 m
Türkiye'de Yayılış	Kuzey, Batı ve Güney Anadolu
Kazdağları'nda Yayılış	500-1600 m

[14].



<b>Kingdom</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subkingdom</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclass</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Order</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Family</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genus</b>	<i>Salvia</i>
<b>Species</b>	<i>Salvia tomentosa</i> Miller.

**Şekil 1.1 :** *Salvia tomentosa* Miller.



### 1.1.2 *Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papan. & Kokkini) Baden (Kedi Kuyruğu Çayı, Kandil Çayı, Dağ Çayı)

Çok yıllık, 30-60 cm boyunda, tabanda bulunan yapraklar saplı ancak diğer yaprakları sapsız olan *S. perfoliata* ssp. *athoa*'nın boyundan tabana kadar olan kısmı tüylüdür [18]. Gövde dik ya da yükselici, dallanmış ya da yukarıda dallanmıştır. Taç yaprakları sarı renklidir [14].

**Tablo 1.3 :** *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*'nın Yayılışı

Çiçeklenme Dönemi	Temmuz-Ağustos
Habitat	Kayalık yamaçlar, 1350-1720 m
Türkiye'de Yayılış	Kazdağı, Madra Dağı
Kazdağları'nda Yayılış	Kapıdağ, Eşek deresi, Kapıdağ

[14].



**Şekil 1.2 :** *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*  
(Foto : Tuncay DİRMENCİ)

<b>Kingdom</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subkingdom</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclass</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Order</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Family</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genus</b>	<i>Sideritis</i>
<b>Species</b>	<i>Sideritis perfoliata</i> ssp. <i>athoa</i> (Papan. & Kokkini)

### 1.1.3 *Sideritis trojana* Bornm. (Sarıköz çayı, Kazdağı çayı)

20-60 cm arısında değişen bir boya sahip olan *Sideritis trojana* yatık, dört köşeli gövdeli, basit veya küçük dallı, çok yıllık otsu veya çalı tipindedir. Odunsu bir köke sahip olmasının yanında gövde ve dallar 4 köşelidir [19]. Ayrıca gövde yoğun basık beyaz yünsü tüylü, yukarıda hemen hemen tüsüzdür [14].

**Tablo 1.4 :** *Sideritis trojana*'nın Yayılışı

Çiçeklenme Dönemi	Temmuz-Ağustos
Habitat	Kayalık yamaçlar, 1500-1720 m
Türkiye'de Yayılış	Kazdağları'nda endemic
Kazdağları'nda Yayılış	Sarıköz, Nanekırı

[14].

İçerdikleri aromalarından dolayı yaygın şekilde bitki çayı olarak kullanılmaktadır [20]. Halk tıbbında *Sideritis* türlerinin sinir sistemi uyarıcısı, yatıştırıcısı, antitusif, sindirim sistemi düzenleyici ve antienflamatuar etkileri olduğu bilinmektedir. Son çalışmalar Türkiye'deki *Sideritis* türlerinin farelerde sinir sistemi uyarıcısı veya anti-stress aktiviteleri olduğunu göstermiştir. Bazı *Sideritis* türlerinin antienflamatuar etkileri olduğu ve romatizma tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [21].



<b>Kingdom</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subkingdom</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclass</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Order</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Family</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genus</b>	<i>Sideritis</i>
<b>Species</b>	<i>Sideritis trojana</i> Bornm.

**Şekil 1.3 :** *Sideritis trojana* Bornm.

(Foto : Tuncay DİRMENCİ)

#### 1.1.4 *Stachys tmolea* Boiss. (Dağ çayı, Eşekotu, Tüylü çay)

Boyu 20-55 cm, gövdeleri yükselici-dik, tek ya da az dallı, aşağıda kısa basık tüylü, yukarıda dağınık örümcek ağımsı tüylü ve az çok çıplaklaşan, çok yıllık bitkilerdir [20].

**Tablo 1.5 :** *Stachys tmolea*'nın Yayılışı

Çiçeklenme Dönemi	Mayıs-Ağustos
Habitat	Kireçtaşı kayalıkları, orman altı açıklıkları aşınmış bayırlar, çalılıklar, 200-1900 m
Türkiye'de Yayılış	Batı Anadolu
Kazdağları'nda Yayılış	Susuz tepe



<b>Kingdom</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subkingdom</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclass</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Order</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Genus</b>	<i>Stachys</i>
<b>Species</b>	<i>Stachys tmolea</i> Boiss.

**Şekil 1.4 :** *Stachys tmolea* Boiss

(Foto : Ekrem AKÇİÇEK).

#### **1.1.5 *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil. (Dağ çayı, Eşekotu, Tüylü çay)**

Tabanda verimsiz roset yaprakları bulunan çok yıllık bitkilerdir. Gövdesi dik, dallanmış ya da dallanmamış, genellikle yoğun ya da dağınık, gövdeye yapışık grimsi yumuşak tüylüdür [14].

Yüzyıllar boyunca tümörler, dalak skleroz, enflamatuar hastalıklar, öksürük, ülserler, enfekte yaralar gibi birçok hastalıkları tedavi için halk ilacı olarak kullanılmaktadır. *Stachys* içinde yapılan fitokimyasal çalışmalar flavonoidler, tanen, fenolik asitler, fenil, ethanoid glikozitler ve polifenollerin varlığını göstermiştir [22].

**Tablo 1.6 :** *Stachys cretica*'nın Yayılışı

Çiçeklenme Dönemi	Nisan-Ağustos
Habitat	<i>P. nigra</i> ormanında kireçtaşı kayalıkları, 5-1400 m
Türkiye'de Yayılış	Kuzeybatı, Batı ve Güney Anadolu
Kazdağları'nda Yayılış	Susuztepe

[14].



<b>Kingdom</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subkingdom</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Class</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclass</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Order</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Genus</b>	<i>Stachys</i>
<b>Species</b>	<i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.

**Şekil 1.5 :** *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil.

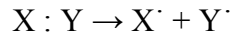
(Foto : Ekrem AKÇİÇEK)

## 1.2 Serbest Radikaller

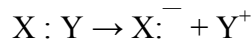
Bağımsız olarak bir veya daha fazla ortaklanmamış elektrona sahip atom veya moleküller serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif yapıya sahiptir. Bir serbest radikal ortaklanmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir, diğer bir molekülden elektron alabilir ya da radikal olmayan moleküle bağlanabilir [23,24,25]. Yaşam sürelerinin kısa olmalarının yanında organik veya inorganik olabilen bu radikaller; pozitif, negatif yüklü ya da nötr halde bulunabilirler [26,27]. Kısa ömürlerinden dolayı serbest radikallerin oksidatif hasarı serbest radikal ara basamaklarını içeren zincir reaksiyonları tarafından gerçekleştirilir. Bir serbest radikal, radikal olmayan başka bir molekül ile reaksiyona girerek yeni bir serbest radikal oluşturur. Oluşan yeni serbest radikal de başka moleküllerle reaksiyona girer [28].

### 1.2.1 Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

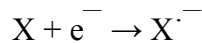
1. Kovalent bağların homolitik bölünmesi: Kovalent olarak bağlanmış bir molekülün, bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan birisi kalır.



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden tek bir elektron kaybı sırasında dış orbitalinde ortaklanmamış elektron kalarak radikal formu oluşur [29,30].



3. Normal bir moleküle elektron transferi: Normalde radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron meydana gelirse, bu tür indirgenme reaksiyonları radikal oluşumuna neden olabilir [31].



Serbest radikallerin kaynakları iç ve dış kaynaklar olarak ikiye ayrılabilir. İç kaynaklar olarak; mitokondrial elektron taşıma, otooksidasyon reaksiyonları, enzim reaksiyonları, fagositik hücreler (monosit ve makrofajlar, nötrofil, eozinofil) ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar sıralanabilirken, dış kaynaklar olarak diyet faktörleri, ilaçlar, sigara dumanı, iyonize radyasyon, UV ışık, kimyasal karsinojenler, çevresel kirlilikler, stres, pestisitler, toksinler gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar sıralanabilir [25,32]. Serbest radikallerin artışı bu şekilde iç ve dış etkenlere bağlı olarak sıralandığında başta membran fosfolipitleri olmak üzere hücresel bileşiklerin tümüne (karbonhidrat, lipit, protein, DNA) zarar vermekte, membranlar depolarize olmakta, parçalayıcı enzimlerin aktivitesi artmakta, hücre zarının permeabilitesi ve elektrik yük dengesi değişmektedir [33,34,35]. Ayrıca eksik elektronu olan moleküllerle rahatça alışverişe girerek onların yapısını bozabilmelerinin yanı sıra makromoleküllerle de reaksiyona girerek hücresel hasara da neden olmaktadır. Serbest radikaller alzheimer, parkinson, down sendromu, diyabet, nefrit, hepatit, katarakt, pnömoni, astım, hipoksi ve glokom gibi pek çok hastalığa neden olabilirken bunların en önemlisi kanserdir [36,37].

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Bunlar Reaktif Oksijen Türleri (ROT); Süperoksit ( $O_2^{\bullet}$ ), Hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ), Peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ ), Alkoksil ( $RO^{\bullet}$ ), Hidroperoksil ( $HO_2^{\bullet}$ ) ve Reaktif Azot Türleri (RNS); Nitrik oksit ( $NO^{\bullet}$ ), Azot dioksittir ( $NO_2^{\bullet}$ ) [38].

### 1.2.2 Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle oluşan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) biyolojik sistemlerde en çok görülen radikallerdir [39,40]. Enzimatik reaksiyonlar sonucu üretilebilirlerken, UV ışığı, X-ray, atmosferde kirlilik gibi dış etmenlere bağlı olarak da üretilebilirler [41]. Bu radikaller, canlı sistemlerdeki kararsız gruplarla kolay bir şekilde reaksiyona girerler. Hücre ölümü, yaşlanma ve birçok hastalığa neden olabilen zararlı ürünlerdir. Biyolojik membran lipitleri, kolayca oksitlenebilen çoklu doymamış yağ asitlerini içerirler. Özellikle bu yağ asitleri reaktif oksijenin ara ürünlerinden etkilenerek hücre ölümüne yol açar [42]. Reaktif oksijen türleri şunlardır:

### 1.2.2.1 Süperoksit ( $O_2^{\bullet}$ )

Süperoksit; aerobik hücrelerde serbest radikal reaksiyonları sonucu oluşan ya da serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olan radikaldir. Oksijenin elektronlarından birinin enerjisi alarak kendi hareketinin tersi yönündeki başka bir orbital ile yer değiştirmesi ile meydana gelen ilk üründür. Endojen oksijen radikallerinin en büyük kaynağı olan süperoksit radikali hem oksitleyici, hem de redükleyici özelliğinin yanı sıra hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarını indirgemesi nedeniyle çok önemlidir [23,43,44,45].

### 1.2.2.2 Hidroksil ( $OH^{\bullet}$ )

Hidrojen peroksit ile süperoksit radikalinin reaksiyona girmesi sonucunda ortaya çıkan hidroksil radikali, açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzaktaki hücre bileşenleri ile difüzyona bile gerek kalmadan reaksiyona girebildiği için en aktif ve en toksik serbest radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen, olduğu yerdeki bütün biyolojik molekülleri etkileyebilir [26,46,47].

### 1.2.2.3 Peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ )

Yarılanma ömrü saniye düzeyinde olan peroksil radikali, genellikle gıdalarda ve biyolojik örneklerde bulunur ve lipid oksidasyonunun zincir kırıcı reaksiyonları boyunca açığa çıkar. Peroksil radikalının antioksidanlarla olan reaksiyonu hedef moleküle olan reaksiyonuna göre daha hızlıdır. Bu nedenle peroksil radikali ortamda bulunan tüm antioksidanlar tükendikten sonra hedef moleküllerle reaksiyona girer [48,49].

### 1.2.2.4 Alkoksil ( $RO^{\bullet}$ )

$Fe^{+2}$  gibi geçiş metallerinin lipid hidroperoksidi indirgemesi ile oluşur, okside low-density lipoprotein (LDL) oluşturarak hücre ölümüne yol açar [50].



### 1.2.2.5 Hidroperoksil (HO<sub>2</sub>•)

Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşan hidroperoksil radikali, süperoksitten daha güçlü bir oksidan ve daha güçlü bir indirgeyici olmasının yanında biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle doğrudan etkileşime girebildiği için çok önemlidir [51,52,53].

Reaktif oksijen türleri, doğada radikal veya radikal olmayan formlarında bulunabilir. O<sub>2</sub>'in ilk elektronla indirgenmesinin ardından süperoksit anyon radikali (O<sub>2</sub>•-) oluşur. İkinci elektronun ve 2H'nin eklenmesinden sonra ise süperoksit anyon radikali hidrojen peroksite (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dönüşür. Hidrojen peroksite üçüncü elektronun eklenmesiyle de çok reaktif olan 21 hidroksil radikali (.OH) meydana gelir ve ortama bir OH- iyonu salınır. Son olarak dördüncü elektronun eklenmesiyle de su molekülü (H<sub>2</sub>O) oluşur [7].

### 1.2.3 Reaktif Azot Türleri (RNS)

#### 1.2.3.1 Nitrik oksit (NO•)

Hücre sel düzeyde koruyucu etkilerinin olmasına rağmen oksidatif stres altında süperoksit radikali ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit çok güçlü bir oksidandır. Nitrik oksitin fizyolojik şartlarda süperoksit radikaliyle birleşmesi oldukça sınırlıdır. Çünkü oluşan süperoksit radikali, hücrede yüksek konsantrasyonda bulunan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından kolaylıkla ortadan kaldırılabilmektedir [54,55].

#### 1.2.3.2 Nitrik dioksit (NO<sub>2</sub>•)

Nitrik oksit (NO), renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO, oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterirken düşük konsantrasyonlardaki NO oksijen varlığında daha stabildir. Havadaki NO kısa sürede O<sub>2</sub> ile oksitlenerek nitrik dioksite dönüşür. Nitrik dioksit dokular için oldukça zararlı

bir bileşiktir. Nitrik dioksitin üzerinde yük taşınmaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır [47].

Reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin(RNS) yaşlanma, oksidatif stres ve bazı patolojik koşullar altında fizyolojik ve non-fizyolojik etkilerle ortaya çıkmasıyla beraber en belirgin özellikleri olarak *in vivo* makromoleküllerde kalıcı hasar oluşturmaları gösterilebilir [34,56]. Bu etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta antioksidanlar olarak bilinen bir savunma sistemi gelişmiştir. Belirli düzeyi aşmış oksidan moleküllere doğrudan etki ederek onları etkisiz hale getiren moleküller olarak bilinen antioksidan terimi, serbest radikal oluşumunu geciktiren veya ortadan kaldıran tüm işlemleri kapsamaktadır [24,57].

### **1.3 Antioksidanlar**

Canlı organizmalarda serbest radikallerin oluşumunu sınırlandıran ya da oluşan serbest radikalleri zararsız hale getiren sistemlere antioksidanlar denilmektedir [58]. Antioksidanlar, belirli düzeyi aşmış oksidan moleküllere doğrudan etki ederek onları etkisiz hale getiren moleküllerdir [24].

Oksidasyon birçok canlı organizmadaki biyolojik sürecin gerçekleşmesi için gereken enerjinin üretiminde temel bir gereksinimdir [45]. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve böylece canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir. Bu durum “oksidatif stres” şeklinde ifade edilmektedir [59]. Oksidatif stres; oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin değişimi olarak da tanımlanabilmektedir [25,60].

### 1.3.1 Antioksidanların Serbest Radikallere Etkileri

- 1) Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya onları daha zayıf yeni moleküle çevirme [61]. Antioksidan enzimler, trakeobronsiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler [3].
- 2) Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktiviteilerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme [61]. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki ederler [38].
- 3) Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini kendine bağlayarak reaksiyon zincirini durdurulması [61]. Hemoglobin, seruloplazmin ve ağır metaller bu şekilde etki ederler [38].
- 4) Onarıcı Etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir [52].

Antioksidan sistem; serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar [3].

### 1.3.2 Antioksidan Savunma Sistemi Hücre İçi ve Hücre Dışı Olarak İkiye Ayrılır

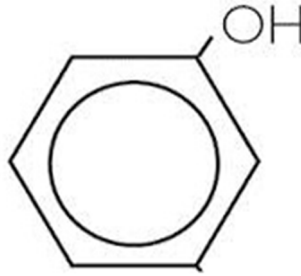
Hücre içi savunma sistemi kendi içerisinde enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanları, SOD, katalaz (CAT), glutatyon s-transferazlar (GST), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD)'dir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; glutatyon (GSH), membranlara bağlanabilen  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir. Hücre dışı savunma sistemi ise; metallotionin gibi serbest radikal yok edicileri ve Zn gibi iz elementlerden oluşur [58].

Gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmakta olan sentetik koruyucu maddelerin kanserojen etkilerinden dolayı, son yıllarda doğal antioksidanların kullanımına yönelik araştırmalar artmıştır. En önemli doğal antioksidan kaynağı olarak bilinen tıbbi ve baharat bitkilerinin kullanımına önem kazanmıştır [38].

#### 1.4 Fenolik Bileşikler

Bitkiler aleminde doğal olarak bulunan ve ikincil metabolitler olarak adlandırılan, benzen halkası içeren organik maddelere fenolik bileşikler denilmektedir [62,63].

Genellikle serbest halde olmayıp ester ya da glikozit formda bulunmalarının yanında birden fazla OH grubu içeren fenolik bileşikler hidrofilik özellik gösterir ve su gibi çözücülerde kolayca çözünebilmektedirler [64].



Şekil 1.6 : Fenol Halkası

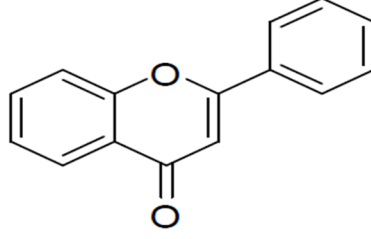
Meyve ve sebzelerin kendilerine has renk, tat, aroma ve dokuya sahip olmalarını sağlayan bu bileşikler, bitki bünyesinde meydana gelen birçok metabolik olayda da önemli rol oynamaktadırlar [65,66]. Bitkilerde hastalık direnç mekanizmasına katkıda bulunmalarının yanında bitkiler için bir savunma mekanizması olarak üretilmekte olup stres arttıkça miktarları da artmaktadır. Fenolik bileşikler bitkilerin normal gelişim sırasında sentezlendiği gibi bitki hastalandığında ve yaralandığında da sentezlenmektedir. Ayrıca fenolik madde üretimi çevre koşullarına da bağlı olup; UV ışınlarına maruz kalındığında, düşük sıcaklıklarda, ortamda nitrojen, fosfat ve demir miktarı düşük olduğunda da sentezlenirler [62].

Fenolik bileşiklerin, bitkileri UV ışınlardan koruma ve hastalıklara karşı direnç kazandırma gibi çeşitli rolleri bulunmaktadır [67]. Ayrıca fenolik bileşikler, gövde uzamasının düzenlenmesi ve meyve olgunlaşması gibi önemli olaylarda da görev almaktadırlar [68]. Fenolik bileşikler, tat, aroma, çiçek ve meyvelerin renklenmesi gibi kalite unsurlarını belirlemelerinin yanı sıra, tür ve çeşitlerin birbirinden ayrılmasına yönelik taksonomik çalışmalarda da önem taşıyan bileşiklerdir [65]. Fenolik bileşiklerin yukarıda değinilen ve bitkiler üzerinde sahip oldukları özelliklerinin yanı sıra, insan sağlığı üzerinde son derece önemli etkilerde buldukları pek çok araştırma sonucu ile belirlenmiştir. Fenolik bileşikler, serbest radikalleri bağlama yeteneği olan antioksidan bileşiklerdir [69]. Sahip oldukları –OH grubu sayesinde, peroksi radikali ( $RO_2\bullet$ ) gibi reaktif radikalleri nötralize eder ve sistemin antioksidan etkisine doğrudan katkıda bulunurlar [70]. Vücutta oluşan serbest radikalleri nötralize ederek kalp-damar hastalıklarını engeller ve hatta yaşlanmayı da geciktirirler. Ayrıca patojenler tarafından toksin üretimini bastırır veya bunların ürettiği toksinleri detoksife ederler [71]. Fenolik bileşikler, yüksek kimyasal aktiviteye sahip oldukları için DNA, enzimler ve proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı serbest radikallere karşı savunma gösterebilmektedirler [72].

## 1.5 Flavonoidler

Sarı renkli olmalarından dolayı latince ‘sarı’ anlamına gelen ve ‘flavus’ sözcüğünden türetilerek ‘flavonoid’ adını alan bu fenolik bileşikler sebze ve meyvelerde, kuruyemişlerde, çay, kahve ve kırmızı şarap gibi içeceklerde bulunmalarının yanında tıbbi bitkilerde de bulunmaktadır [73,74]. Bitkilerin kök, sap, çiçek, polen, meyve ve tohum gibi birçok yerinde bulunan flavonoidler bitkilerin ikincil metabolitleri olmasına rağmen yaşamlarını sürdürebilmek için kullandıkları karbohidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türetilirler [42,73].

Bitkilerdeki antioksidan etkiyi sağlayan başlıca moleküller flavonoidlerdir. Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan difenil propan ( $C_6-C_3-C_6$ ) yapısındaki fenolik bileşiklerdir.



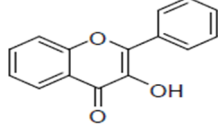
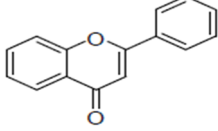
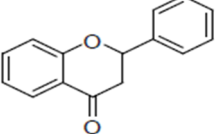
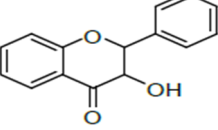
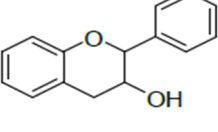
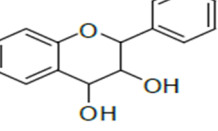
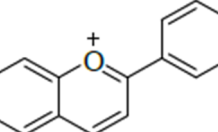
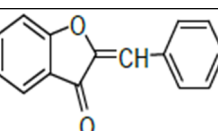
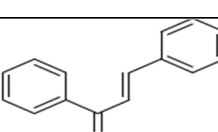
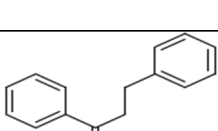
**Şekil 1.7 :** Flavonoidlerin genel yapısı

Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilen polifenoller önceleri bitki fizyolojisindeki rolleri ve bitkilerin renk ve lezzet özellikleri üzerindeki etkileri nedeniyle ele alınmakta iken, son yıllarda sağlık üzerindeki etkileri ön plana çıkmış, özellikle antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonları nedeniyle dikkat çekmeye başlamışlardır [73,75,76]. Günümüzde 8000 flavonoid tanımlanmış olmasına rağmen, beslenme ilgili olarak çok azı önem taşımaktadır [77,78]. Flavonoidleri içeren doğal ürünler biyokimyasal ve farmakolojik olarak birçok etkiye sahiptir. Doğal antioksidanların birçoğu özellikle de flavonoidler çok çeşitli biyolojik etkiler sergilerler [79,80]. Flavonoidlerin kanserden koruma etkisi, serbest radikal temizleme, karsinogenleri detoksifiye eden enzimleri modifiye etme gibi mekanizmalara dayandırılmaktadır [81,82]. Ayrıca iki benzene halkası ve ortada üçüncü bir aromatik halkayla oluşmuş olan bu bileşikler canlılarda gösterdikleri birçok fizyolojik özellikleri ile de ön plandadırlar [83]. Örneğin ultraviyole radyasyonlar, patojenler ve herbivorlara karşı bitkileri korurlar [84]. Flavonoidlerin diğer önemli bir etkisi de sitotoksik aktivitelerinin olmasıdır. *Eupatorium* türlerinde bulunan metoksiflavonların tümör inhibitörü olduğu tespit edilmiş ve hücre kültüründe insanda nazofarinks kanserlerine karşı orta derecede etkili olduğu gösterilmiştir [85].

### 1.5.1 Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavaonoidler antosiyanin ve antosantinler olarak gruplandırılmıştır. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozidleridir. İskelet yapılarındaki farklılıklarından dolayı antosantinler, flavonol, flavanol, flavon, flavan, izoflavon olarak alt gruba ayrılırlar (Tablo 1.7) [73,85].

**Tablo 1.7 : Flavonoidlerin Sınıflandırılması**

Flavoneller	
Flavonlar	
Flavononlar	
Flavanoneller	
Katekinler	
Loykatekinler	
Antosiyanidinler	
Auronlar	
Kalkonlar	
Dihidrochalkonlar	

[86].

Flavonoidler, serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak metallerin sebep olduğu peroksidasyonu azaltarak antioksidan özellik gösterirler [87].

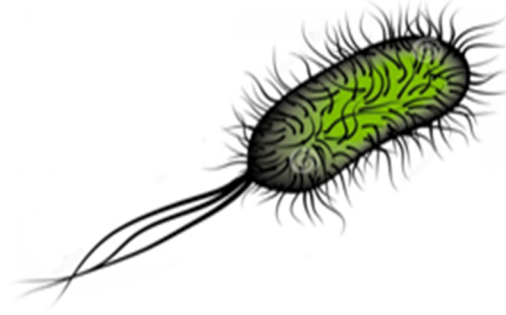
## 1.6 Antimikrobiyal Aktivite

Gıda, ecza ve kozmetik gibi alanlarda çeşitli bakteri, küf ve maya türlerine karşı aromatik bitkiler ile çalışmalar yapılmaktadır [88]. Tıbbi bitkiler ile baharat bitkileri antimikrobiyal etkiye sahip oldukları için yiyeceklerdeki mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajan kaynağı olarak görülmektedirler [89,90]. Doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermekte ve bu uçucu yağlar bazı mayalar ve bakterilerin gelişimlerini engellediği için yiyeceklerin doğal koruyucusu konumundadırlar [91,92]. Antibiyotiklere karşı savunma sistemlerini geliştiren bakterilerin her geçen gün ilaçlara karşı olan dirençliliği artmaktadır. İlaçların alternatifi olarak tıbbi bitkilerin kullanılması yaygınlaştığından bazı geleneksel bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır [93]. Antimirobiyal aktivitenin belirlenmesinde bazı bakteriler kullanılmaktadır.

### 1.6.1 *Escherichia coli* ATCC-8739

*E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasında *Escherichia* genusuna aittir ve ilk kez 1885 yılında Alman pediatrist olan Theodor Escherich tarafından ishali süt çocukların dışkılarından elde edilmiş olup *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmış, daha sonra 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins ismi verilmiştir. *Escherichia coli*, memelilerin ve kuşların bağırsak florasında yaşayan, yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde gram negatif bir bakteri türüdür [94,95,96,97].





**Şekil 1.8 : *Escherichia coli***

*E. coli*'nin en kayda değer özelliği hastalığa neden olan genotiplerinin yaygın çeşitliliğidir [98]. Belirli koşullar altında insan ve hayvanlar için patojen olup, gerek yangı, gerekse sürgün şeklinde ortaya çıkan bağırsak hastalıklarına neden olmaktadır. Özellikle idrar yolları, safra kesesi ve safra yolları, akciğer, periton ve menenjlere ulaşan *E. coli* bakterileri önemli hastalıklara yol açar. Ancak normal insan bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakterileri ve organizmaları ile bir denge altında kaldığı sürece hastalık yapmazlar [99]. Patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyici rol oynar. 1960'lardan itibaren bazı *E. coli* kökenlerinin bağırsakta da patojen olduklarına ilişkin bilgiler artmaya başlamıştır. *E. coli* bağırsak dışında çok çeşitli infeksiyonlar oluşturabilen önemli bir fırsatçı patojendir [100].

### **1.6.2 *Staphylococcus aureus* ATCC-6538**

0.5-1.5 µm çapında, üzüm salkımı şeklinde topluluklar oluşturan ve bazik boyalarla kolay boyanabilen hareketsiz, sporsuz gram pozitif bir bakteridir. Genellikle kapsülsüz olmakla beraber nadiren kısıtlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler [101,102].



**Şekil 1.9 :** *Staphylococcus aureus*

Optimal üreme ısısı 30-37°C olmasına rağmen geniş bir ısı aralığında (6.5-45°C) üreyebilen, aerop ve fakültatif anaerop bakterilerdir [101,103]. İnsan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda enfeksiyonlara neden olarak deride abseler, sivilce, sakal-kıl kökleri yangısı, kan çıbanı, ter bezi yangısı, arpacık, deri döküntüleri gibi hastalıklar meydana getirirler [101].

### 1.7 Sitotoksik Aktivite

Sitotoksik aktivite testleri, negatif ve pozitif kontrol gruplarının kullanılarak test edilecek maddenin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine değerlendirilmesini kapsayan bir yöntemdir [104,105]. Bu yöntem ile değişik parametreler kullanılarak test edilecek maddelerin; hücre sayısı, büyümesi ve ölümü, hücre membran bütünlüğü, biyosentez veya enzim aktivitesi ve hücre genetik materyali üzerindeki etkilerinin ölçülmesine olanak sağlanmaktadır [106,107]. Sitotoksiste, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için de kullanılmaktadır [108].

Bir materyalin sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan testler; tekrarlanabilmeli, hücre sayısı ve test sonucu arasında doğrusal bir ilişki olmalı ve test sonucunda elde edilen veriler *in vivo* koşullarda yorumlanabilmelidir [109].

### 1.7.1 *In vitro* Sitotoksisite Testlerinin Avantajları

- Diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon değerlendirilir,
- Birçok örnek kısa sürede ve ekonomik bir şekilde araştırılabilir,
- Kantitatif sonuçlara ulaşılabilir,
- Testler için kullanılan hayvan sayısı minimuma indirilebilir,
- Hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizması ortaya çıkarılabilir,
- Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemler ile üretimin ilk safhalarında ortaya çıkarılması [107,110].

### 1.7.2 *In vitro* Sitotoksisite Testlerinin Dezavantajları

- Her bir hücrenin tek bir test için kullanılması,
- Konak hücreleri ile kültür hücrelerinin farklı olması,
- Kültür ortamında doku koruyucu mekanizmalarının bulunmamasıdır [109].

*In vitro* sitotoksisite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesini de belirler [111].

## 1.8 Literatür Özeti

Çabuk, 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada *Sideritis libanotica* ssp. *linearis* bitkisinin üzerine yaptığı çalışmada sekonder metabolitleri kromatografik yöntemlerle (kolon kromatografisi, PTLC) izole etmiş ve izole edilen bu moleküllerin antioksidan aktiviteleri inceleyerek flavonların yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri belirlemiştir [3].

Yumrutaş, 2011 yılındaki çalışmasında, Gaziantep ilinde doğal olarak yetişen ve *Lamiaceae* familyasına ait *Ajuga chamaepitys*, *Lallemantia iberica*, *Lamium amplexicaule*, *Marrubium parviflorum*, *Mentha pulegium*, *Moluccella laevis*, *Phlomis armeniaca*, *Salvia multicaulis*, *Salvia palaestina*, *Salvia syriaca*, *Satureja aintabensis*, *Scutellaria tomentosa*, *Teucrium polium* ve *Ziziphora capitata* türlerinin metanol, *n*-hekzan ve uçucu yağ özütlelerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS, demir indirgeme gücü, metal şelatlama,  $\beta$ -karoten/linoleik asit ve DNA koruma etkileri araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda bitkiler arasında en yüksek antioksidan aktiviteye *Teucrium polium*'a ait metanol özütünün sahip olduğu belirlemiştir ( $p < 0.05$ ). Analizler sonucunda en yüksek total fenolik içeriğin yine *T. polium*'da olduğu tespit edilmiştir. Yapılan korelasyon analizlerinde fenolik bileşiklerle antioksidan aktiviteler arasındaki ilişki pozitif olarak önemli bulunmuştur [12].

Şen, 2011 yılında yaptığı çalışmada *Malvaceae* familyasına ait *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerini incelemiştir. Toplam fenol içerik için Folin-Ciocalteu metodu, antioksidan aktivite için DPPH serbest radikali giderme metodu ve antimikrobiyal aktivite için ise; disk difüzyon metodlarını kullanmıştır. Toplam fenolik madde tayini sonucunda, ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak  $53.84 \pm 0.008$  –  $45.38 \pm 0.002$  mg/g aralığında değiştiği belirlendi. Etanol ekstraktı en yüksek fenolik madde miktarına sahiptir. Serbest radikal giderme aktivitesinden elde ettiği verilere göre su ve etanol ekstraktlarının 500 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonları standart maddelerle karşılaştırılabilir düzeyde DPPH giderme aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Aseton ekstraktının DPPH giderme aktivitesi bakımından zayıf olduğu da gözlemlenmiştir [25].

Kozan, 2012 yılında yapmış olduğu çalışmasında *Amaryllidaceae* familyasında yer alan *Allium sativum* L. (Kastamonu ve Denizli Yerel) uçucu yağlarının, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus licheniformis* NRRL-B-1001, *Bacillus cereus* NRRL-B-3711, *Escherichia coli* MC-4100, *Pseudomonas aeruginosa* NRRL-B-2679, *Enterobacter aerogenes* NRRL-B- 3567, *Citrobacter freundii* NRRL-B-2643 ve *Providencia stuartii* suşları ile antibakteriyel etkileri üzerine disk difüzyon metodu kullanarak bu bitkilerin yüksek oranda antibakteriyel aktivitesi gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. En yüksek antibakteriyel aktiviteyi *Bacillus licheniformis* NRRL-B-1001 üzerinde Kastamonu sarımsağı (17 mm) göstermiştir. Ayrıca bitkilerin toplam antioksidan kapasitesine ABTS metodu ile toplam fenolik içeriğine ise Folin-ciocalteu metodu ile bakmıştır. Bulduğu sonuçlara göre, Kastamonu sarımsağının toplam antioksidan kapasitesi (0,551 mM/g) ve toplam fenolik madde içeriği (5,418 mM/g), Denizli sarımsağının toplam antioksidan kapasitesi (0,513 mM/g) ve toplam fenolik madde içeriğinden (4,499 mM/g) yüksek çıkmıştır [38].

Aksoy, 2010 yılındaki çalışmasında, ülkemize ait bazı kırmızı şarapların fenolik madde profillerini araştırmıştır. Çalışmada fenolik kompozisyon hakkında bilgi edinmek için toplam antosiyanin, toplam tanen ve toplam fenol analizleri spektrofotometrik spektrofotometrik olarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda bulgular arasındaki farklılıkların üzüm çeşidi ve olgunluğu, uygulanan yetiştirme yöntemleri, bağ ve bağın konumu, iklim, toprak özellikleri, bölge, hasat zamanı, şarap işleme teknikleri, depolama koşulları ve süresi gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabileceği sonucunu çıkarmıştır [63].

Tenderis, 2010 yılında parçalanmış ve bütün haldeki çekirdeklerden farklı sıcaklık, süre ve çözücü oranlarında ekstraksiyon gerçekleştirmiş ve her koşul için toplam fenolik madde içerikleri belirlemeye çalışmıştır. Çalışmada partikül boyutunun küçülmesi, sürenin ve sıcaklığın artması ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin artmasını sağlamış; ancak bütün haldeki üzüm çekirdeğinin ekstraksiyonunda saflığı daha yüksek fenolik madde elde ettiği rapor edilmiştir [66].

Pişkin, 2007 yılında yapmış olduğu çalışmasında, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* bitkilerine ait uçucu yağları mikrodilüsyon yöntemi ile *Bacillus cereus* ATCC-14579, *E. coli* ATCC-25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri üzerine etkilerini araştırmıştır. Uçucu yağlara karşı en hassas bakteri *E. coli* ve en dayanıklı bakteri *Salmonella typhimurium*'dur. *Salvia officinalis* uçucu yağının *B. cereus*'a, *R. officinalis* uçucu yağının *E. coli* ve *S. aureus*'a, *M. piperita* uçucu yağının *E. coli* ve *B. Cereus*'a, *O. vulgare* uçucu yağının *E. coli*, *B. Cereus*, *S. typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı kuvvetli antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmiştir. “Tüm bitkilerin uçucu yağları antimikrobiyal etki göstermiş ancak en etkili olan *O. vulgare* uçucu yağdır” sonucuna varmıştır [97].

Aydın, 2008 yılında yaptığı çalışmasında *Salvia tomentosa*, *S. virgata*, *S. hypargeia*, *S. staminea* ve *S. caespitosa*'dan elde edilen metanol özütlerinin *Acanthamoeba castellani* üzerindeki *in vitro* etkinliği ve ayrıca kornea hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmıştır. Testlerden elde edilen sonuçlara göre, *S. tomentosa*, *S. virgata* ve *S. hypargeia* herhangi bir amoebisidal aktivite göstermemiş, diğer taraftan *S. caespitosa* ile karşılatırılacak olursa, *S. staminea*, *A. castellani* üzerinde kayda değer bir amoebisidal aktivite sergilemiştir. *S. staminea* metanol özütü ayrıca, kültürdeki hücreler üzerinde 16.0 mg/mL konsantrasyonda sitotoksik etki göstermemiştir. Sonuç olarak da *S. staminea*'dan elde edilen metanol özütünün, *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir yeni ve alternatif bir doğal ürün olduğu düşünölmektedir [112].

Modanlıoğlu, 2012 yılında yaptığı çalışmasında Van' ın Gevaş ilçesinden toplanan ve *Asteraceae* familyasına ait *Inula peacockiana* bitkisine ait petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan ve HPLC analizi ile de fenolik madde içeriği belirlemiştir. En iyi sonuçları petrol eteri ekstresi *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* üzerinde 0.1 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit, 3.1 mg/mL konsantrasyon değerinde ise *Fusarium proliferatum* üzerinde fungusit etkisini bulmuştur. Antioksidan aktiviteyi DPPH metodu kullanılarak ve toplam fenol miktarını ise; Folin-Ciocalteu metoduyla incelenmiş olup, metanol ekstresinin en yüksek toplam fenol miktarına sahip olduğu belirlemiştir (172 mgGA/gr) [113].

Aksu, 2010 yılındaki çalışmasında fitoterapide en çok kullanılan bitkiler arasında bulunan ıhlamur ve nane bitkilerindeki toplam fenol/flavonoid miktarlarının ve antioksidan kapasitesinin metal içeriği ile ilişkisini incelemiştir. Bunun için toplam fenol/flavonoid miktarlarının belirlenmesinde UV-VIS spektroskopisi ve metal içeriğinin belirlenmesinde ICP-OES ile çalışmıştır. Toplam fenol tayini için gallik asit ve toplam flavonoid tayini için kuersetin standart olarak kullanılırken, antioksidan aktivitesi DPPH süpürme aktivitesi metodu kullanılmıştır. Aksu, nane ve ıhlamur örneklerinde metal, toplam fenol/flavonoid miktarlarının ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için demleme (infüzyon), kaynatma (dekoksasyon), kuru yakma ve ekstraksiyon işlemleri uygulamış sonuç olarak da toplam fenol ve toplam flavonoid miktarlarının en yüksek, demleme yöntemiyle bulunduğunu belirlemiştir. Metal içeriğinin ise kaynatma ve demlemeye göre kuru yakma işlemiyle daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Poşet çay halinde tüketilen ıhlamur ve nane çaylarındaki antioksidan aktivitesi, işlenmemiş ıhlamur ve nane çaylarında belirlenen antioksidan aktivitelerinden daha düşük olduğunu tespit etmiştir [114].

Emen, 2006 yılında yaptığı çalışmalarda *Cyclotrichium niveum* bitkisinin tüm kısımlarının (dal+yaprak+çiçek) metanol, etilasetat ve *n*-bütanol ekstraktlarının antioksidant aktiviteleri araştırmıştır. Toplam fenolik bileşen miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemiyle belirlenmiştir. *C. niveum* bitkisinin metanol, etilasetat ve *n*-bütanol ekstraktlarının antioksidant aktiviteleri *in vitro* sistemde farklı antioksidant testler kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar *C. niveum* bitkisinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [115].

## 1.9 Çalışmanın Amacı

İnsanlar eski çağlardan bu yana bitkilerden birçok alanda, özellikle de gıda ve sağlık alanında faydalanmaktadırlar. Dünya nüfusunun her geçen gün hızla artması nedeniyle sentetik ürünlere olan ilgi de aynı oranda artış göstermiştir. Ancak bilim ve teknolojinin gelişmesi bu ürünlerin barındırdığı yan etkileri ortaya çıkarmış ve bu durum doğal kaynaklı ürünlere olan yönelimin tekrar başlamasına neden olmuştur. Bu çalışmada, Kazdağları'ndan (Balıkesir) toplanan bazı *Lamiaceae* türlerinin (*Salvia tomentosa* Miller., *Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papanikolaov & Kokkini), *Sideritis trojana* Bornm., *Stachys tmolea* Boiss. ve *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil.) antioksidan kapasite, toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin yanında toplam protein miktarlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilecek bulguların ülkemizin bitkisel kaynak kullanımına önemli ölçüde katkıda bulunması beklenmektedir.



## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri 2013 yılı Mayıs ayında Kazdağları'ndan temin edilmiştir. Lamiaceae familyasına ait 5 tür (*Sideritis perfoliata* L. ssp. *athoa* (Papan. & Kokkini), *Sideritis trojana* Bornm, *Stachys tmolea* Boiss. ve *Stachys cretica* L. *smyrnaea* Rech fil.) toplanmış ve bitki örnekleri Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından teşhis edilmiştir.

**Tablo 2.1 :** Bitkilerin Toplandığı Mevkii ve Yükseklikler

Bitkiler	Mevkii	Yükseklik
<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	Sarıköz	1580 m
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	Eşek deresi	1430 m
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	Sarıköz	1720 m
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	Susuztepe	1300 m
<i>Stacchys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	Susuztepe	1200 m

Toplanan bitkiler distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra bilyalı değirmen (Retsch PM100) ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki örnekleri cam kavanozlara konularak oda sıcaklığında saklanmıştır.

## **2.2 Metot**

### **2.2.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

<b>1. Lamda 35 UV-Visible</b>	Perkin Elmer
<b>2. pH metre</b>	Orian 920A
<b>3. Otomatik pipetler</b>	Eppendorf
<b>4. Terazî</b>	Denver
<b>5. Etüv</b>	Memmert
<b>6. Soğutmalı santrifüj</b>	Sigma 3K 30
<b>7. Manyetik karıştırıcı</b>	Heildolp
<b>8. Vorteks</b>	Warning
<b>9. İnkübatör</b>	Memmert
<b>10. Bilyalı Değirmen</b>	Retsch PM100
<b>11. Evaporatör</b>	Heildolp
<b>12. Mikroskop</b>	Olympus ckx 41
<b>13. Hücre Sayma Lamı</b>	Neubaver's chamber

### 2.2.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

DPPH Radikali	2,2-difenil-1-pikril hidrazil
NaNO <sub>2</sub>	Sodyum nitrit
NaOH	Sodyum hidroksit
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum klorür
AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum klorit
NaCO <sub>3</sub>	Sodyum karbonat
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
HBBS	Hanks Balanced Salt Solution
tBOOH	Üçüncül bütilatlı hidroperoksid
Metanol	% 80-100'lük
Tris base	
m-inositol	
Tryphan mavisi	
Folin-Ciocalteu Reaktifi	

### 2.2.3 Çözeltilerin Hazırlanışı

1. DPPH Radikal Çözeltisi : Taze olarak hazırlanması gereken DPPH radikal çözeltisi için DPPH radikalinden 0.024 gr tartılmış ve bir miktar saf suda çözdürüldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti ölçümler yapılncaya kadar karanlıkta bekletilmiştir.
2. Folin-Ciocalteu Reaktifi Çözeltisi : 0.25 mL tartılarak hazır hale getirilmiştir.
3. Hemoliz tamponu : Tris tamponundan 0.121 gr tartılmış ve üzerine 0.80 gr  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eklendikten sonra bir miktar saf suda çözülmüştür. Son hacim 100 mL'ye tamamlanarak pH 7.4'e ayarlanmıştır.
4. Tryphan mavisi : 0.1 gr Tryphan mavisi'nden tartılmış ve bir miktar saf suda çözdürüldükten son hacim 25 mL'ye getirilerek deneylerde kullanılmak üzere karanlıkta saklanmıştır.
5. BHA (0.4 mM) : 0.003 gr tartılmış ve bir miktar saf suda çözdürüldükten sonar son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
6. tBOOH (1 mM) : 0.01 mL alınmış son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
7.  $\text{NaNO}_2$  (% 5'lik 150  $\mu\text{L}$ ),  $\text{AlCl}_2$  (1 M, 1 mL), NaOH (% 20'lik 1 mL),  $\text{NaCO}_3$  (% 20'lik 1 mL), m-inositol (250 mM), Potasyum fosfat (0.174 gr).

### 2.3 Ekstraktların Hazırlanması

Öğütülen her örnekten 0,5 g tartılarak % 80'lik 5 mL metanol ilavesi yapılmış ve bir gece boyunca 4<sup>0</sup>C'de bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak kalan pelletin üzerine tekrar % 80'lik 5 mL metanol ilave edilmiş ve aynı işlem tekrarlanmıştır. Son olarak % 80'lik 2 mL metanol ile santrifüj edilen pelletin son hacmi 12 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra kullanılmak üzere -20<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir [116].

### 2.4 Antioksidan Aktivite Tayini

0,024 gr 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) reaktifi tartılmış ve bir miktar metanol ile çözdürüldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. DPPH reaktifi çözeltisi günlük taze olarak hazırlanmalı ve analizlere kadar karanlıkta bekletilmelidir [117].

250 µL'lik ekstraktlarımıza %100'lük 2500 mL metanol ile 2500 mL DPPH çözeltisi eklendikten sonra karanlıkta 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra ölçümler UV spektrofotometre ile 517 nm'de gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite hesaplamasında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{Antioksidan aktivite (\%)} = [ 1 - (\text{örnek absorbanısı} / \text{kontrol absorbanısı}) ] \times 100$$

[117].

### 2.5 Toplam Fenolik İçerik Tayini

Toplam fenolik içerik Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanarak bulunmuştur. 0.25 mL'lik ekstraktlarımıza 3.5 mL saf su ile 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. Kör denemelerimiz için % 80'lik 0.25 mL metanol kullanılmıştır. Yaklaşık 3 dakika sonra % 20'lik 1 mL sodyum karbonat (NaCO<sub>3</sub>) ilave edilerek tüpler vortekslenmiş ve 40 dakika boyunca 40<sup>0</sup>C'de su banyosunda bekletilerek oluşan mavi renk absorbanısı 685 nm'de kör denemeye karşılık tespit edilmiştir.

Toplam fenolik içerikler gallik asit kalibrasyon eğrisine göre belirlenmiş ve sonuçlar  $\mu\text{g}$  gallik asit/g örnek olarak hesaplanmıştır [117].

## 2.6 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

Toplam flavonoid miktarının tespitinde Ramful ve ark. (2011)'a ait yöntem kullanılmıştır. 150  $\mu\text{L}$  % 5'lik sulu  $\text{NaNO}_2$ 'den 2.5 mL bitki ekstraktlarına ilave edilerek vortekslenmiştir. Kör denemelerimiz için % 80'lik methanol, örneklerin yerine kullanılmıştır. 5 dakika bekletildikten sonra %10'luk 150  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  ilave edilmiştir. Bir dakika sonra 1M NaOH'den 1 mL karıştırılarak absorbanslar 510 nm'de kör numuneye karşılık okutulmuştur. Toplam flavonoid miktarları  $\mu\text{g}$  kuarsetin/g olarak belirlenmiştir [110].

## 2.7 Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite için disk difüzyon metodu uygulanarak hazır besiyeri olan triptik soy agar ve 2 farklı bakteri türü olan *E. coli*, *S. aureus* kullanılmıştır.  $10^{-4}$  oranında seyreltilen bakteriler 200  $\mu\text{L}$  besi yerlerine eklenmiş ve boş disklere yerleştirilmiştir. Bitki ekstraktlarından bir miktar eklenerek ve bir gece boyunca inkübatörde  $37.5^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Sonuçlar diyametrik mikrometre ile ölçülmüştür [118].

## 2.8 Sitotoksik Aktivite Belirlenmesi

İnsan periferel lenfositleri Smitha ve arkadaşlarının metoduna göre izole edilmiştir. 10 mL kan örneğine hemoliz tamponu (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM tris tamponu, pH:7.4) eklenerek 30 dk. boyunca  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 1500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Kalan pellet üzerine *m*-inositol (10 mL, 250 mM) eklenerek santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işleminden sonra lenfositlerden 100  $\mu\text{L}$  alınarak üzerine *t*-BOOH (1mM, 100  $\mu\text{L}$ ), BHA (400  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) eklenmiş ve HBSS (pH:7.4, 700  $\mu\text{L}$ ) tamponu ile son hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de

15-30-45 ve 60 dakikalar boyunca inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tryphan blue ile belirlenmiş ve aşağıdaki formüle göre

$\% \text{ Yaşam} = \text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı} \times 100$  ile hesaplanmıştır (119).

## 2.9 Protein Miktar Tayini

Kurutulmuş bitki ekstraktlarının protein miktarlarının tayini Dumas cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Dumas, yanma tekniğine bağlı olarak azot tanımlanması yapmaktadır. Bu metoda bağlı olarak, oksijen gazının akış hızının da kontrol edildiği koşullarda çok yüksek sıcaklıklarda bir yanma reaktörü sayesinde, katı, sıvı veya pasta kıvamındaki numune gaz halindeki temel bileşenlerine dönüştürülür. Elde edilen gaz akışında azot miktarı ölçülmektedir. Azot yüzdesinden yola çıkarak, cihaz numunede bulunan % protein miktarını hesaplamaktadır [120].



Şekil 2.1 : Dumas (Protein/Azot Analizörü)

### 3. BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea* ve *Stachys cretica* bitkilerinden elde edilen antioksidan kapasite, toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra protein miktarı tayin sonuçları Tablo 3.1-3.6 ve Şekil 3.1-3.7’de gösterilmektedir.

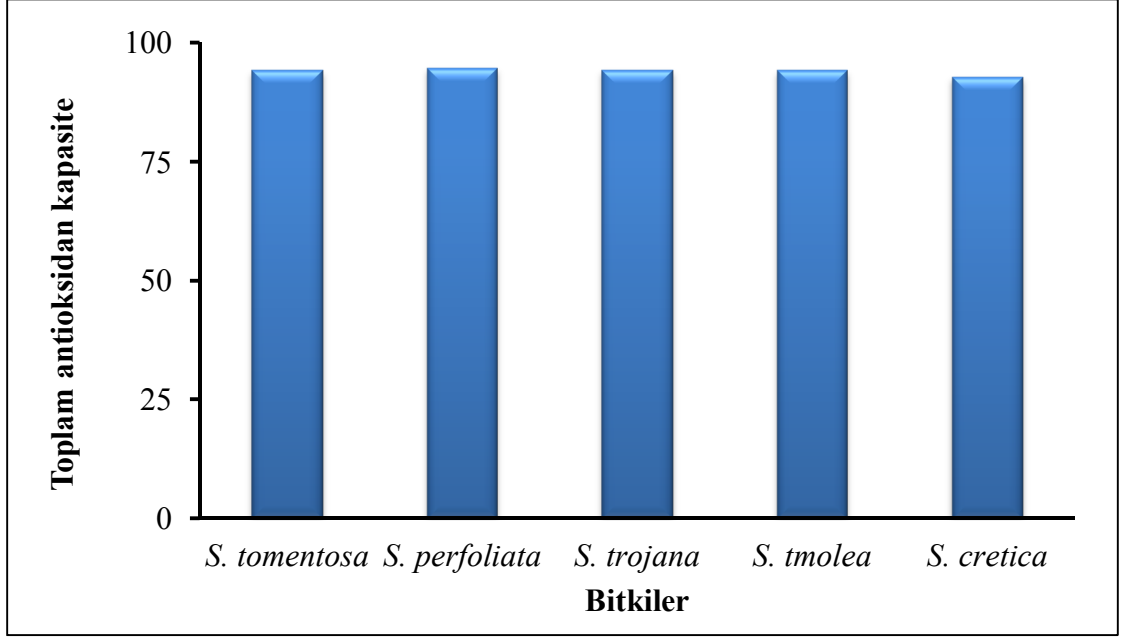
#### 3.1 Toplam Antioksidan Aktivitesine Ait Bulgular

Oda sıcaklığında kurultulduktan sonra DPPH metodu uygulanarak belirlenen antioksidan aktiviteye ait bulgular Tablo 3.1 ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1** : Bitkilerin antioksidan aktiviteleri (%)

<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	94.37
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>Athoa</i>	94.71
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	94.43
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	94.34
<i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	92.79





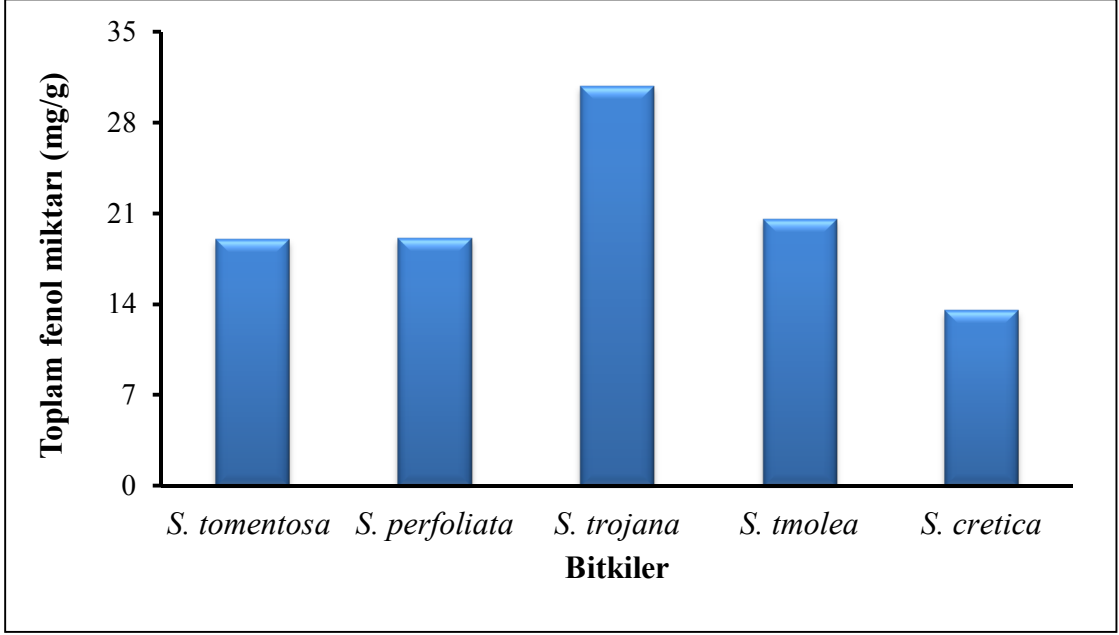
**Şekil 3.1** : DPPH metodu ile antioksidan aktivite tayini

### 3.2 Toplam Fenolik Madde İçeriğine Ait Bulgular

Folin-Ciocalteu reaktifi uygulanarak elde edilen toplam fenolik madde içeriğine ait bulgular Tablo 3.2 ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

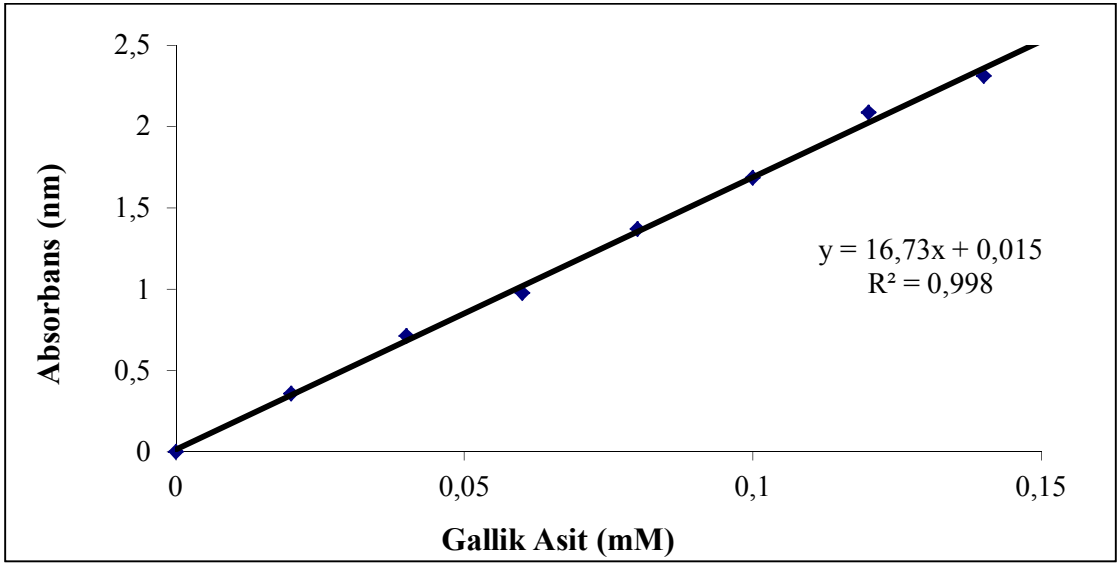
**Tablo 3.2** : Bitkilerin toplam fenolik içerikleri (mg/g)

<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	19.00
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	19.12
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	30.87
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	20.59
<i>Stacchys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	12.71



Şekil 3.2 : Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolik madde tayini

Bitki ekstraktlarımıza ait toplam fenolik madde içerikleri gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmış ve gallik asitin standart olarak kullanıldığı eğri Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



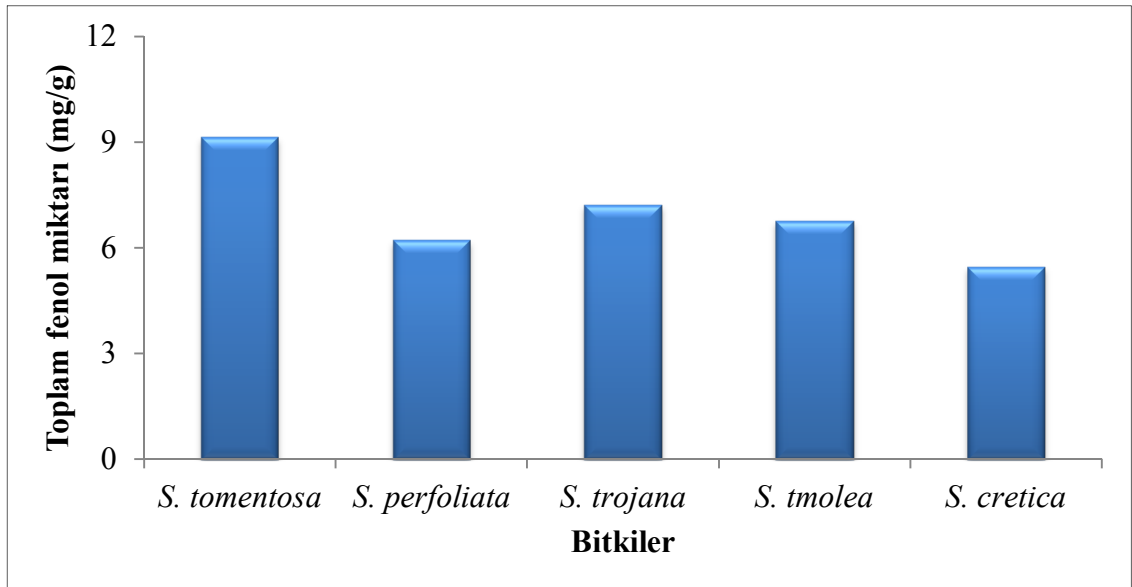
Şekil 3.3 : Toplam fenolik madde içeriği hesaplanırken kullanılan gallik asit standart eğrisi

### 3.3 Toplam Flavonoid Madde Miktarına Ait Bulgular

Oda sıcaklığında kurultulduktan sonra belirlenen toplam flavonoid madde miktarına ait bulgular Tablo 3.3 ve Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

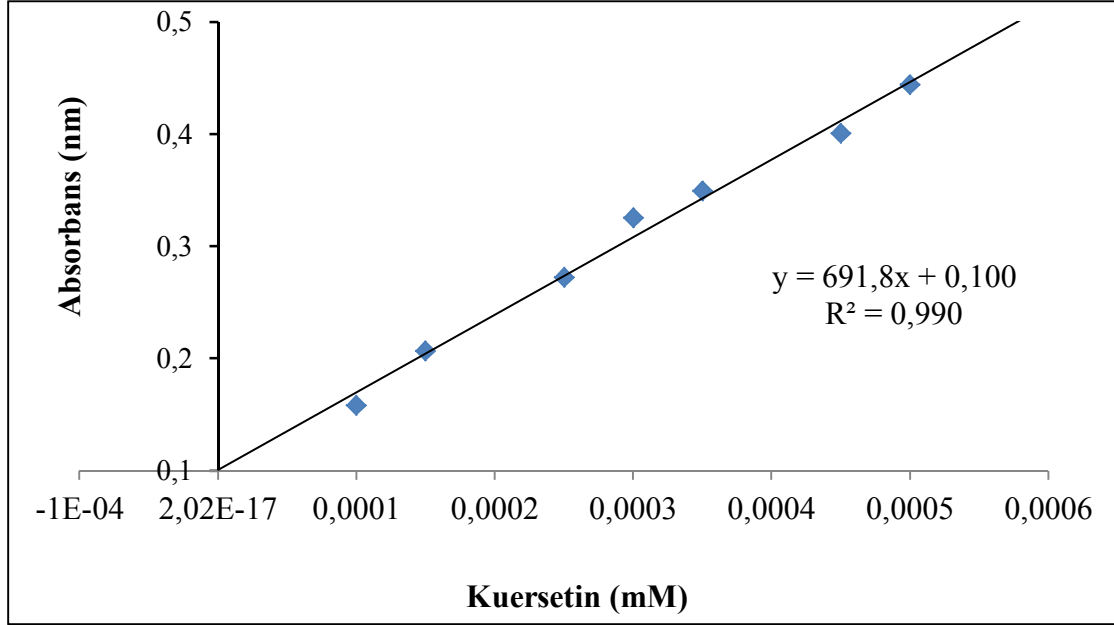
**Tablo 3.3 :** Bitkilerin toplam flavonoid içerikleri (mg/g)

<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	9.12
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	6.19
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	7.20
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	6.76
<i>Stacchys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	5.45



**Şekil 3.4 :** Toplam flavonoid madde miktarı

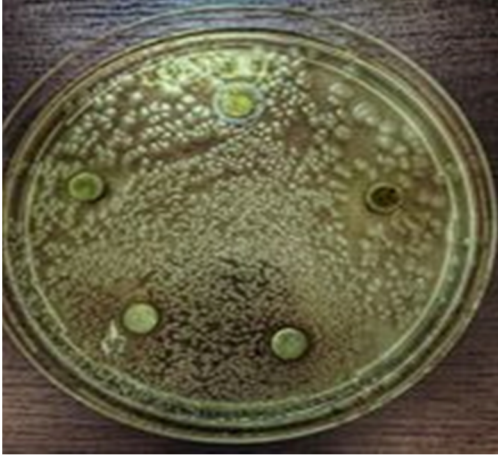
Bitki ekstraktlarımıza ait toplam flavonoid madde içerikleri kuersetin eşdeğeri cinsinden hesaplanmış ve kuersetinin standart olarak kullanıldığı eğri Şekil 3.5' de gösterilmiştir.



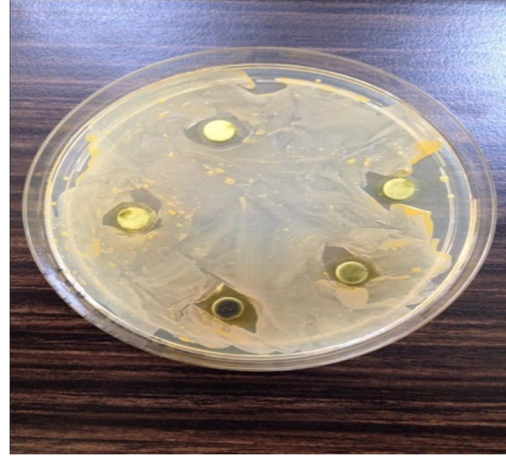
Şekil 3.5 : Toplam flavonoid madde içeriği hesaplanırken kullanılan kuersetin standart eğrisi

### 3.4 Antimikrobiyal Aktiviteye Ait Bulgular

*E. coli* ve *S. aureus* bakterileriyle yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçları diyametrik mikrometre ile ölçülmüştür. *E.coli*'de en yüksek aktiviteyi *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa* gösterirken en düşük aktiviteyi ise *S. trojana* göstermiştir. *S.aureus*'ta ise en yüksek aktivite *S. trojana*'da, en düşük aktivite ise *Salvia tomentosa*'da tespit edilmiştir. Bu sonuçlara ait bulgular Tablo 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6 : *E. coli* ATCC-8739



Şekil 3.7 : *S. aureus* ATCC-6538

Tablo 3.4 : Antimikrobiyal aktivite sonuçları ( $\mu\text{m}$ )

	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	1,652	1,066
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	1,934	1,491
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	0,879	1,972
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	1,019	1,595
<i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	1,892	1,687

### 3.5 Sitotoksik Aktiviteye Ait Bulgular

Sitotoksik aktivite sonucunda elde edilen bulgular Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Kontrol grubu, bitki örneği eklenmeden sadece lenfosit hücrelerinin peroksitlere maruz bırakılması ile hazırlanmıştır. Zamana karşı canlılığını sürdüren hücre sayısı analiz edilmiştir. Kontrol grubu, bitki örnekleri kullanılarak yapılan analizlerle kıyaslandığında, tüm bitkilerin peroksitlerin lenfositler üzerine olan ölümcül etkilerini farklı oranlarda engellediği tespit edilmiştir.

**Tablo 3.5 : Sitotoksik Aktiviteye Ait Sonuçlar**

Bitkiler	% Yaşam			
	15 Dk.	30 Dk.	45 Dk.	60 Dk.
Kontrol Grubu	71	66	61	56
<i>S. tomentosa</i> Miller.	80	73	70	67
<i>S. perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	90	88	80	76
<i>S. trojana</i> Bornm.	96	94	85	89
<i>S. tmolea</i> Boiss.	91	93	87	95
<i>S. cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	83	85	91	80

### 3.6 Protein Tayinine Ait Bulgular

Dumas cihazında kuru örnekler kullanılarak bitkilerin protein içerikleri tespit edilmiştir. Çalışılan bitkilerin protein içerikleri yüksekten düşüğe doğru *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Salvia tomentosa* ve *Stachys cretica smyrnaea* olarak sıralanmıştır. Elde edilen protein tayinine ait bulgular Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.6 :** Protein Tayinine Ait Bulgular

	% İçerik
<i>Salvia tomentosa</i> Miller.	1,03
<i>Sideritis perfoliata</i> L. ssp. <i>athoa</i>	1,10
<i>Sideritis trojana</i> Bornm.	2,77
<i>Stachys tmolea</i> Boiss.	1.29
<i>Stachys cretica</i> L. <i>smyrnaea</i> Rech fil.	0,78

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bazı Lamiaceae türlerinin (*Salvia tomentosa*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea* ve *Stachys cretica*) metanollü ekstraktlarında antioksidan aktivite, toplam fenol içerik, toplam flavonoid miktarı, antimikrobiyal, sitotoksik aktivite ve protein miktarları araştırılmıştır.

### 4.1 Antioksidan Aktivite

Analizler sonucu elde edilen verilere göre antioksidan kapasiteye ait bulgular Tablo 3.1’de verilmiştir. Bu verilere göre *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa* bitkisinden elde edilen ekstraktlarda en yüksek antioksidan aktivite gözlenirken (% 94.71) en düşük aktivite ise; *Stachys cretica*’da (% 92.79) belirlenmiştir. Gıda endüstrisinde bir radikal yakalıcısı olarak kullanılan BHT’nin % antioksidan aktivite değeri 55.8’dir. Görüldüğü gibi çalışma materyali olan bitkilerimizin antioksidan aktivitesi BHT’den oldukça yüksektir [121].

Yumrutaş, 2011 yılında *Salvia multicaulis*, *Salvia palaestina* ve *Salvia syriaca* türlerinin metanol ve *n*-hekzan ile hazırlanan ekstraktlarda uçucu yağ özütleri üzerine DPPH reaktif radikalini kullanarak yapmış olduğu *in vitro* çalışmalarda metanol ile hazırlanan ekstraktların en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir [12].

Ayhan, 2008’de yaptığı çalışmada Lamiaceae familyasına ait *Sideritis libanotica* Labill ssp. *linearis* (Benth) Bornm. bitkisinin antioksidan ve antikanserojen aktivitelerini incelemiştir. Aktivite testlerini ilk olarak ham ekstrelerde yaparak etkili fraksiyonu belirlemiştir. Çalışmasının ikinci aşamasında antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardaki bileşiklerin yapılarını aydınlatmaya çalışmış ve elde ettiği sonuçlara göre *S. libanotica* ssp. *linearis*’in antioksidan ve antikanserojen aktivite gösterdiğini tespit etmiştir [42].



Al H. Ebrahimabadi ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada Lamiaceae türlerinden olan *Salvia eremophila* Boiss.'da hidrodistilasyon ve metanol ekstraksiyonu ile elde ettiği esansiyel yağların antioksidan, toplam fenolik içerik ve antimikrobiyal aktivitelerini *in vitro* olarak incelemiştir. DPPH ve  $\beta$ -karoten-linoik asit testleri kullanıldığında esansiyel yağlara göre metanol ile hazırlanan ekstraktlarda antioksidan kapasitenin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [122].

Köse, 2010 yılında Türkiye'de endemik olarak yetişen *Sideritis erythrantha* Boiss. (SE) ve *Sideritis erythrantha* var. *cedretorum* (SC) bitkilerinin esansiyel yağlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelemiştir. SE ve SC esansiyel yağlarının serbest radikal yakalama kapasitelerinin  $5,12 \pm 0,28$  ve  $4,62 \pm 0,14$  gibi düşük değerlere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Örneklerinin hiçbirinin sentetik bir antioksidan olan BHA ( $95,23 \pm 0,11$ ) gibi yüksek bir antioksidan kapasite göstermediğini rapor etmişlerdir [123].

Roby ve arkadaşlarının 2012 yılında *Thymus vulgaris* L., *Salvia officinalis* L. ve *Origanum majorana* L. bitkilerinin metanol ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan ve toplam fenolik içeriklerini tespit etmişlerdir. Antioksidan aktivite için DPPH reaktifi kullanılmışlardır. En iyi antioksidatif aktiviteyi *Thymus vulgaris*'in gösterdiğini bildirmişlerdir. Literatürde metanol ve etanol ekstraktlarının BHA ya oranla daha yüksek aktiviteye eğilimli olduğu belirtilmektedir. [124].

#### 4.2 Toplam Fenolik İçerik ve Toplam Flavonoid Miktarı

Flavonoid ve fenolik maddeler genel olarak oldukça yüksek antioksidan etki gösterirler. Bitkilerde bulunan toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı hakkında elde edilen bilgiler oldukça önemlidir. Elde edilen bu bilgiler sonucunda bir bitkinin sahip olduğu antioksidan kapasite hakkında bir değerlendirmede bulunulabilir. Tablo 3.2'de bitki ekstraktlarımızın toplam fenolik içeriklerine bakıldığında *Sideritis trojana* en yüksek fenol içeriğine sahipken, *Stachys cretica smyrnaea* en düşük toplam fenol içeriğine sahiptir. Tablo 3.3'te bitki ekstraktlarımızdan elde edilmiş toplam flavonoid miktarlarına bakıldığında en yüksek içeriğin *Salvia tomentosa*'ya, en düşük içeriğin ise *Stachys cretica smyrnaea*'ya ait olduğu gözlemlenmiştir.

Roby ve arkadaşları 2012 yılında, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis* ve *Origanum majorana* bitkilerinin metanol ile hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini Folin-Ciocalteu metodu ile belirlemişlerdir. Yukarıda adı geçen bitkilerin fenolik madde miktarlarının sırası ile 8,10, 5,95 ve 5,20 mg/g olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada metanolün etanolden daha iyi bir solvent olduğu da vurgulanmaktadır. Fenolik madde miktarlarının bizim çalışmamızdaki değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Fenolik madde miktarının farklı olması türlere, türün toplanma zamanına, vejetatif ve generatif dönemler gibi etkenlere de bağlı olarak değişiklik göstermektedir [124].

Ertaş, 2005 yılında yaptığı çalışmasında *Sideritis arguta* ve *S. congesta* bitkilerinden elde ettiği metanollü ekstraktlarının fenol ve flavonoid aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur. *S. arguta*'dan elde ettiği toplam fenolik ve flavonoid içerikleri sırasıyla  $57.59 \pm 0.709$ ,  $33.37 \pm 1.172$  olarak bulunurken, *S. congesta*'da  $74.71 \pm 0.711$ ,  $58.66 \pm 0.085$ 'dir [125].

#### 4.3 Antimikrobiyal Aktivite

*E. coli* ve *S. aureus* bakterileriyle yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 3.4'de gösterilmiştir. Bu tabloya göre *E.coli*'de en yüksek aktiviteyi *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, gösterirken en düşük aktiviteyi ise *S. trojana* göstermiştir.

Abu-Shanab ve arkadaşları 2004 yılında *Salvia officinalis*, *Syzyium aromaticum*, *Cinnamomum cassia*, *Chinese cinnamon*, *Thymus vulgaris* ve *Rosmarinus officinalis*'in yaprak, tohum gibi kısımlarının su, etanol ve metanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerini *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* EHEC O157 kullanarak test etmişlerdir. Sonuç olarak bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [7].

Pişkin, 2007 yılında yaptığı çalışmasında Lamiaceae familyasına ait *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* bitkilerinin sahip olduğu uçucu yağları mikrodilüsyon yöntemini kullanarak, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC

14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterileri üzerinde test etmiştir. Sonuç olarak; *Salvia officinalis* bitkisinden elde edilen uçucu yağın; *E. coli*'ye karşı 0.4-0.2 µl/ml'lik konsantrasyonlarda, *Salmonella typhimurium*'a karşı 0.4 µl/ml'lik konsantrasyonda, *Staphylococcus aureus*'a ise 0.4-0.05 µl/ml konsantrasyon aralığında etkili olduğu sonucuna varmıştır. Ayrıca *B. cereus*'a karşı ise yine aynı konsantrasyon aralığı olan 0.4-0.05 µl/mL'de etkili olduğunu gözlemlemiştir. Ancak *B. cereus*'un göstermiş olduğu inhibisyon özelliğinin *S. aureus*'a göre daha az olduğunu tespit etmiştir. *S. aureus* bakterisine karşı ise yine en yüksek etkiyi *O. vulgare* uçucu yağı gösterirken, *S. officinalis*, *M. piperita* ve *R. officinalis* uçucu yağlarının ise benzer etkiyi gösterdiğini sonucuna varmıştır [97].

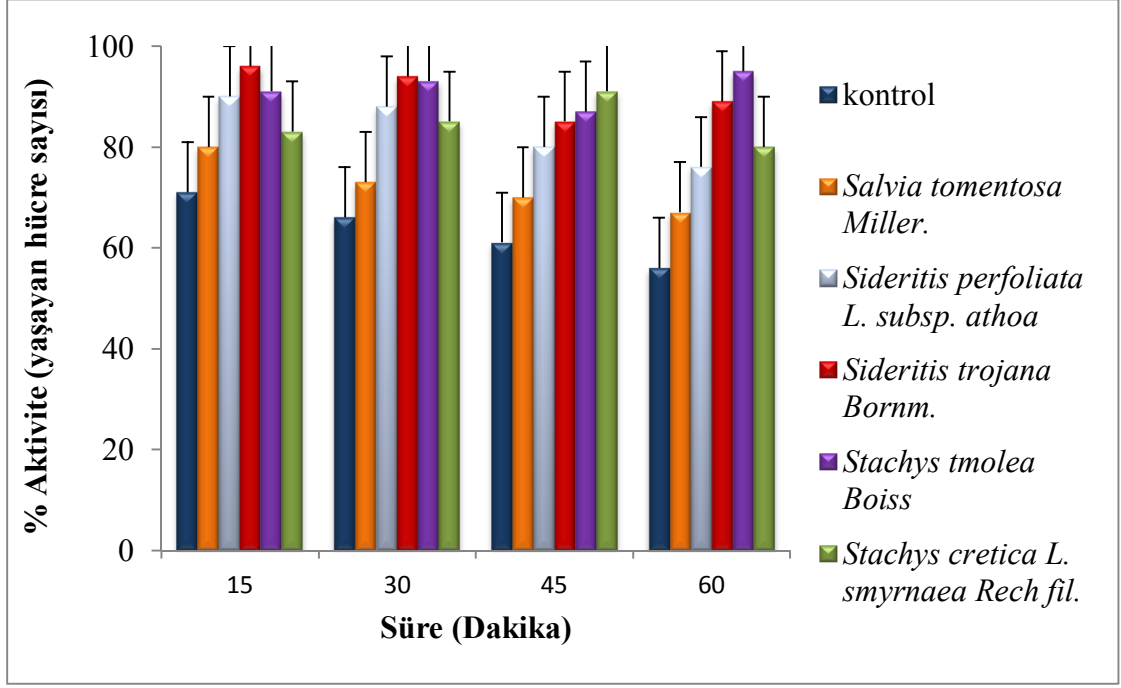
Köse ve arkadaşları 2010 yılında Türkiye'de endemik olarak yetişen *Sideritis erythrantha* Boiss. (SE) ve *Sideritis erythrantha* var. *cedretorum* (SC) bitkilerinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilerin esansiyel yağlara karşı daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu sonucu gram negatif bakterilerin hidrofilik dış membranındaki hidrofilik polisakkarit zincirinin hidrofobik esansiyel yağlara karşı bir bariyer olarak davranmasına bağlamışlardır [123]. Bizim çalışmamızda da *Sideritis* türlerinin *S. aureus* ATCC-6538'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğu göze çarpmaktadır.

Delamare ve arkadaşları 2005 yılında yaptığı çalışmada *Salvia officinalis* L. ve *S. triloba* bitkilerinin esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini *S. aureus* ve *A. hydrophila* bakterileri üzerinde test etmişlerdir. Sonuç olarak *Salvia triloba* L. esansiyel yağlarının *S. aureus* üzerinde etkili bir inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir [126].

#### 4.4 Sitotoksik Aktivite

Halk arasında kolay temin edilebilen ve geleneksel olarak kullanılan bitkiler söz konusu patojen mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklara karşı ilaç hammaddesi, gıda ve kozmetik ürünlerinde koruyucu madde olarak endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Bitki çayları olarak kullanılan *Lamiaceae* türleri (*Salvia*

*tomentosa* Miller, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea* ve *Stachys cretica*) üzerine yapmış olduğumuz sitotoksik aktiviteye ait sonuçlar Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Tek bir konsantrasyonda kullanılan bitki ekstraktlarının (100µL) belirli zaman (0-60 dk.) aralıklarında hücre ölümüne sebep olan t-BOOH'a karşı lenfosit hücrelerinin canlılığını koruyabilme yetenekleri test edilmiştir. Tablo 3.5'te sunulmuş veriler incelendiğinde, hücre ölümleri zamana bağlı olarak yavaş bir şekilde artmaktadır. Kontrol grubu verileri ve bitki ekstraktları ile test edilmiş veriler kıyaslandığında bitki ekstraktlarının t-BOOH'a karşı BHA'dan daha etkili olduğu görülmüştür. Sonuç olarak çalışmamızda yer alan bitki türlerinin serbest radikallere karşı hücre ölümünü yavaşlattığı ve koruyucu bir görev üstlendiği söylenebilir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi 60. dakikada çalışmada kullanılan bitkilerin sitotoksik aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında canlı hücre sayısının koruma yeteneğiyle *Stachys tmolea* olduğu bunu sırasıyla *Stachys cretica*, *Sideritis trojana*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa* ve *Salvia tomentosa*'nın takip ettiği belirlenmiştir. 45. dakikada ise canlı hücre sayısının koruma yeteneği *Stachys cretica* bitkisine aittir. Bu bitkiyi *Stachys tmolea*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana* ve *Salvia tomentosa* takip etmektedir. 15 ve 30 dakika sonucundaki aktivitelere bakıldığında en yüksek aktiviteyi *S. trojana* bitkisi göstermiştir.



**Şekil 4.1 :** Sitotoksik Aktiviteye Ait Sonuçların Karşılaştırılması

Smitha ve arkadaşları 2011 yılında zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden elde ettikleri  $\beta$ -turmerin molekülünün insan lökosit hücreleri üzerine toksik etkisi olmadığını test etmişlerdir [119].

2006 yılında Barutca, yaptığı çalışmada *Salvia fruticosa*'nın ekstraktında NR, MTT ve koloni formasyonu yöntemlerinden elde edilen verilerle, adaçayının A549 hücrelerinde doza bağımlı ve etkili sitotoksik yanıtlar oluşturduğunu, düşük konsantrasyonlu dozlarının sağlıklı hücrelerde çok az toksisite gösterdiğini saptamıştır. Bu bulgulara göre, adaçayının düşük konsantrasyonlu dozlarının kanser tedavilerinde (A549) akciğer kanseri hücrelerinde kullanılabilir olduğunu ortaya çıkarmıştır [110].

Aydın, 2008 yılında *S. tomentosa*, *S. virgata* ve *S. hypargeia* özütlerinin *A. castellani* üzerindeki sitotoksik aktivitelerini incelemiş ve yapılan aktivite testleri sonucunda *S. tomentosa*, *S. virgata* ve *S. hypargeia* özütlerinin *A. castellani* trofozoitleri ve kistleri üzerinde herhangi bir öldürücü etkisi gözlemlenmemiştir. Ancak bu özütlerin sitotoksik aktiviteleri sonuçları *S. tomentosa* özütü epitel hücre

kültürü üzerinde 32.0 mg/mL derişimde orta dereceli toksik etki gösterirken 16.0 mg/mL derişimde bu etki ılımlı sitotoksik olarak belirlenmiştir. Bu özüt, 8.0 mg/mL derişimde kültürdeki hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir. *S. virgata* özütü ise, toksik etki skalasına göre, 32.0 mg/mL derişimde ılımlı sitotoksik etkide bulunurken, 16.0 mg/mL derişimde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. *S. hypargeia* ise 32.0 mg/mL derişimde orta dereceli sitotoksikite göstermiştir. Sözü edilen özüt, 16.0 mg/mL derişimde ılımlı sitotoksik etki gösterirken, 8.0 mg/mL derişimde kültürdeki hücreler üzerinde toksik etki oluşturmadığı sonucuna varmıştır [112].

2012 yılında Candaş, yaptığı çalışmada ise, sitotoksik aktivite tayini için LDH ve XTT testlerini kullanmıştır. Çalışma sonucunda araştırılan bitki çaylarının orta derecede bir sitotoksik aktivite gösterdiğini tespit etmiştir [127].

Yeni anti kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı en çok kullanılan metot sitotoksikite testleridir. Anti kanser ilaçları tümör hücrelerine seçici olması gerekirken, bazen tüm hücreleri öldürebilir. Bu yüzden *in vitro* toksisite testlerinde en az toksik olan bileşikler seçilmelidir. Her bir dokunun toksisitesinin belirlenmesi için birçok *in vitro* metot geliştirilmiştir. Eğer bir bileşiğin toksisitesi belirlenecekse bu metotlardan bir ya da daha fazlası seçilmelidir. *In vitro* genotoksikite ve sitotoksikite deneyleri yeni bir kimyasalın ya da ilacın mutajenik ve sitotoksik etkisinin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır [119].

#### **4.5 Toplam Protein İçeriği**

Amino asitler ve proteinler bitkinin bazal metabolik aktivitesiyle ilgili primer metabolitler olarak düşünölmektedirler [22]. Toplam protein içeriği aminoasit dizilerine bağlı olan bitkilerin serbest aminoasit içeriği bitkiden bitkiye göre değişim göstermektedir. Ayrıca protein varlığı ve dağılımı çevresel faktörlere göre de değişim göstermektedir [126]. Bitkisel kökenli besinlerin gıda değerlerinin belirlenmesinde protein içeriğinin tespit edilmesi önemli bir parametredir [128]. Bu nedenle bitkisel besinlerin gıdaların da protein içeriklerinin belirlenmesinde doğru yöntemlerin kullanılması oldukça önemlidir. Gıdalarda toplam protein içeriğini belirleyen

güvenilir yöntemler sadece gıda kalitesi ve güvenliği için değil, aynı zamanda ticareti kolaylaştırmak için de gereklidir. Bu çalışmada protein tayini için Dumas yöntemi kullanılmıştır. Dumas (yanma) metodu bir markır olarak total azotun belirlenmesiyle toplam protein içeriğinin tahmin edilmesini sağlayan ve 19. yy'dan bu yana yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Dumas yöntemi hızlı, kolay ve kullanımı otomatik olması nedeniyle oldukça avantajlıdır. Ayrıca zehirli kimyasallar veya katalizör kullanılmaması diğer bir avantajdır [120]. Çalışmamızda Kazdağları'ndan toplanan bazı Lamiaceae türlerinin (*Salvia tomentosa*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea*, ve *Stachys cretica*) bitkilerin total protein içerikleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Literatürde bir çok bitkinin değişik amaçlarla protein içeriğinin tespit edildiği görülmektedir. Muzun protein içeriği 1,5 -2,1 mg mL<sup>-1</sup>, elmanın 0,19 mg mL<sup>-1</sup>, sakız ağacının 0,0526 mg mL<sup>-1</sup> [129]. Menhgini ve arkadaşları antioksidan aktivite ve kimyasal kompozisyonunu belirlemeye çalıştıkları *Sideritis italica*'nın total protein içeriğinin taze yapraklarda 606.7±141.9 µg/g, bitkinin çiçeklerinde ise 1095.0±229.6 µg/g olduğunu tespit etmişlerdir [130].

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada Kazdağları'ndan toplanan bazı Lamiaceae türlerinin (*Salvia tomentosa*, *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*, *Sideritis trojana*, *Stachys tmolea* ve *Stachys cretica smyrnaea*) antioksidan kapasiteleri, toplam fenol içerikleri, flavonoid miktarları, antimikrobiyal aktiviteleri, sitotoksik aktiviteleri ve toplam protein içerikleri araştırılmıştır.

Yapmış olduğumuz analizlere göre;

- En yüksek antioksidan kapasite *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*'da (% 94.71) gözlenirken, en düşük kapasite ise *Stachys cretica smyrnaea*'da (% 92.79) belirlenmiştir.
- Toplam fenol içerikleri en yüksek *Sideritis trojana*'da (30.87 mg/g) en düşük *Stachys cretica smyrnaea*'da (12.71 mg/g) bulunmuştur.
- Flavonoid miktarları en yüksek *Salvia tomentosa*'da (9.12 mg/g) en düşük *Stachys cretica smyrnaea*'da (5.45 mg/g) tespit edilmiştir.
- Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre en yüksek aktivite *E. coli*'de *Sideritis perfoliata* ssp. *athoa*'da (1.934  $\mu$ m), *S. aureus*'ta ise *Sideritis trojana*'da (1.972  $\mu$ m) görülmüştür.
- En yüksek sitotoksik aktivite *Stachys tmolea* bitki türünde belirlenmiştir.
- En yüksek toplam protein içerik *Sideritis trojana*'da (% 2.77) tespit edilmiştir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] Aydın, F., “*Mentha spicata* L. ssp. *spicata* (Lamiaceae) Bitkisinin Morfolojik, Anatomik, Palinolojik ve Bazı Kimyasal Özelliklerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, (2012).
- [2] Nakipoğlu, M. ve Otan, H., “Tıbbi Bitkilerin Flavonoidleri”, *J.AARI*, 4(1):70-93, (1992).
- [3] Çabuk, N., “*Sideritis libanotica* ssp. *linearis* Bitkisinden Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Yapı Tayini, Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Tokat, (2012).
- [4] Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K. and Mariam, T. G., “Antimicrobial activities of some selected traditional ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders”, *J. Of Ethnopharmacol.*, 100(1):168-175, (2005).
- [5] Baykal, T., *Doğal Kaynaklı Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Yönünden Değerlendirilmesi ve Tedavideki Yeri*, GE, 46:21-22, (1977).
- [6] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gointer, E., “Production of plant secondary metabolites”, A Historical Perspective, *Plant Sci.*, 161: 839-851, (2001).
- [7] Nurcan, E., “Ardahan Yöresinde Yetişen Lamiaceae (Labiatae) Familyasına Ait Bazı Türlerin Biyoaktiviteleri”, Doktora Tezi, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, (2012).

- [8] Richardson, P. M., *The Chemistry of The Lamiaceae*, An Introduction and Overview, *Advances in Labiatae Science*, 291-297s, (1992).
- [9] Baser, K. H. C., International Symposium on the Labiatae, *Advances in Production, Biotechnology and Utilisation*, Sanremo, İtalya. (2006).
- [10] Hedge, I. C., “A Global Survery of The Lamiaceae”, *Advencis in Labiatae, Science*, 7-18s: 121, (1992).
- [11] Piozzi, F. and Bruno, M., “Diterpenoids from Roots and Aerial Parts of The Genus *Stachys*”, *Records of Natural Products*, 5(1): 1-11, (2011).
- [12] Yumrutaş, Ö., “Gaziantep Florasına Ait Bazı Lamiaceae Türlerinin Antioksidan ve Radikal Temizleme Aktivitelerinin Belirlenmesi”, Doktor Tezi, *Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, (2011).
- [13] Bozarı, S., “Lamiaceae Familyasına Ait Farklı Türlerden Elde Edilen Allelopatik Potansiyele Sahip Esansiyel Yağların Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, (2012).
- [14] Dirmenci, T., Satıl, F. ve Tümen, G., *Kazdağı Milli Parkı Çiçekli Bitkileri*, Balıkesir: (2007).
- [15] Metcalfe, C. R. and Chalk., L., *Anatomy of the Dicotyledones*, Oxford University Press, Londra, (2), 1041, (1950).
- [16] Tez, C., “Türkiye’de Yayılış Gösteren *Sideritis* L. (Lamiaceae) Cinsinin *Empedoclia* Seksiyonuna Ait Bazı Taksonların Its Çekirdek Ribozomal DNA Dizilerine Dayalı Filogenetik Analizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2011).

- [17] Sarikurkcü, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A. and Mete, E., “Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. from Turkey”, Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London, (2014).
- [18] Papanikolaou, K. and Kakkını, S., *A taxonomic revision of Sideritis L. section empedoclea (Rafin) Benth (Labiatae) in Greece* In : Aromatic Plants, Basic and Applied Aspects, Margaris, N., Koedam, A., Vokou, D. (Eds.), Martinus Nijhoff Publ., The Hague, Boston, London, 101-127, (1982).
- [19] Öz, S., “Balıkesir Edremit Kazdağı Yöresinde Yetişen Sideritis Türlerinde Kromozom Çalışmaları (*S. perfoliata* L., *S. athena* Papanikolaou & Kokkini, *S. dichitoma* Huter, *S. trojana* Bornm.)”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (1995).
- [20] Davis, P. H., (Ed.) “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, Vol.7. University Press, Edinburgh, (1982).
- [21] Akçay, Y., Ezer, N., Edit, Çoşkun, M. R., Tel, B. C., *4-O-Metilhipoletin-7-Asetilglukopiranozit ve Antiinflamatuvar Aktivitesi*, XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, Ankara Üniversitesi, Ankara, p. 555. (1997).
- [22] Çiğdem, H., “*Stachys annua* L. ssp *annua* Bitkisinden Sekonder Metabolit İzalasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Tokat, (2013).
- [23] Akkuş, İ., *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*, Mimoza Yayınları, Konya, (1995).

- [24] Dogan, S., Alan U. and Dogan, M., “The effect of sodium tetraborate on antioxidant enzymes under in vitro conditions”, *Fresenius Environmental Bulletin*, Accepted.
- [25] Şen, C., “*Hibiscus sabdariffa* L. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne, (2011).
- [26] Yontem, M., Bilge, M., Kaleli, S. and Celik, G., “The Effects of free radicals on antioxidant defence systems and organism in hemodialysis patient”, Volume 33, Issue 3, Pages 389-394, *Kütahya*, (2011).
- [27] Alp, H. H., “Hiper ve Hiporoidili Hastalarda Homosistein S-Adenozil Metiyonin ve Antioksidan Düzeyleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, (2005).
- [28] Dreher, D. and Junod, A. F., “*European Journal of Cancer*”, 32A, 30-38, (1996).
- [29] Karakuş, B., Odabasıoğlu, F., Cakir, A., Halici, Z., Bayir, Y., Halici, M., Aslan, A. and Suleyman, H., “The effects of methanol extract of *Lobaria pulmonaria*, a lichen species, on indometacininduced gastric mucosal damage, oxidative stress and neutrophil infiltration”, Volume 23, Issue 5, Pages 635-639, *Erzurum*, (2009).
- [30] Halliwell, B, Gutteridge J. M. C., “*Free Radicals in Biology and Medicine*”, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford, (1999).
- [31] Kılınç, K. ve Kılınç, A., “Oksijen toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri”, *Hacettepe Tıp Dergisi*”, 33: 110-118, (2002).
- [32] Karadağ, H., “Süperoksit Dismutaz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Safaştırılması”, *Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü*, Cilt:17-6, (2008).

- [33] Kavas, G. Ö., “Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri”, *Türkiye Klinikleri*, 9, 1-8, (1989).
- [34] Sinclair, A. J., Barnett, A. H. and Junec, J., “Free radicals and antioxidant systems in health and disease”, *Brit. J. Hos. Med*, 43, 334-344, (1990).
- [35] İşnas, M., Yegin, E. and Celik, İ., “Effects of omethoate on certain oxidative biomarkers in various tissues of frogs (*Rana ridibunda*) at acute exposure”, Volume 28, Issue 1, Pages 27-34, Van, (2012).
- [36] Çelik, Ak, H., “Defibrotid’in Aterojenik Diyet Uygulanan Tavşanlarda Kalp ve Karaciğer Serbest Radikaller ve Antioksidan Enzimlere Etkisi”, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Programı, İzmir, (1999).
- [37] Kanbak, G., “P-Aminofenol Toksisitesinde Serbest Radikaller ve Antioksidan Defans Mekanizmalarının Rolü”, Doktora Tezi, *Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir, (1994).
- [38] Kozan, G., “*Allium sativum* L. (Kastamonu ve Denizli Yerel) Bitkisinin Uçucu Yağlarının Kimyasal Bileşimi, Antibakteriyel ve Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, (2012).
- [39] Akalın, A., “Kronik Böbrek Yetmezliğine Bağlı Aneminin Recombinant Human Eritropoetin ile Düzeltilmesi”, Uzmanlık Tezi, Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı: 3-18 s., Eskişehir, (1991).
- [40] Desai, S., ve Isa, S., *Klinisyenler İçin Laboratuar Tıbbi Rehberi*, (Çev.E.Ulukaya), Nobel-Güneş Kitabevi: 489-537 s, (2004)
- [41] Altıntepe, L., Guney, İ., Demir, M., Turk, S. and Yeksan, M., “Assessment of acute renal failure patients treated in our nephrology clinic between 1996 at 2002”, Volume 36, Issue 10, Pages 3002,3005, Konya, (2004).

- [42] Demirtas, İ., Ayhan, B., Sahin, A., Aksit, H., Elmastas, M. and Telci, İ., “Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica linearis* Labill. ssp. *linearis* (Bentham) Borm. (Lamiaceae)”, Volume 25, Issue 16, Pages 1512-1523, Tokat, (2011).
- [43] Bruce, A., “Dietary carcinogens and anticarcinogens; oxygen radicals and degeneration diseases”, *Science*, 221: 1256-1267 s, (1983).
- [44] Scandalios, J. G., “The rise of ROS”, *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 483-486, (2002).
- [45] Halliwell, B., “Oxygen radicals: commonsense look at their nature and medical importance”, *Medical Biology*, 62: 71-77 s, (1984).
- [46] Halliwell, B., “Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human”, *The American Journal of Medicine*, 91, 14-22, (1991).
- [47] Gutteridge, J. M. C., “Lipid peroxidation and antioxidants as baracteri of tissue damage”, *Clin. Chem.*, 41, 1819-1828, (1995).
- [48] Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. and Lgma. J. L. F. C., “Methodological Aspects About in Vitro Evaluation of Antioxidant Properties”, *Analytica Chimica Acta*, Vol.613, 1-19, ( 2008).
- [49] Halliwell, B., Murcia, M., A., Chirico, S. and Aruoma, O., I., “Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo”, What They Do Anh How The Work, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.35, 7-20, (1995).
- [50] Kıbrıslıoğlu, G., “Biyolojik Örneklerde Peroksil Radikali Süpürme Etkinliği Ölçümü İçin Spektroflorometrik Yöntem Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, (2013).
- [51] Çaylak, E., “Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres İle Antioksidanlar”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 9 (1) : 73-83, (2011).

- [52] Demirci, S. Ç., “Antioksidanların Reaktif Oksijen Türleri Tüketimiyle Cuprac Antioksidan Kapasitesi Arasındaki İlişki”. Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, (2013).
- [53] Haklar, G., Yüksel, M., Soybaşı, H. ve Yalçın, A.S., “Süperoksit radikali, nitrik oksit ve peroksinitritin hasar oluşturuucu metabolizmadaki rolleri”, *Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1: 53-67 s. (1999).
- [54] Henle, E. S. and Linn, S., “Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, American Society for Biochemistry and Molecular Biology”, 272 (31), 19095-19098, (1997).
- [55] Balabanlı, B., Türközkan, N., Polat, M. ve Akmansu, M., “Radyasyonun oluşturduğu serbest radikal aracılıklı karaciğer harabiyetinin nitrik oksit oluşumu yoluyla incelenmesi”, *Klinik Gelişim II*, 402-403 s. (1998).
- [56] Schuessler, H. and Schilling, K., “Oxygen effect in radiolysis of proteins”, Part 2. Bovine serum albumin. *Int. J Radiat. Biol.*, 45: 267-281, (1984).
- [57] Kizil, O., Akar, Y., Saat, N., Kizil, M. and Yuksel, M., “The Plasma Lipid Peroxidation İntensity (MDA) and Chain-Breaking Antioxidant Concentrations İn The Crow With Clinic or Subclinic Mastitis”, Volume 156, Issue 11, Pages 529-533, Elazig, (2007).
- [58] Arıduru, R., “Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya, (2013).
- [59] Öztürk, S. ve Ercişli, S., “Antibacterial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Althaea officinalis*. and *Althaea cannabina*. from Turkey” *Pharma. Biology*, 45, 3, 235-240, (2007).
- [60] Bancirova, M., “Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial ctivity of black and green tea”, *Food Research İnternational*, 43, 1379-1382, (2010).

- [61] Karasakal, O. F., Alan, U., Diken, M. E., Bozdemir, K., Gungor, N. and Dogan, S., Effects of some pesticides on catalase and glutathione S-transferase in *Cyprinus carpio carpio*, *FEBS Journal* 279 (Suppl. 1), 195, (2012).
- [62] Uylaser, V. ve İnce, K., “Saraptaki Antioksidanlar ve Fenolik Bilesikler”, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*”, 1151-1154. (2008).
- [63] Aksoy, M., “Bazı Kırmızı Şarapların Fenolik Madde Profilleri Üzerine Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Çanakkale, (2010).
- [64] Zuber, A., *Mathematical models for the interpretation of environmental radioisotopes in groundwater systems*, (eds: P. Fritz and J. C. Fontes), *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, Amsterdam: Elsevier, 1-59, (1986).
- [65] Aras, Ö., “Üzüm ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Isparta. (2006).
- [66] Tenderis, B., “Üzüm Çekirdeğinden Fenolik Madde Ekstraksiyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gebze, (2010).
- [67] Burns, J., Gardner, P. T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, M. E. J. and Crozier, A., “Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification”, *Journal Of Agricultural and Food Chemistry* 49(12), 5797-5808, (2001).
- [68] Park, H. J. and Cha, H. C., “Flavonoids from leaves and exocarps of the grape kyoho”, *Korean Journal of Biological Science* 7, 327–330, (2003).



- [69] Frankel, E., N., Kanner, J., German, J., B., Parks, E. and Kinsella, J., E., “Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine”, *Lancet* 341, 454- 457. (1993).
- [70] Rice-Evans, C. A. and Miller, N. J., “Total antioxidant status in plasma and body fluids”, *Methods in Enzymology*, 234: 279-293, (1984).
- [71] Boyraz, N. ve Sürel, B., “Bitki Hastalıklarına Dayanıklılıkta Fenoliklerin Rollerini”, *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi* 18(34), 56–69, (2004).
- [72] Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgu, A., Türemiş, N., Kargı, S.P. ve Cabaroğlu, T., “Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri”, *II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Konya, (14–16 Eylül 2006).
- [73] Kahraman, A., Serteser, M. ve Koken, T., “Flavonoidler”. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3, 01-08, (2002).
- [74] Yılmaz, Ç. D., “Flavonoidlerin ve Metal Komplekslerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Yöntemiyle Yanyana Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı*, İstanbul, (2010).
- [75] Kelly, E. H. and Anthony, R. T., “Flavonoid antioxidants: chemistry, 60 haracteri and structure-activite relationships”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 10, 572-584, (2002).
- [76] Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P. and Wang, J., “Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic 60haracte groups”, *Chemistry and Physic of Lipids*, 79: 157-163; 7, (1996).

- [77] Erlund, I., “Review of the flavonoids, quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology”, *Nutrition Research.*, 24:851-874, (2004).
- [78] Wach, A., Pyrzynska, K. and Biesaga, M., “Quercetin content in some food and herbal samples”, *Food Chemistry*, 100:699-704, (2007).
- [79] Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J., “Flavonoid intake and coronary mortality in Finland”, a cohort study. *Br. Med. J.*, 312, 478-481, (1996).
- [80] Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D., “Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease”, the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342: 1007–1011, (1993).
- [81] Zhou, J., Wang, L., Wang, J. and Tang, N. “Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes”, *Transition Metal Chemistry*, 26:57-63, (2001a).
- [82] Zhou, J., Wang, L., Wang, L., Wang, J. and Tang, N., “Synthesis, characterization, antioxidative and antitumour activities of solid quercetin rare earth (III) complexes”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 83:41-48, (2001b).
- [83] Topuz, F., “Süs Bitkilerinden Flavonoid 3'-Hidroksilaz ve Flavonoid 3'5'-Hidroksilaz Enzimlerinin Klonlanmaları, Karakterizasyonları ve Substrat Spesifitelerinin Çalışılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2007).
- [84] Harborne, J. B. and Williams, C. A., “Advances in flavonoid research since 1992”, *Phytochemistry*, 55 (6): 481–504, (2000).
- [85] Ezer, N., “*Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar”, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Farmakognozi Programı, Ankara, (1980).

- [86] Karaman, M., “Karboksil Grubu İçeren Monodispers-Makro Gözenekli Hidrojellerin Flavonoid İzolasyonu İçin Kullanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Kayseri, (2012).
- [87] Benallal, el A. F., Perell, L. B. J. and Tortes, L., “Development of novel DNA cleavage systems based on copper complexes synthesis and characterization of Cu(II) complexes of hydroxyflavones”, *Metal Based Drugs*, 7:365-371, (2000).
- [88] Pruthi, J. S., “Spices and Condiments, Academic Press”, New York, (1980).
- [89] Deans, S. G. and Ritchie, G. A., “Antimicrobial properties of plant essential oils”, *Int. J. Food Microbiol.* 5: 165-180, (1987).
- [90] Özcan, M., “Inhibitory of spice extracts on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 strain”, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 207, 253–255, (1998).
- [91] Conner, D.E., Beuchat, L. R., “Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts”, *J. Food Sci.* 49: 429-434, (1984a.).
- [92] Quattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. and Begin, A., “Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms”, *Int. J. Food Microbiol.* 37: 155-162, (1997).
- [93] Abascal, K. and Yarnell, E., “Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes”, *Alternative & Complementary Therapies*, Part: 1, 237-241, (2002).
- [94] Unat, E. K., *Escherichia coli*, Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat, *Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi*”, *Dergah Tıp Yayınları*, İkinci Baskı, Cilt 1: Sayfa 546, (1986).

- [95] Toreci, K., *Escherichia türleri*, Topcu, A. W., Soyletir, G. ve Doğanay M., “İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi”, Nobel Tıp Kitapevleri, cilt 2: sayfa 1564-1574, (2002).
- [96] Karaca, P., “Çanakkale’de (Türkiye) Tüketilen Bazı Ezine Peynirlerindeki *Escherichia coli* 0157:H7 Serotipinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, (2011).
- [97] Pişkin, Ç., “Lamiaceae Familyasına Mensup Bazı Baharat Bitkilerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya, (2007).
- [98] Welch, R. A., “The Genus *Escherichia*”, In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H. and Stackebrandt, E., (ed), “The Prokaryotes: A Handbook on The Biology of Bacteria”, 3<sup>rd</sup> ed, Vol. 6. Springer, New York, NY., pp. 60–71, (2006).
- [99] Bilgehan, H., *Klinik Mikrobiyoloji (Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları)*, 10. Baskı. Barış Yay. Fakülteler Kitabevi, İstanbul. (2000).
- [100] Kayser, F. K., Bienz, K. A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. F., eds. *Enterobacteriaceae. In: Medizinische Microbiologie*, 9th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 274-280, (1998).
- [101] Cengiz, A. T., *Stafilokoklar*, Ustaçelebi, Ş., ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 339-348, (2003).
- [102] Schleifer, K., H. and Bell, J., A., Family VIII. Staphylococcaceae fam. nov, In William, B., Whitman ed. *Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology Second Edition Volume 3 The Firmicutes*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 392-401, (2009).

- [103] Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A., *The Staphylococci. In*, Brooks GF, Butel JS, Morse SA, eds. Jawets, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 12th.Ed. New York, 223-30, (2004).
- [104] ISO 7405 International Standard 7405, "Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials", International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1997).
- [105] ISO 10993 International Standard 10993, "Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods", International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1999).
- [106] Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A., "A practical note on the use of cytotoxicity assays", *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 369-376, (2005).
- [107] Putnam, K., P., Bombick, D. W. and Doolittle, D. J., "Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate", *Toxicology In Vitro*, 16, 599-607, (2002).
- [108] Anonim, Antineoplastik (sitotoksik) ilaçlarla güvenli çalışma rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü, (2003).
- [109] Schmalz, G., "Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials", *Clinical Oral Investigations*, 1:154-162, (1997).
- [110] Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Ayaz, Tuylu, B., Turk, A. O. and Barutca, B., "Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract lichen *Cetraria aculeate* (Schreb.) Fr. *in vitro*", *Eskisehir*, (2008).
- [111] Gad, S. C., *In vitro toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York. (2000).

- [112] Aydın, E., “Bazı *Salvia* Genusu Üyelerinin *Acanthamoeba castellanii* Tedavisindeki Kullanım Potansiyellerinin ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas, (2008).
- [113] Modanlıoğlu, Ş. N., “*Inula peacockiana* (Aitch. & Hemsl.) *krovin* Türünün Farklı Ekstrelerinde Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2012).
- [114] Aksu, Y., “İhlamur (*Tilia Cordata*) ve Nane (*Mentha Piperita*)’de Toplam Fenol/Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Metal İçeriği İle Değişiminin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Elazığ, (2010).
- [115] Emen, S., “*Cyclotrichium niveum* Bitkisinin Farklı Polariteye Sahip Çözücülerle Hazırlanan Ekstraktlarının Antioksidant ve DNA’yı Serbest Radikallerden Koruma Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır, (2006).
- [116] Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E. and Bahorun, T. “Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps”, *Food Research International*, (2011).
- [117] Kara, S., “Farklı Kurutma Yöntemlerinin Zeytin Yaprağındaki Fenolik Madde Dağılımına ve Antioksidan Kapasitesine Etkisinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [118] Basile A., et all., “Antibacterial and Antioxidant Activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils”, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 240–248, (2006).

- [119] Smitha, S., Dhananjaya, B. L., Dinesha, R. and Srinivas, L. “Purification and Characterization Of a W34 Kda Antioxidant Protein (B-Turmerin) From Turmeric (*Curcuma longa*) Waste Grits”. *Biochimie.*, 1156-1162, (2009).
- [120] [https://en.wikipedia.org/wiki/Dumas\\_method](https://en.wikipedia.org/wiki/Dumas_method) (21.05.2014).
- [121] Sagdic, O., Aksoy, A., Ozkan, G., Ekici, L. and Albayrak, S. “Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 80-84, (2008).
- [122] Ebrahimabadi, A., Mazoochi, H. A., Kashi, F. J., Bidgoli, D. Z., and Batool, H.,”Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. From Iran”, *Food and Chemical Toxicology* 48, 1371–1376, (2010).
- [123] Köse, E. O., Deniz, İ. G., Sarıkurkcu, C., Aktas, O. and Yavuz, M., “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. And Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey”, *Food and Chemical Toxicology* 48, 2960–2965, (2010).
- [124] Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H. and Khalel K. I., “Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts”, *Industrial Crops and Products* 43, 827–831, (2013).
- [125] Ertaş, A. “Endemik İki *Sideritis* Türü *S. arguta* ve *S. congesta*’nın Diterpenik Bileşiklerinin İzolasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi.” Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Genel Kimya Anabilim Dalı, İstanbul, (2005).
- [126] Delamare, A. P. L., Pistorello, M. I. T., Artico, L., Serafini A. L. and Echeverrigaray, S., “Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated”, *Food Chemistry* 100, 603–608, (2007).

- [127] Candaş, A., “Türkiye’de Yaygın Kullanılan Bitki Çaylarının Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul, (2012).
- [128] Diken, M. E., “Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [129] Cheynier, V., Fulerand, H., Guyot, S., Oszmianski, J. and Moutounet, M., “Reactions of enzymically generated quinones relation to browning in grape musts and wines”, (Enzymatic browning and its prevention, Editors; Lee, C. Y. and Whitaker, J. R.), *ACS*, Washington DC, (1995).
- [130] Menghini, L., Pintore, G., Tirillini, B. and Leporini, L., “Chemical Composition, Antioxidant Activities and Protective Effects of *Sideritis italica* Extract on C2C12 Oxidative Stress”, *European Journal of Medicinal Plants* 4(4): 365-382, (2014).