

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



***ORIGANUM* L. CİNSİ *BREVIFILAMENTUM* SEKSİYONU
TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASİBE YILMAZ

BALIKESİR, KASIM - 2018

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



***ORIGANUM L. CİNSİ BREVIFILAMENTUM SEKSİYONU
TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI***

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASİBE YILMAZ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. TURGUT KILIÇ (Tez Danışmanı)

Dr. SEMA ÇARIKÇI (Eş Danışmanı)

Prof. Dr. AHMET CEYHAN GÖREN

Prof. Dr. TUNCAY DİRMENCİ

BALIKESİR, KASIM - 2018


KABUL VE ONAY SAYFASI

Hasibe YILMAZ tarafından hazırlanan "**ORIGANUM L. CİNSİ BREVIFILAMENTUM SEKSİYONU TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 09.11.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

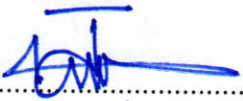
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Turgut KILIÇ



Üye
Prof. Dr. Tuncay DİRMENCI



Üye
Prof. Dr. Ahmet C. GÖREN



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 113Z225 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

ORIGANUM L. CİNSİ BREVIFILAMENTUM SEKSİYONU TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HASİBE YILMAZ

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)

(EŞ DANIŞMAN: DR. SEMA ÇARIKÇI)

BALIKESİR, KASIM - 2018

Bu çalışma, *Origanum L.* cinsi *Brevifilamentum* Ietsw. seksiyonu üyeleri *Origanum acutidens* (OA), *Origanum brevidens* (OB), *Origanum haussknechtii* (OH), *Origanum husnucan-baseri* (OHB), *Origanum leptocladum* (OL) ve *Origanum rotundifolium*'un (OR) uçucu yağlarının ve bu türlerden hazırlanan altı ekstraktının fenolik bileşenlerinin analizi, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tanımlanması, nicelendirilmesi ve değerlendirilmesine yöneliktir.

Hidrodestilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağların analizleri için GC-MS ve GC-FID kullanılmıştır. Kurutulmuş ve öğütülmüş bitkilerden hazırlanan metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının fenolik analizleri LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Türlerin antioksidan aktiviteleri üç yöntemle belirlenmiştir. Bunlar; DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi, Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodu ve β -Karoten-Linoleik Asit yöntemidir. Ekstrelerinin antikolinesteraz aktivite tayini AChE ve BChE enzimleri kullanılarak tayin edilmiştir.

Origanum cinsi *Brevifilamentum* seksiyonu türlerinden elde edilen yağların analizi sonucunda toplamda 74 bileşen belirlenmiş olup, bu bileşenler ise yağın toplamda % 94,1 ile % 99,8' ini oluşturmaktadır. Bileşenler kimyasal yapılarına göre 6 sınıfa ayrılmıştır: hidrokarbonlar ve türevleri, monoterpen hidrokarbonlar, oksijenli monoterpenler, seskiterpen hidrokarbonlar, oksijenli seskiterpenler ve fenolik bileşiklerdir.

Ekstrelerin fenolik bileşen analizinde polar metanol ekstraktlarında yüksek miktarda fenolik bileşikler tespit edilirken aseton ve kloroform ekstraktlarında daha az fenolik bileşik tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite sonuçları, *Brevifilamentum* seksiyonu türlerine uygulanan üç yöntem içinde iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle *Origanum acutidens* hem antioksidan hemde antikolinesteraz aktivite sonuçlarında en iyi aktiviteye sahiptir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Origanum*, *Bravifilamentum*, uçucuyağ, fenolik, antioksidan aktivite, antikolinesteraz aktivite, antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON SECTION *BREVIFILAMENTUM* OF *ORIGANUM*(L.)

SPECIES

MSC THESIS

HASIBE YILMAZ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR:PROF. DR. TURGUT KILIÇ)

(CO-SUPERVISOR:DR. SEMA ÇARIKÇI)

BALIKESİR, NOVEMBER 2018

This study was conducted to investigate essential oils, quantificate and evaluate phenolic compounds, antioxidant and anticholinesterase activities of the extracts prepared from dried herba of *Origanum acutidens* (OA), *Origanum brevidens* (OB), *Origanum haussknechtii* (OH), *Origanum husnucan-baseri* (OHB), *Origanum leptocladum* (OL) and *Origanum rotundifolium*(OR).

GC-MS and GC-FID were used for the analysis of the essential oils obtained from hydrodistillation method. Phenolic contents analyzes of methanol, chloroform and acetone extracts prepared from dried and grinded plants were performed using LC-MS / MS. Antioxidant activity of the species was investigated by three different methods such as DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl)free radical scavenging activity, Cupric (II) ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and β -carotene linoleic acid assays. The anticholinesterase activity of extracts was assayed using AChE and BChE enzymes.

The analysis of the oils obtained from the genus *Origanum* species belonging to section *Brevifilamentum* resulted 74 components in total, which constitute 94.1% to 99.8% of the total oil composition. Based on their chemical structures, the components were classified as hydrocarbons and derivatives, monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, and phenolic compounds.

Methanol extracts were found to be rich in quantity of phenolic content while less phenolic compounds were detected in acetone and chloroform extracts.

Antioxidant activity results revealed that *Breviflamentum* section has good antioxidant capacity for applied three methods. In particular, *Origanum acutidens* has good result both antioxidant and anticholinesterase activity assay.

KEYWORDS: *Origanum*, *Bravifilamentum*, essential oil, phenolics, antioxidant activity, anticholinesterase activity, antimicrobial activity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOLE ve KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Bitkinin Özellikleri	3
1.1.1 Labiatae (Lamiaceae) familyası	3
1.1.2 <i>Origanum</i> Cinsi.....	4
1.1.3 <i>Origanum acutidens</i> (Hand. -Mazz.) Ietsw.	5
1.1.4 <i>Origanum brevidens</i> (Bornm.) Dinsm.	6
1.1.5 <i>Origanum haussknechtii</i> Boiss.	7
1.1.6 <i>Origanum husnucan-baseri</i> H.Duman, Aytaç & A.Duran	9
1.1.7 <i>Origanum leptocladum</i> Boiss.	10
1.1.8 <i>Origanum rotundifolium</i> Boiss.	10
1.2 Uçucu Yağlar	12
1.2.1 Uçucu Yağların Eldesi	13
1.2.1.1 Mekanik Yöntem	14
1.2.1.2 Ekstraksiyon Yöntemi	14
1.2.1.3 Destilasyon Yöntemi	16
1.3 Terpenler.....	17
1.3.1 Terpenlerin Sınıflandırılması ve Biyosentezi	19
1.3.1.1 Monoterpenler.....	20
1.3.1.2 Seskiterpenler	20
1.3.1.3 Diterpenler	23
1.3.1.4 Sesterpenler.....	26
1.3.1.5 Triterpenler	26
1.4 Fenolik Bileşikler	26
1.4.1 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	27
1.4.1.1 Flavonoid Olmayanlar (Fenolik Asitler)	27
1.4.1.2 Flavonoidler	27
1.5 Antioksidanlar	32
1.5.1 Antioksidanların Sınıflandırılması.....	33
1.5.1.1 Doğal Antioksidanlar	33
1.5.1.2 Sentetik Antioksidanlar	34
1.5.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri.....	36
1.5.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi.....	36
1.5.2.2 Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodu ile antioksidan aktivite tayini.....	37
1.5.2.3 β -Karoten-Linoleik Asit yöntemi	37
1.5.3 Antikolinesteraz Yöntemi	38
1.5.3.1 AChE ve BChE Enzimleri	38

1.5.3.2 Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemleri.....	39
1.5.4 Antimikrobiyal Aktivite.....	39
2. DENEYSEL BÖLÜM	42
2.1 Bitkisel Materyal	42
2.2 Uçucuyağlar.....	42
2.2.1 Clevenger Cihazı ile Hidrodestilasyon	42
2.2.2 GC/MS-MS ile Analiz	42
2.3 Fenolik Bileşenlerin Analizi.....	43
2.3.1 Ekstrelerin hazırlanması	43
2.3.2 Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	43
2.3.3 Enstrümental Analiz ve Kromatografik Koşullar	44
2.3.4 LC-MS/MS Prosedürü	44
2.4 Antioksidan Aktivite Analizi.....	46
2.4.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi.....	46
2.4.2 CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayini	46
2.4.3 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi).....	47
2.4.4 Antikolinesteraz aktivite tayini	48
2.4.4.1 AChE aktivite testi.....	49
2.4.4.2 BChE aktivite testi	49
2.5 Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	50
3. BULGULAR	51
3.1 <i>Origanum</i> cinsi <i>Brevifilamentum</i> Seksiyonu Bitkilerinden Elde Edilen UçucuYağAnaliz Sonuçları.....	51
3.2 <i>Origanum</i> cinsi <i>Brevifilamentum</i> Seksiyonunun Fenolik Bileşenlerinin Analizi	54
3.3 Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları	63
3.3.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin sonuçları.....	64
3.3.2 CUPRAC metodu sonuçları.....	65
3.3.3 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi) sonuçları	66
3.4 Antikolinesteraz aktivite tayini sonuçları	67
3.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	69
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	71
4.1 Uçucu Yağ Analiz Sonuçları	71
4.2 Fenolik Bileşen Analiz Sonuçları	73
4.3 Biyolojik Aktivite Sonuçları.....	74
4.3.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları	74
4.3.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu (β -Karoten / Linoleik Asit)Yöntemi Sonuçları.....	75
4.3.3 CUPRAC Yöntemi	75
4.3.4 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	75
4.3.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	76
5. KAYNAKLAR.....	78
6. EKLER.....	92

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Origanum acutidens</i> genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak	6
Şekil 1.2: <i>O. brevidens</i> genel görünüş ve çiçek düzeni	7
Şekil 1.3: <i>O. haussknechtii</i> genel görünüş ve çiçek düzeni.....	8
Şekil 1.4: <i>O. husnucan-baseri</i> genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak	9
Şekil 1.5: <i>O. leptocladum</i> genel görünüş ve çiçek düzeni.....	10
Şekil 1.6: <i>Origanum rotundifolium</i> genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak	11
Şekil 1.7: <i>Origanum Cinsi Brevifilamentum</i> Seksiyonu Türlerinin Türkiye'deki dağılımı	12
Şekil 1.8: İzopren (2-metilbüta-1,3-dien)	18
Şekil 1.9: Mirsen molekülünün oluşumu.....	18
Şekil 1.10: α -pinen molekülünün oluşumu.....	18
Şekil 1.11: Bazı seskiterpenler	21
Şekil 1.12: β -Farnesen	21
Şekil 1.13: Germakren	21
Şekil 1.14: Bulnesol.....	22
Şekil 1.15: β -burbonen	22
Şekil 1.16: Sativen	22
Şekil 1.17: Dendrin.....	23
Şekil 1.18: Osimen	23
Şekil 1.19: Retinol	24
Şekil 1.20: Taksol	25
Şekil 1.21: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları.....	28
Şekil 1.22: Flavan (a) ve Flavon (b)	29
Şekil 1.23: Kaemferol.....	30
Şekil 1.24: Flavanonun yapısı	30
Şekil 1.25: Naringin.....	31
Şekil 1.26: Epikateşin.....	31
Şekil 1.27: Kateşin.....	32
Şekil 1.28: C Vitamini (Askorbik asit)'in yapısı.....	33
Şekil 1.29: E vitamininin kimyasal yapısı	34
Şekil 1.30: BHT'nin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 1.31: BHA'nin kimyasal yapısı	35
Şekil 1.32: TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	35
Şekil 1.33: Propil Gallat'ın kimyasal yapısı	36
Şekil 1.34: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin kimyasal yapısı ...	36
Şekil 2.1: İnhibisyon zon çapları	50
Şekil 3.1: Ekstraktların DPPH antioksidan aktivite sonuç grafiği.....	64
Şekil 3.2: Ekstraktların Cuprac metoduna göre belirlenen aktivite sonuçları ..	65
Şekil 3.3: Ekstraktların beta karoten antioksidan aktivite sonuç grafiği	66
Şekil 4.1: <i>Origanum</i> cinsinde miktarca fazla belirlenen uçucu yağ bileşenlerinin kimyasal yapıları	72

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: <i>Origanum</i> türlerinin listesi.....	5
Tablo 1.2: Terpenlerin sınıflandırılması	19
Tablo 2.1: Seçilen bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri	45
Tablo 3.1: Uçucu yağ GC-MS analiz sonuçları	52
Tablo 3.2: Metanol-1 ekstresinin fenolik bileşenleri	55
Tablo 3.3: Metanol-2 ekstresinin fenolik bileşenleri	57
Tablo 3.4: Kloroform ekstresinin fenolik bileşenleri.....	59
Tablo 3.5: Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri.....	61
Tablo 3.6: Ekstraktların antikolinesteraz aktivite tayini sonuçları.....	68
Tablo 3.7: <i>Origanum</i> türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları	70

SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

GC-MS	:Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
LC-MS	:Likit Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
DPPH	:1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
CUPRAC	:Cu ⁺² İndirgeme Kapasitesi
AChE	:Asetilkolinesteraz
BChE	:Bütirikolinesteraz
OA	: <i>Origanum acutidens</i>
OB	: <i>Origanum brevidens</i>
OH	: <i>Origanum haussknechtii</i>
OHB	: <i>Origanum husnucan-baseri</i>
OL	: <i>Origanum leptocladum</i>
OR	: <i>Origanum rotundifolium</i>
M1	:Metanol-1
M2	:Metanol-2
C	:Kloroform
Ac	:Aseton

ÖNSÖZ

Çalışmam süresince bana yol gösterip yönlendiren ve değerli zamanlarını ayıran, her zaman sabırlı ve anlayışlı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Turgut KILIÇ'a ve ikinci danışmanım Sayın Dr. Sema ÇARIKÇI'ya teşekkür ederim.

Her konuda büyük yardımlarını, bilgisini, desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Dr. Simay GÜNDÜZ'e, Burhanettin YALÇINKAYA'ya, Dr. Erkan MOZİOĞLU'na ve Nihal ZORLU'ya teşekkür ederim.

Beni bugünlere kadar getiren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Azime ŞAHAN ve canım babam M.Emin ŞAHAN'a, biricik kardeşime, tez çalışmalarım sırasında desteğini her an hissettiren ve anlayışını hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Oktay YILMAZ'a, hayatımı anlamlı hale getiren çocuklarım İpek ve Mert YILMAZ'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Balıkesir, Kasım 2018

Hasibe YILMAZ

1. GİRİŞ

Bitkilerin endüstriyel kullanımlarının yanında tedavi amaçlı kullanımı binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Aromatik bitkiler geleneksel tıpta farklı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde sağlığa yararlı etkileri nedeniyle kullanılırlar. Eski zamanlardan beri tatlandırıcılık kaliteleri için pişirme maddeleri olarak da kullanılmaktadırlar [1].

Modern tıbbın kurucusu sayılan ve günümüzde de tıbbın babası olarak kabul edilen Hipokrates (MÖ 460–377) eserlerinde 236 tür tıbbi bitkiden ayrıntılı olarak bahsetmiştir. Hipokrates'e göre bir hekim doğanın iyileştirici kudretinden faydalanmayı iyi bilmeli ve hastasını tedavi ederken asla ona zarar vermemelidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyanın gelişmekte olan ülkelerinde insanların %80' den fazlasının halen bitkisel ilaçlarla tedavi olmayı sürdürdüğünü rapor etmektedir [2].

Bitkisel ilaçlar, gelişmiş ülkelerde sadece hastalığın tedavisinde değil, sağlıklı bir yaşam sürdürmek amacıyla tercih edilmektedir. Bitkisel ilaçlara ilginin artmasının en önemli nedenlerinden biride çok geniş endikasyonlara sahip olmalarıdır. Ancak bitkisel ilaçların, kimyasal ilaçlarda olduğu gibi güvenilirlik, etkinlik ve saflık gibi kriterleri yerine getirmesi ve böylece insan sağlığı üzerine olası olumsuz etkilerinin önlenmesi gerekmektedir [2].

Bir bitkisel ilaçtan beklenen etki, kimyasal ilaçlardan farklı olarak bitkinin taşıdığı pek çok biyoaktif maddeden bazen tek birisinin değil birçoğunun ortak etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Etkisi kanıtlanmış biyoaktif bir maddenin ilaca dönüştürülmesi büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde geliştirilmiş modern ilaçlarda, farmakolojik güvence ve kalite standartları tam olarak belirlenebilmektedir [2].

Modern ilaçların yarısından fazlasının doğal ürün kökenli olması, bu durumun günümüzde de etkin bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık gereksinimlerini ilk önce geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun yarısından fazlası bitkileri tedavi amaçlı

kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 2'si bitkisel kökenli kimyasallardır [3].

Ülkemizde tıpta kullanılan bitki örneklerinin sayısı 500'e yakın olduğu düşünülmektedir [4]. Yapılan bir araştırmada, doğadan toplanarak ticareti yapılan bitki türlerinin sayısının 346 olduğu ve bunların 98'inin ihraç edildiği, 24'ünün endemik olduğu ve endemik türlerin 7'sinin de halen ihraç edildiği belirtilmektedir. İhraç edilip endemik türlere adaçayı, kekik, çöven ve şalba örnek verilebilir. Doğadan toplanarak pazarlarda ticareti yapılan türlerin sayısının da 170 olduğu bilinmektedir [5].

Ülkemizde, ihraç ettiğimiz, tıbbi ilaç yapımında ve baharat olarak kullanılan bitkiler kekik, defneyaprağı, kimyon, anason, rezene tohumu, ardiç kabuğu, mahlep, çemen, biberiye, meyan kökü, nane, sumak, adaçayı ve ıhlamur çiçeğidir [6].

Türkiye'de tedavi amacıyla geleneksel olarak faydalanılan bazı önemli tıbbi ve aromatik bitkiler;

Kekik (*Thymus L., Origanum L.*) hazmı kolaylaştırıcı, öksürükte, bağırsak parazitlerinin ve gazlarının giderilmesinde, mide ağrılarında, salgı artırıcı, antioksidan, romatizma, gaz ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır.

Meryemanadikeni (*Silybum marianum (L.) Gaertn.*) kronik karaciğer hastalıkları ve siroz tedavisinde kullanılmaktadır.

Keten (*Linum usitatissimum L.*) kandaki şeker miktarını ve kötü huylu kolesterol düşürmede kullanılmaktadır.

Yeşil Çay (*Camellia sinensis (L.) Kuntze*) güçlü bir antioksidan olarak kansere ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu olarak kullanılır.

Adaçayı (*Salvia officinalis L.*) beyin fonksiyonlarını geliştirir, karaciğeri temizler, sakinleştirir, stresi azaltır, hafızayı güçlendirir, kan şekerini düşürür, dişeti iltihaplanmasında ve gargara suyu olarak kullanılır.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) vücutta yağ yakımını hızlandırır, kan dolaşımını hızlandırır, romatizma ağrılarında, antioksidan ve hafıza yenileyici olarak kullanılır.

Nane (*Mentha ×piperita* L.) ve Zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) mide ağrısı ve mide bulantısına karşı kullanılır.

1.1 Bitkinin Özellikleri

1.1.1 Labiatae (Lamiaceae) familyası

Tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alan Lamiaceae veya Labiatae, genellikle nane veya ballıbaba ailesi olarak bilinen çiçekli bitkiler ailesidir. Bütün yerleşim bölgelerinde ve yüksekliklerde yetişmekte, geniş alanda yayılış göstermektedir [7]. Lamiaceae familyasına ait bitkilerin en önemli özelliği, özel bir koku veren aromatik bileşiklere sahip olmalarıdır [8, 9, 10].

Lamiaceae (Labiatae), özellikle ılıman iklim kuşağında ve Akdeniz ülkelerinde yer alan birçok ülkede yetişebilen 200 kadar cins ve 7000'in üzerinde türü bulunan zengin bir familyadır. Bu bitkilerin büyük kısmı eski zamanlardan bu yana halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde, tıpta, gıda endüstrisinde, parfümeri ve kozmetikte kullanılan bitkilerdir [11].

Yapılan son araştırmalara göre, Türkiye'de 46 cins ve yaklaşık 600 tür (yaklaşık 750 takson) olmak üzere Türkiye'nin üçüncü büyük ailesidir ve bunların yaklaşık 350'si Türkiye'ye endemiktir ve endemizm oranı yaklaşık % 44'tür [12-16].

Lamiaceae familyası ekonomik yönden büyük öneme sahiptir. İçerdikleri aromatik bileşikler ve temel yağlar sayesinde parfüm ve gıda sanayisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [17,18]. Genellikle gıdalarda lezzet verici olarak kullanılan, *Mentha* L., *Origanum*, *Thymus* cinsleri Akdeniz orjinli aromatik bitkilerdir. Diğerleri ise içerdikleri zengin temel yağlar ve aromatik bileşiklerden dolayı parfüm ve ilaç sanayisinde kullanılan bitkilerdir [19].

1.1.2 *Origanum* Cinsi

Türkiye’de geleneksel tedavi amacıyla çok kullanılan ve kekik olarak bilinen bitki, Lamiaceae üyelerinden biri olan *Origanum*'dur. Kekik, Lamiaceae (Labiatae) familyasından değerli uçucu yağ ve baharat bitkisidir. Kekik olarak bilinen ve bu amaçla kullanılan birçok bitki türü bulunmaktadır. Özellikle uçucu yağında karvakrol ve timol uçucu yağ bileşenleri bulunan türler ‘kekik’ olarak bilinmektedir. Dünyada en fazla *Thymus* (Thyme), *Origanum* (Oregano Marjoram), *Satureja* L. (Savory) ve *Thymbra* L. (Black Thyme) cinslerine giren türler kekik olarak değerlendirilmektedir [2].

Dünyada 50 kadar türü bulunan *Origanum* türleri birden fazla dik gövdesi bulunan, çok yıllık otsu veya yarı çalimsı bitkiler olup çiçekleri salkımsı veya gövde uçlarında toplu haldedir. Genel yayılışı ise Akdeniz Bölgesinde ve Balkanlarda görülmektedir [20]. Bu bitkiler, genellikle sıcak iklimde, besince zengin ve kireçli topraklarda yetişmektedir. *Origanum* türleri doğadan toplandığı gibi bir kısmı da çelik ve tohumla üretilmektedir [21].

Kekik, baharat ve bitki çayı olarak kullanılır. Kekik yağı ve kekik suyu kurutulmuş kekikten üretilmekte ve mide ülseri, diyare, kan kolesterolü, glikoz seviyeleri ve benzeri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [22].

Origanum türlerinin kimyasal içeriklerini ve aktivitelerini araştırmak için birçok fitokimyasal çalışma yapılmıştır. Özellikle uçucu yağ için yapılan çalışmalar, kekik yağının, karvakrol ve timol gibi fenolik bileşikler bakımından zengin olduğunu göstermiştir [22, 23]. Ek olarak, bu türlerden elde edilen özütlerde Rozmarinik asit, kafeik asit, ferulik asit, apigenin, luteolin, salvigenin ve kateşin gibi fenolikler bulunmaktadır [24-26]. *Origanum* türleri analjezik, anafrodizyak, antioksidant, antispazmik, antiviral, antibakteriyal, gaz giderici, kalbi uyarıcı, terletici, sindirimi kolaylaştırıcı, idrar artırıcı, adet söktürücü, fungisidal, balgam söktürücü, müshil, sakinleştirici, midevi, tonik, yara iyileştirici gibi birçok etkiye sahiptir [27].

Bu çalışmada, *Origanum* L. cinsi *Brevifilamentum* Ietsw. seksiyonu üyelerinin fitokimyasal analizini amaçlanmış olup, çalışmanın kapsamı türlerin taşıdığı uçucu yağ bileşenlerinin ve türlerden hazırlanan ekstrelerin fenolik

bileşenlerinin analizi ve ekstrelerin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tanımlanması, nicelendirilmesi ve değerlendirilmesine yöneliktir.

Tablo 1.1: *Origanum* türlerinin listesi.

Kodu	Herbaryum No	Adı	Lokalite
OA	T.A. 2825	<i>Origanum acutidens</i> (Hand.-Maz.) Ietsw.	Malatya: Gündüzbey ve Kozluk arasında
OB	T.D. 4270	<i>Origanum brevidens</i> (Bornm.) Dinsm.	Osmaniye : Yarpuz ve Yağlıpınar arasında
OH	T.A. 2824	<i>Origanum haussknechtii</i> Boiss.	Erzincan: Kemaliye ve Arapkir arasında
OHB	T.D. 4298	<i>Origanum husnucan-baseri</i> H.Duman, Aytaç & A.Duran	Alanya ve Gökbel yaylası arasında, Kuşyuvası bölgesi, tüneller
OL	T.D. 4290	<i>Origanum leptocladum</i> Boiss.	Karaman: Ermenek ve Kazancı arasında, Görmeli köyü
OR	T.D. 3943	<i>Origanum rotundifolium</i> Boiss.	Artvin – Ardanuç yolunda

1.1.3 *Origanum acutidens* (Hand. -Mazz.) Ietsw.

Origanum acutidens çok yıllık, yarı çalimsı, 50 cm'e kadar boylanabilen bitkilerdir. Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölümü, Erzurum-Kars Bölümü, Yukarı Kızılırmak Bölümü, Yukarı Fırat Bölümü, Yukarı Murat-Van Bölümü, Hakkari Bölümünde, kalkerli ve kalkersiz kayalarda, yamaçlar ve çağılıklarda yetişmekte olup endemik değildir [28].



Şekil 1.1: *Origanum acutidens* genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak

1.1.4 *Origanum brevidens* (Bornm.) Dinsm.

Origanum brevidens çok yıllık, yarı çalı şeklinde, gövdenin tabanında kısa yumuşak tüylü, yukarıya doğru tüsüz, bazen sapsız salgıdır. Ülkemizde Güney Anadolu bölgesinde (Osmaniye), *Pinus nigra* J.F.Arnold, *Fagus* sp., *Quercus* sp. ormanı altında yetişmektedir. Endemikdir [28].



Şekil 1.2: *O. brevidens* genel görünüş ve çiçek düzeni

1.1.5 *Origanum haussknechtii* Boiss.

Origanum haussknechtii çok yıllık, yarı çalı şeklinde, ülkemizde Doğu Anadolu bölgesinde (Adıyaman, Malatya, Erzincan), dağlık alanlarda endemik olarak yetişmektedir [28].



Şekil 1.3: *O.haussknechtii* genel görünüş ve çiçek düzeni

1.1.6 *Origanum husnucan-baseri* H.Duman, Aytaç & A.Duran

Origanum husnucan-baseri çok yıllık, yarı çalı şeklinde, ülkemizde Akdeniz bölgesinde (Antalya), kalkerli kayalık yerlerde ve *Pinus nigra* ormanında endemik olarak yetişmektedir [28].



Şekil 1.4: *O. husnucan-baseri* genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak

1.1.7 *Origanum leptocladum* Boiss.

Origanum leptocladum çok yıllık, yarı çalı şeklinde, ülkemizde Akdeniz bölgesinde (Karaman), kalkerli yamaçlarda ve kireçli tepe eteklerinde endemik olarak yetişmektedir [28].



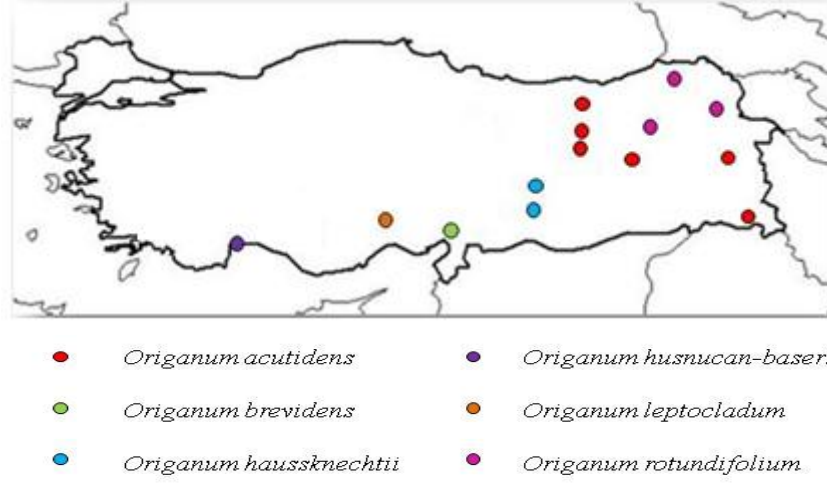
Şekil 1.5: *O.leptocladum* genel görünüş ve çiçek düzeni

1.1.8 *Origanum rotundifolium* Boiss.

Origanum rotundifolium çok yıllık, yarı çalı şeklinde, ülkemizde Doğu Karadeniz Bölümü, Erzurum ve Kars, kalkerli ve kalkerli olmayan kayalar ve yamaçlarda yetişmektedir. Endemik değildir [28].



Şekil 1.6: *Origanum rotundifolium* genel görünüş, çiçek düzeni ve yaprak



Şekil 1.7: *Origanum* Cinsi *Brevifilamentum* Seksiyonu Türlerinin Türkiye'deki dağılımı

1.2 Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bitkilerden birçok metotla elde edilen oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, çabuk kristalleşebilen, uçucu, keskin kokulu, su buharı destilasyonu yöntemi ile elde edilen, yağimsı karışımlardır. Uçucu yağlar kendilerine özel koku, renk, tat ve görünümleri olan ve uçucu özelliğe sahip olan maddelerdir [29]. Bitki metabolizmasında, yararlı böcekleri kendine çekme (etkileme), zararlı mikroorganizmalara ve otçullara karşı da onların iştahlarını azaltarak kendini koruma gibi çeşitli ve önemli rolleri vardır [30].

Uçucu yağlar içerdikleri maddelerin özelliklerine göre birçoğu antimikrobiyel etki göstermektedir [31]. Antiseptik, antibakteriyel, antiviral, antifungal, analjezik, yatıştırıcı, anestetik [30] özelliklerinden dolayı tıpta dermatoloji, üroloji, uyku ve sinir bozuklukları gibi çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır [32].

Uçucu yağ içeren bitkiler daha çok sıcak iklim bölgelerinde yetiştiklerinden dolayı Akdeniz bölgesi bu bitkilerce en zengin bölgelerden biridir [33]. Ticari olarak üretilen uçucu yağ bitkilerinin sayısı 40'ı geçmektedir. Bazı familyalar uçucu yağ taşıyan bitkiler nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Labiatae familyasında, en çok Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde üretimi yapılan *Thymus*, *Lavandula* L., *Mentha* türleri uçucu yağ kaynağı bakımından oldukça zengindir [34].

Uçucu yağlar bitkinin çiçek, yaprak, meyve, odunsu, sap ve kabuk kısımlarında bulunmaktadır [35]. Uçucu yağlar gıdalarda aroma vermek için baharat olarak, kozmetikte parfümlerin hammaddesi olarak, eczacılıkta ilaçların koku ve tatlarını düzeltmek amacıyla kullanılmaktadır [36].

Uçucu yağlar böcekleri uzaklaştırmak için de kullanılır. Uçucu yağların sadece böcekleri uzaklaştırmakla kalmadığı, temas veya buharla dezenfeksiyon şeklinde böceklere karşı insektisit etki yaptığı ve bazı önemli bitkisel hastalık yapıcı bakterilerin üremesine karşı etkili olduğu, aynı zamanda da bazı uçucu yağların terpen ve fenollerinin bazı böceklere karşı toksik etki gösterdiğini belirten araştırmalar mevcuttur [37, 38].

1.2.1 Uçucu Yağların Eldesi

Uçucu yağlar, uçucu yağ miktarı ve bileşenlerine göre 3 ana yöntemle elde edilebilir [39, 40]. Bu yöntemler;

1. Mekanik Yöntem

2. Ekstraksiyon Yöntemi

a) Organik Çözücü ile Tüketme

b) Sabit Yağ ile Tüketme

3. Destilasyon Yöntemi

a) Su Destilasyonu (Hidrodestilasyon)

b) Buhar Destilasyonu

c) Su Buharı Destilasyonu

Bu çalışmada yukarıda belirtilen metotlardan su destilasyonu (hidrodestilasyon), yöntemi kullanılmıştır.

1.2.1.1 Mekanik Yöntem

Bazı bitkilerin tedavide kullanılan bölümlerinden (drog) destilasyon ile uçucu yağ elde yönteminde, bitkinin bazı yerlerindeki uçucu yağ bozunmaktadır. Bu gibi durumlarda bitkinin bu kısmına presleme yöntemi uygulanır ve bu yöntemle elde edilen bu yağlar berrak değildir. Berrak olmayan uçucu yağları berraklaştırmak için süzme, santrifüj, alkol ile seyreltme ve ısıtma işlemleri uygulanır.

1.2.1.2 Ekstraksiyon Yöntemi

1.2.1.2.1 Organik Çözücülerle Özütleme

Su buharıyla bazı bitkilerin esansları bozulabilir, bazı bitkilerde bulunan uçucu yağ miktarı az ise destilasyon yöntemiyle ekstraksiyon işlemi zordur. Bu durumlarda ekstraksiyon metodu kullanılır. Bu ekstraksiyon metodunda esanslı yapraklar, meyveler ve kökler uygun bir solventle ekstre edilirler. Kullanılacak solvent bitkiye göre seçilir. En çok kullanılan solventler; benzen, benzen + aseton karışımı ya da benzen + petrol eteri karışımıdır. Ekstraksiyon sıcaklığı, ya normal sıcaklıkta olur ya da solventin kaynama noktasına göre belirlenir. Yeni bir patente göre ekstraksiyon solventi olarak sıvı bütan kullanılmaktadır [41]. Son yıllarda ise CO₂ ekstraksiyonu (süper kritik sıvı ekstraksiyonu) en popüler ekstraksiyon biçimi kabul edilmektedir [41]. Fakat çok pahalı sistemler olmasından dolayı yaygın değildir.

Ekstraksiyon esnasında solvent, esansla birlikte bitkisel maddeleri, pigmentleri ve bazı hidrofobik bitkisel maddeleri de çözer ve solventin destilasyonunda geriye kalan ürüne “concrete” (konkret) denir. Konkret sıvı, yarı katı veya katı olabilir. Bazı konkretlerin %50'sinden fazlasını sabit yağ, mum ve değişen miktarlarda pigment oluşturur. Konkret, sıcak etanol ile özütlenir ve alkol vakum altında uzaklaştırılırsa saf uçucu yağ veya absolü elde edilir. Ekstraksiyonda kullanılacak olan solvent inert, düşük kaynama noktalı, seçici bir etkiye sahip, ucuz, kolay bulunur ve su ile karışmayan özellikte olmalıdır [42-45].

1.2.1.2.2 Soğuk Yağ İle Özütleme (Anfloraj)

Soğuk yağ ile özütleme işlemine anfloraj denmektedir. Yağlar yüksek absorpsiyon gücüne sahiptirler ve koku maddesi taşıyan yağlarla temas ettirildiklerinde içeriği kolayca absorplama özelliğine sahiptirler. Bu yöntemin adı Anfloraj (Enfleurage)'dır. Bu yöntem, 1750 yılında bulunmuştur [46]. Yasemin çiçeği gibi bazı çiçekler hasat edildikten sonra 24 saatten daha fazla süre fizyolojik aktivitelerini devam ettirirler. Bu özelliğe sahip olan çiçekler soğuk yağ ile özütlenirler. Bu yöntem için seçilen yağ kokusuz ve uygun kıvamda olmalıdır. Genellikle saflaştırılmış domuz yağı ile içyağı karışımı kullanılır. Yağ, kenarları tahta çerçeve ile kaplanmış bir cam plaka üzerine yayılır ve yağ ile kaplanmış bir plaka bunun üzerine kapatılır. Taze toplanmış çiçekler yağın üzerine serpilir. 24 saat bekletilir, sonra işi biten çiçekler alınıp yerlerine yenileri konur. Bu işleme yağ tamamen doyuncaya kadar devam edilir. Elde edilen bu ürüne "Pomat" adı verilir. Pomat alkol ile özütlenir, özüt donma noktasının altında dondurucuda tutulur. Alkolde çözülmüş durumdaki yağ süzülür, alkol düşük basınçta destilasyonla uzaklaştırılır. Bu ürüne "Absolü" adı verilir [36,42,45].

1.2.1.2.3 Sıcak Yağ İle Özütleme (Maserasyon)

Sıcak yağ ile özütleme işlemine maserasyon denmektedir. Gül, mimazo, akasya, portakal çiçeği gibi çiçeklerin fizyolojik aktivitesi koparma sonucu hemen durur. Çiçekler 60-70 °C sıcaklıktaki yağa daldırılarak özütlenir. İçindeki uçucu yağlı alınan çiçeklerin üzerine tazesiyerleştirilir. Bu işlem yağ doyana kadar devam edilir. Süzme işleminden sonraki kalıntı (pomat) elde edilir. Soğuk yağla ekstraksiyona benzer yolla pomattan alkol özütü ve "Absolü" hazırlanır [36, 42].

1.2.1.3 Destilasyon Yöntemi

1.2.1.3.1 Su Destilasyonu (Hidrodestilasyon)

Su destilasyonunun diğeri bir adıda hidrodestilasyondur. Su destilasyonu yöntemi, kurutulmuş ve ıslatmakla bozunmayan bitkisel materyallerden uçucu yağ elde edilmesi için uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemle, elde edilen uçucu yağın yanında aromatik suda elde edilir [33, 39, 40]. Su destilasyonu yönteminde, eklenecek su miktarı uçucu yağ çıkarılacak bitkiyi örtecek kadar olmalıdır. Su miktarı az olması halinde aşırı ısınma halinde bitki kavrulmaktadır. Sistem dışarıdan ısıtılarak suyun dokulara nüfus etmesi sağlanır ve bu şekilde kuvvetli polar maddelerin önce çözünmesi sağlanır. Düşük polariteye sahip maddeler ise daha sonra distillenir. Yağ taşıyan buharlar soğutucuda yoğunlaşarak toplama kabında toplanır. Toplama kabında toplanan uçucu yağlar, sudan hafif olduğu için faz oluşturur ve sonrasında kolayca ayrılır [47].

1.2.1.3.2 Su-Buhar Destilasyonu

Sıcaklığa duyarlı, su ile karışmayan sıvıların kendi kaynama noktalarından daha düşük sıcaklıktaki distilasyonları için kullanılan yöntem su buharı distilasyonu denir. Su buharı ile destilasyonda kazandı çıkan su buharı içinde bitki ve su bulunan başka bir kaba aktarılır. Bulunan esans buharı ve su buharı soğutucuya geçer.

1.2.1.3.3 Buhar Destilasyonu

Bitkilerin çiçek, kök ve yapraklarından uçucu yağ elde etmek için kullanılan yöntem buhar destilasyonu denir. Buhar destilasyonu yöntemi, uçucu yağ üretiminde dünyada en yaygın olan az tehlikeli ve ekonomik üretim metodlarından biri olduğundan en çok tercih edilen bir yöntemdir. Buhar destilasyonu yönteminde, cam kap içerisine yerleştirilen bitkiye basınç yardımıyla uygulanan buhar, yağ

damlacıklarını sürükleyerek toplama kabına getirir ve uçucu yağ yoğunlaşarak sudan ayrılmaktadır.

1.3 Terpenler

Terpenler, bitkilere kendilerine has koku ve tat verirler. Doğada birçok üyesi vardır. Uçucu yağların başlıca maddelerini terpenler oluşturmaktadır.

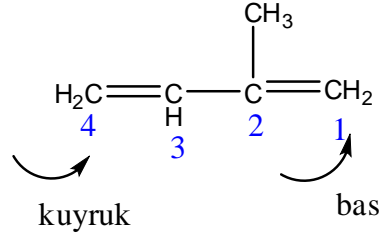
Terpenler, β - karoten, skualen, fitol ve steroidler gibi zincirli maddelerdir, bu maddeler izopren denen beş karbonlu ünitelerden oluşurlar. İzoprenin kimyasal adı 2- metil-1,3- bütadiendir (Şekil 1.8).

Bitkilerden, kozalaklı çam ağaçlarından ve bazı böceklerin osmeterium kısımlarından elde edilebilmektedirler. Bu bileşikler gerçekte “terpen” ismini reçineden elde edilen“turpentin” bileşiğinden almaktadırlar [48,49].

Uçucu yağlarda C ve H bulunduran oksijensiz terpenik maddelere hidrokarbür denir. Doğal olarak bulunan her terpenin oksijen içeren türleri de (alkol, aldehit veya keton) vardır. Bu formlar ya dallanmış zincir biçiminde halka yapısında bulunmaktadır [50]. Açık zincirli ve halkalı yapıda olan çeşitli fonksiyonel grupları bulunan 20.000’ in üzerinde terpen yapıları bulunmaktadır [51].

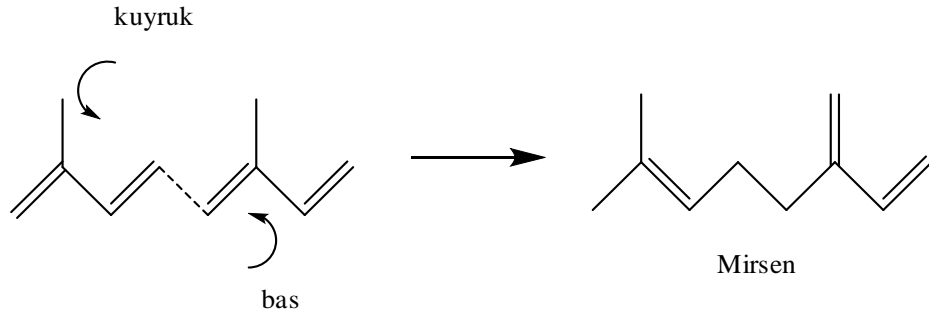
Terpenler iki izopren (2-metil-1,3-bütadien) molekülünün baş-kuyruk kondenzasyonu reaksiyonu sonucu meydana gelmektedirler.

Bu kurala göre izopren ünitesinde bulunan 1 nolu karbon (dallanmış tarafta bulunan) baş olarak adlandırılırken, 4 nolu karbon (dallanmanın olmadığı tarafta bulunan) kuyruk olarak adlandırılır.



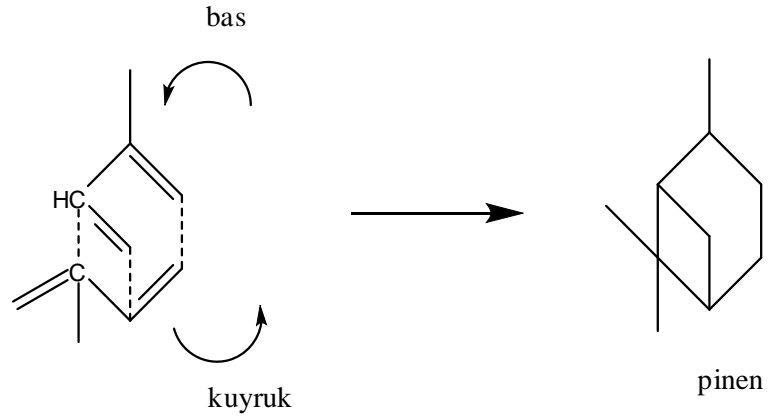
Şekil 1.8: İzopren (2-metilbüta-1,3-dien)

Mirsenin'in iki izopren ünitesinin baş – kuyruk kondenzasyonu ile oluşması Şekil 1.9'da örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.9: Mirsen molekülünün oluşumu

α -pinende benzer şekilde baş-kuyruk kondenzasyonu ile oluşmaktadır (Şekil 1.10) [51].



Şekil 1.10: α -pinen molekülünün oluşumu

Uçucu yağlarda bulunan ve oksijen içermeyen terpenik maddelere hidrokarbür denilmekte, ayrıca oksijen içeren türleri de bulunup temelde alkol, aldehit veya keton formlarından oluşmaktadırlar. Yapıları ise dallanmış zincir biçiminde ya da siklik yapı (halkalı yapı) şeklinde olabilmektedir [50].

1.3.1 Terpenlerin Sınıflandırılması ve Biyosentezi

Terpenler ana maddeleri olan izopren ünitelerinin biyosentezi yoluyla oluşup bu birimlerin sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu tanımdan yola çıkarak iki izopren ünitesinin biyosentezi yoluyla oluşan 10 karbonlu moleküller monoterpenler, 15 karbonlu moleküller seskiterpenler ve 20 karbonlu moleküller ise diterpenler olarak adlandırılmaktadırlar (Tablo 1.2).

Tablo 1.2: Terpenlerin sınıflandırılması.

İzopren Sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler	40
N	Politerpenler	(5) _n

Terpenler fiziksel özelliklerine göre iki grupta incelenmektedir [52].

Uçucu terpenler; su buharı destilasyonu ile sürüklenebilen küçük moleküllü monoterpenler ve bazı seskiterpenlerdir.

Uçucu olmayan terpenler; büyük moleküllü seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler ve politerpenlerdir.

Uçucu yağların içerisinde monoterpen yapısında olan maddelerle, bazı seskiterpenik maddelere rastlanmaktadır. Bazı seskiterpenler ile diterpen, triterpen ve politerpenler ise uçucu olmayan terpenlerdir. Su buharı ile sürüklenemedikleri için elde etme sırasında uçucu yağa geçemezler. Diterpenler ile triterpenler ise bitkilerin sakız ve reçinelerinden elde edilmektedir. Tetraterpenler (karotenler) ise düzenlenmiş bir gruptur ve ayırıcı grup olarak davranabilirler. Kauçuk ise en çok bilinen politerpendir [53].

1.3.1.1 Monoterpenler

Monoterpenler aroma verici olarak kullanılırlar ve meyvelerde bulunurlar. Yaygın olarak kullanılan monoterpenler α -pinen ve β -pinen'dir. En çok çam ağaçlarında bulunurlar. Plastik sanayinde hammadde, parfümeri sanayinde ise başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. İlaç sanayinde de antispazmotik, antibakteriyel, antifungal ve hatta antikanser özellikleri nedeni ile kullanılırlar [54]. Monoterpenlerden mentol nandede, limonen ise turunçgillerde bulunmaktadır. Nandede bulunan mentol, turunçgillerde bulunan limonen en fazla bilinenlerdir. Limonenin antikanserojen etkisi olduğu bilinmektedir.

Monoterpenler yapılarına göre üç grupta incelenirler;

Asiklik monoterpenler: Düz zincir halindedir ve 3 çift bağ taşırlar. Optikçe aktiflikleri yapılarında taşıdıkları asimetrik karbon atomundan ileri gelmektedir.

Monosiklik monoterpenler: Bir halka ve iki çift bağ taşırlar.

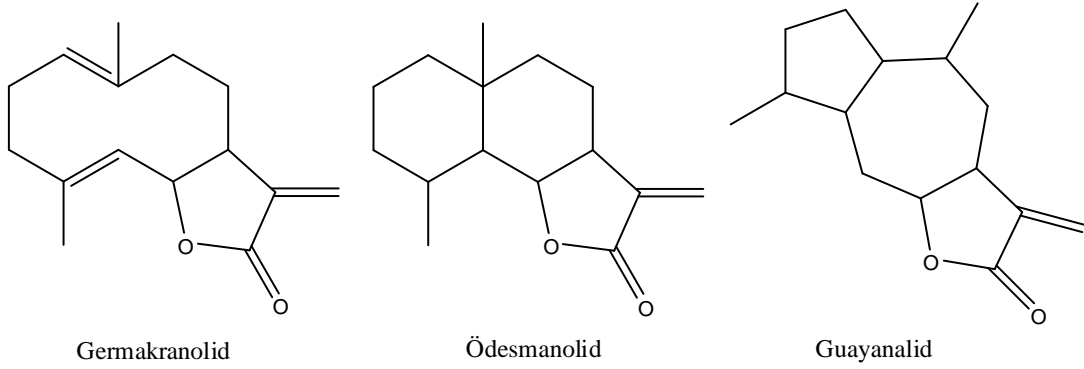
Bisiklik monoterpenler: İki halka ve bir çift bağ taşırlar.

1.3.1.2 Seskiterpenler

Seskiterpenler, üç izopren biriminden oluşan, $C_{15}H_{24}$ molekül formülüne sahip birçok farklı organizmada rastlanan büyük bir madde grubudur. Özellikle Compositae familyasında bulunan bitkilerin içerisinde seskiterpenler aktif bileşen olarak bulunmaktadır [55-57].

Seskiterpenler fizyolojik etkileri yönünden incelendiğinde, taşıdıkları bileşiklerdenileri gelen fitotoksik ve antibiyotik özellikleri olduğu görülmüştür. Örnek olarak bitkilerde hormonların uyarıcı veya inhibe edici dengelerini korumalarına yardımcı oldukları söylenebilir [58].

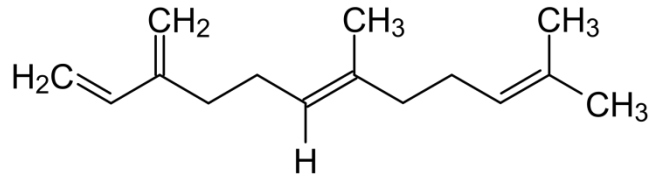
Seskiterpen laktonları içerdikleri karbosiklik iskelet yapısına bağlı olarak; 10 üyeli halka germakranolidler, birbirine bağlanmış iki altılı halka bulunduran ödesmanolidler ve yedi üyeli halkaya bağlı beşli bir halka guayanalidler olmak üzere üç grupta incelenir [56]. Şekil 1.11'de germakranolidler, ödesmanolidler, guayanalidler verilmiştir [56].



Şekil 1.11: Bazı seskiterpenler

1.3.1.2.1 Asiklik seskiterpenler

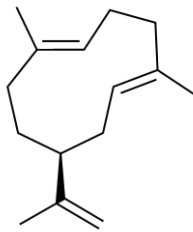
Bu gruba örnek olarak papatya uçucu yağında bulunan β -farnesen ile elma ve armut gibi meyvelerde bulunan α -farnesen verilebilir.



Şekil 1.12: β -Farnesen

1.3.1.2.2 Monosiklik seskiterpenler

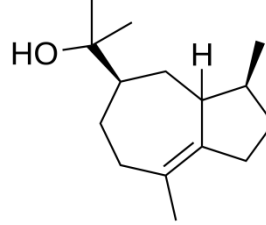
Bu gruba örnek olarak *Eunicea mammosa* da bulunan germakren A, *Citrus junos* kabuk yağında bulunan germakren B ve *Kadsurajaponica* kuru meyvelerinde bulunan Germakren C verilebilir.



Şekil 1.13: Germakren

1.3.1.2.3 Bisiklik seskiterpenler

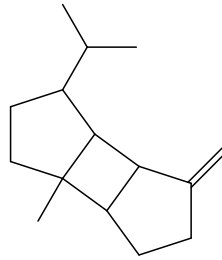
Pogostemon patchouli'nin paçuli yağında bulunan α -guayen, β -bulnesen ve bulnesol bu grubun başlıca örnekleridir.



Şekil 1.14: Bulnesol

1.3.1.2.4 Trisiklik seskiterpenler

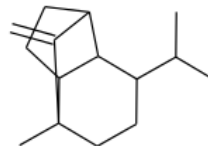
Geranium bourbon uçucu yağında bulunan β -burbonen ve *Eupatorium serotinum* da bulunan α -kubeben bu grubun iki örneğidir.



Şekil 1.15: β -burbonen

1.3.1.2.5 Tetrasiklik seskiterpenler

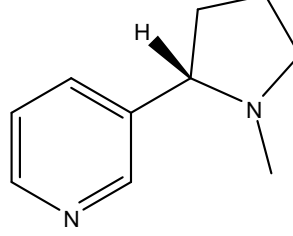
Vetiveria zizanoides uçucu yağında bulunan siklokopakamfenol ile *Helminthosporium sativum* yağında bulunan siklosativen ve sativen başlıca örneklerdendir.



Şekil 1.16: Sativen

1.3.1.2.6 Azotlu heterosiklik seskiterpenler

Bu gruba örnek olarak *Dendrobium nobile* (Orchidaceae)'de bulunan dendrin ve dendrobin verilebilir.



Şekil 1.17: Dendrin

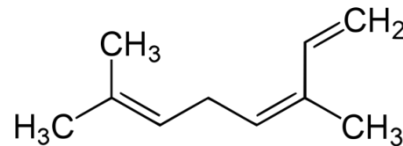
1.3.1.3 Diterpenler

Dört izopren ünitesinden oluşan diterpenler en basit haliyle $C_{20}H_{32}$ molekül formülüne sahiptirler. Esasında bitki ve mantar orijinli bileşikler olmalarına rağmen deniz ve böcek dünyasında da bulunmaktadır [59]. Yapılarının çok çeşitli olması, bitkilerden izole edilmesi ve kompleks diterpen karışımlarının ayrılması değişik ekstraksiyon sistemleri ve ayırma yöntemlerinin gelişmesine yol açmıştır [60].

Diterpenler, kimyasal yapılarına göre şu şekilde gruplandırılabilir:

1.3.1.3.1 Asiklik diterpenler

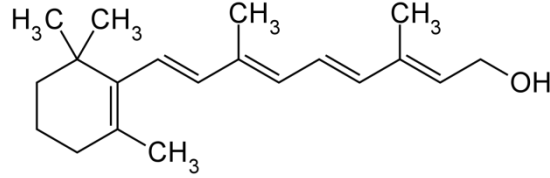
Doğada az rastlanan diterpenler olup genellikle deniz ürünlerinden elde edilmektedir. Yeşil algler doğrusal yapıdaki asiklik diterpenler için bir kaynak oluşturmaktadır [61]. Osimen, geraniol, farnesol türevleri ve oksepan diterpenler bunlara ait örneklerdir.



Şekil 1.18: Osimen

1.3.1.3.2 Monosiklik diterpenler

Doğada en çok bulunan ve en önemli monosiklik diterpen Aıvitamini (Retinol) dir.



Şekil 1.19: Retinol

1.3.1.3.3 Bisiklik diterpenler

Labdanlar, klerodan ve neoklerodanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Labdanlara özellikle Compositae ve Lamiaceae familyalarındaki bitkilerde yaygın olarak rastlanmaktadır. Bunlardan forskolin *Coleus forskohlii* bitkisinden izole edilen ve antihipertensif etkisi saptanmış labdan yapısında önemli bir bisiklik diterpendir [62].

Klerodanlar ve neoklerodanlar başlıca *Teucrium* türleri olmak üzere, *Ajuga* ve *Scutellaria* türlerinden de elde edilen ve insekt antifeedant etki gösteren bisiklik diterpenlerdir [63].

1.3.1.3.4 Trisiklik diterpenler

Başlıcasını abietan ve pimarane diterpenler oluşturur. Fosil reçineleri üzerinde yapılan bir çalışmada büyük miktarda abietan yapısındaki dehidroabietik asiti içerdiği görülmüştür. Böylece bu yapıları içeren bileşiklerde antibakteriyel aktivite çalışmaları artmış ve bu aktiviteye sahip çok sayıda bileşik izole edilmiştir. Özellikle *Salvia* türleri oksijenli abietanların ve onların rearanje ürünlerini içeren zengin bir kaynak teşkil etmektedirler [64].

Pimarane yapısında trisiklik diterpen olan pimarik asit bileşiğine birçok bitkide rastlanmıştır. *Pinaceae* reçineleri de pimarane ve abietan yapısında diterpenler bakımından zengindir [65].

1.3.1.3.5 Tetrasiklik diterpenler

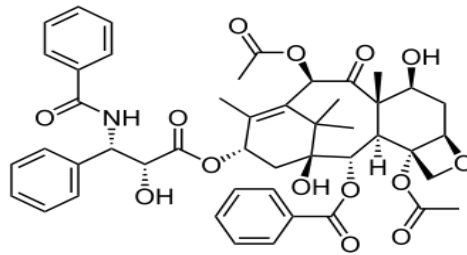
Bu gruba pek çok değişik diterpen dahildir. Çin halk tıbbında çok geniş bir kullanımını olan *Rabdosia* (Lamiaceae) cinsinden çok sayıda kauren yapısında bileşik izole edilmiştir. Bunlara bulyanini örnek verebiliriz [66].

Gibberellinler bitkilerde yaygın olarak bulunan büyümeyi stimüle eden önemli tetrasiklik diterpenlerdir ve bitkiye koruyucu özellik verirler. *Kalmia angustifolia* bitkisinden elde edilen grayanotoksin yapısındaki kalmanol bileşiği kardioaktif özellik göstermesi nedeniyle ilgi çekmiştir [61].

1.3.1.3.6 Makrosiklik diterpenler

Makrosiklik diterpenler sembran, jatrofan, dafnan, ingenan, taksan, fuzikokan, latiran olarak yedi sınıfa ayrılmışlardır. Tütün yaprak ve çiçeklerinden çok sayıda sembran yapısında makrosiklik diterpen elde edilmiştir. *Euphorbia* türlerinden jatrofan ve ingenan yapısında bileşikler izole edilmiştir. Bu cins önemli biyolojik aktiviteler gösteren makrosiklik diterpenler yönünden zengin bir kaynak oluşturmaktadır. Örneğin *E. kamerunica* bitkisinden elde edilen ingenan yapısındaki ingol esterlerinin sitotoksik etkileri saptanmıştır [67].

Taksanlar önemli biyolojik aktiviteler gösteren makrosiklik diterpenlerdir, özellikle *Taxus* türlerinden elde edilen makrosiklik diterpenlerin bir kısmı alkaloid yapısında olup kuvvetli antitümör etki göstermiştir. Bunlardan taksol Amerika'da kanser tedavisinde klinikte kullanılmakta olup başarılı sonuçlar vermektedir ve bu nedenle yarı sentez yoluyla sentezlenmektedir [68].



Şekil 1.20: Taksol

1.3.1.3.7 Farklı yapıda diterpenler

Genelde çok yaygın olmayan ancak deniz organizmalarında büyük miktarlarda bulunan yapılardır.

1.3.1.4 Sesterpenler

C₂₅ yapısına sahip diterpenlerdir. Bu grubun en önemli üyesi zizanin B ve ophiobolan'dır.

1.3.1.5 Triterpenler

C₃₀ yapısındaki diterpenlerdir. Skualen bu grubun en önemli üyesidir.

1.4 Fenolik Bileşikler

Fenolikler, yaygın olarak kullanılan ismi ile polifenoller, bitkilerin meyve kısımlarına renk veren pigmentlerin doğal olarak oluşmasını sağlayan kimyasal bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, benzen halkasına bir ya da daha fazla hidroksil (-OH) grubunun bağlandığı aromatik bileşiklerdir. Bitkiler, metabolizmalarında kendilerini zararlı etkilere karşı korumada rol aldığı düşünülen çok miktarda çeşitli fenolik bileşikler içermektedir [69].

Bitkilerde çok bulunan fenolik bileşiklerin birçoğunun yapısı tanımlanmıştır [70]. Uzun yıllardır çalışılan fenolik bileşiklerin antiinflamatuar, antiviral, antialerjik, antitrombotik ve antioksidan özellikleri önem taşımaktadır [71-73].

Fenolik bileşikler, yapılarında bulunan fenol halkalarının sayısına ve bu halkaların birbirlerine bağlanma durumlarına göre sınıflandırılırlar [74]. Bu temele dayanarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki grupta incelenirler [75].

1.4.1 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

1.4.1.1 Flavonoid Olmayanlar (Fenolik Asitler)

Fenolik asitler, hidroksibenzoik (C6-C1 fenilmetan yapısına sahip) ve hidroksisinnamik asitler (C6-C3 fenilpropan yapısına sahip) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Hidroksibenzoik asitler bitkisel kaynaklarda çok az miktarda bulunmaktadır. Hidroksisinnamik asitler ise halkaya bağlanan OH grubunun bağlandığı yer ve yapısına göre farklı özellik gösterirler [69, 76-81].

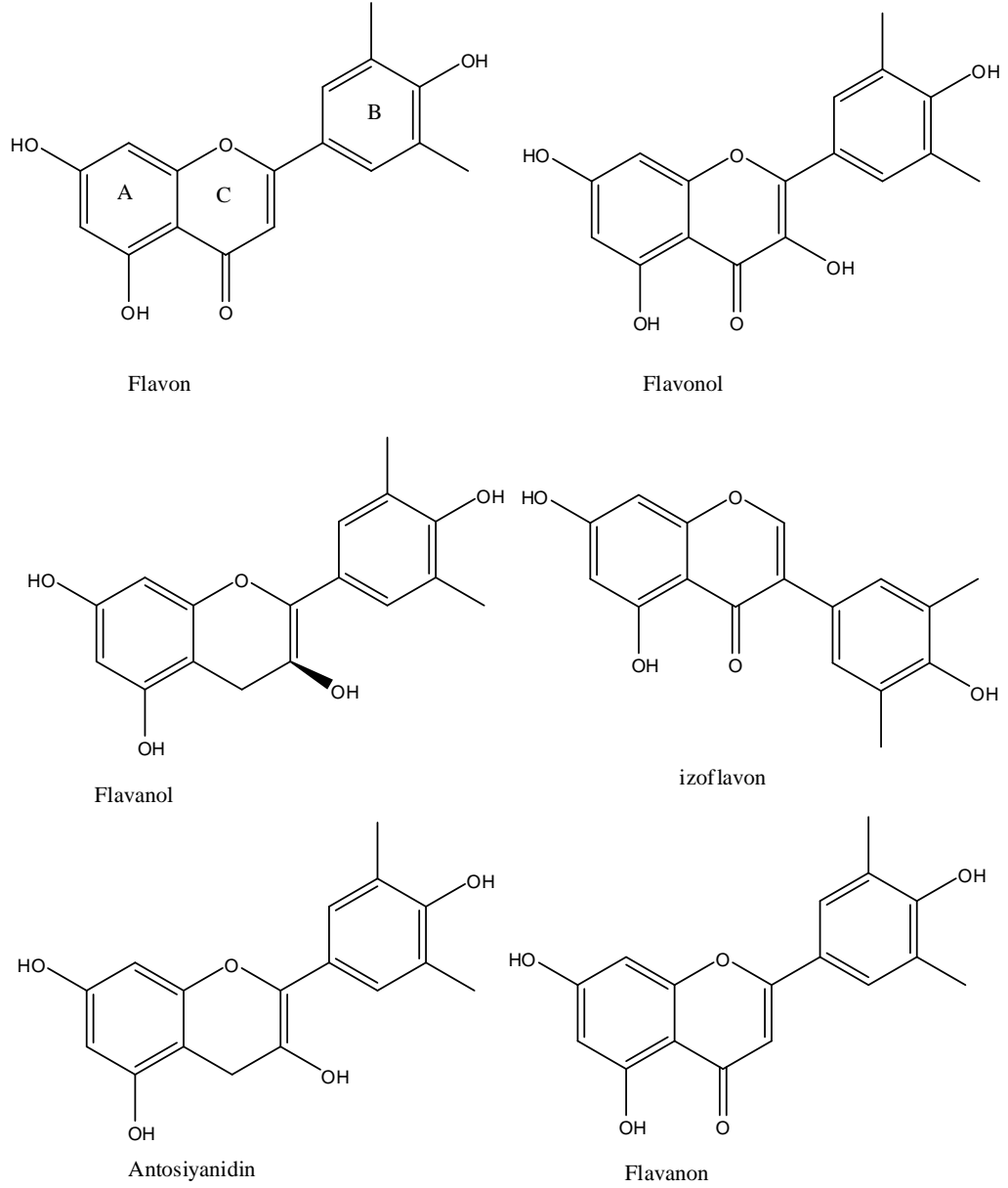
p-OH benzoik asit, prokateşik asit, vanilik asit, gallik asit, salisilik asit, siringik asit ve ellajik asitler hidroksibenzoik; kafeik asit, *o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve *tr*-sinnamik asit hidroksisinnamik asit türevleridir [82-84].

Hidroksi benzoik asitler, yapılarında bulunan hidroksi ve metoksi gruplarının yerleri, pozisyonları ve sayılarına bağlı olarak çeşitlenmektedir. Bu grubun en önemli bileşikleri vanilik asit, gallik asit, resorsilik asit, siringik asit, protokateşik asittir. Hidroksillenmeye ve hidroksil radikallerine yüksek tepki gösteren monohidroksi benzoatlar etkin hidroksil gidericilerdir.

Dihidroksi benzoik asitlerin türevlerinin antioksidan aktiviteleri, hidroksillerin şekline bağlı olarak, orto-, para- durumlarında yüksek aktivitede olurken, meta-, para- durumunda düşük aktivitede olmaktadır [85].

1.4.1.2 Flavonoidler

Önemli derecede antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip olan, düşük molekül ağırlıklı ve en yaygın bitki fenolikleri sınıfına flavonoid denir. 15 karbon atomu içeren ve iki fenil halkası ile propan zincirinin birleşmesinden oluşan flavonoidler, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Yapılarındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı flavonoidlerin kolaylıkla glikozitlenmelerine sebep olur [86]. Flavonoidlerin temel yapı kimyasalları Şekil 1.21'de verilmektedir.



Şekil 1.21: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

Flavonoidler, antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, sitotoksik, mutajenik, antiinflamatuvar, antihipertansif ve özellikle antioksidan etkilerinden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir [87, 88].

Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar;

- 1- Antosiyanidinler
- 2- Flavonlar ve flavonollar
- 3- Flavanonlar
- 4- Kateşinler
- 5- Proantosiyanidinler

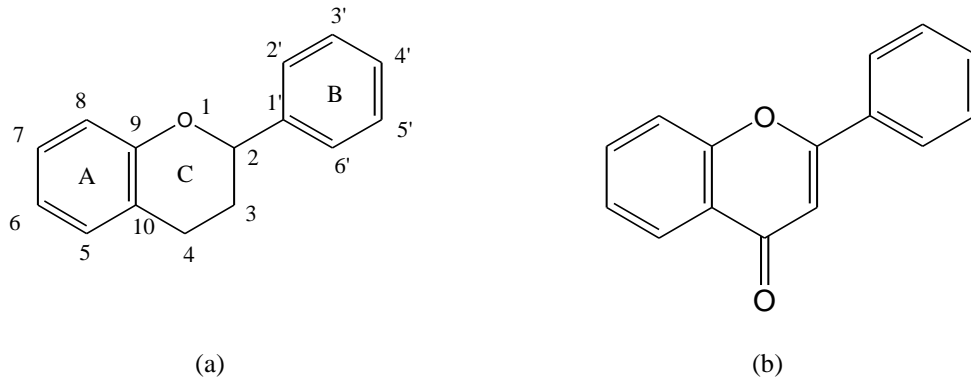
1.4.1.2.1 Antosiyanidinler

Flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla antosiyaninler oluşmaktadır. Aglikonları antosiyanidinlerdir. En önemli antosiyanidinler; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delfinidindir. Kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır [89].

1.4.1.2.2 Flavonlar ve flavonollar

Flavonoidlerin bitkilerde sıkça rastlanan bir sınıfı flavonlardır. Yapıları Şekil 1.22'de verilmiştir. Flavonların karakteristik özellikleri, hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağ olmasından kaynaklanmaktadır. Flavononların 2,3-dehidro türevleri flavonlardır. Bitkilerde hem aglikon (serbest), hem de glikozit yapılarıyla bulunurlar. Yapılan araştırmalarda bitkilerden 300 den fazla flavon aglikon izole edilmiştir.

Flavonların en basitleri, aromatik halkalarında hidroksil ve/veya metoksil bulunduranlardır. Yapılarında sadece OH (hidroksi) veya metoksil grupları bulundurmalarından dolayı bu bileşiklere oksijenli veya O-süstitüye flavonlar da denir. Flavonların O-süstitüye türevleri doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bileşiklerin yapılarında bulunan, hidroksil ve metoksil gruplarının (O-süstitüentlerin) sayısına göre gruplandırılmaktadırlar [90]. Apigenin ve luteolin flavonlara örnek verilebilir.

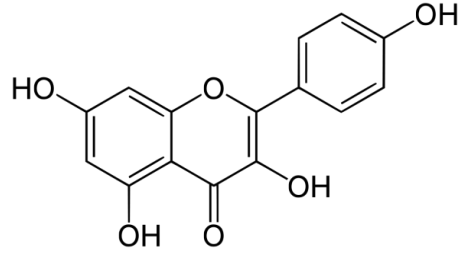


Şekil 1.22: Flavan (a) ve Flavon (b)

Flavonoller, C halkasında yükseltgenmenin en fazla olduğu flavonoid türüdür. Karbonun 3 pozisyonunda OH (hidroksil) grubu içeren flavonollere 3-

hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoidlerin en fazla bitkilerde bulunan ve yapı çeşidi en çok olan sınıfı flavonollerdir.

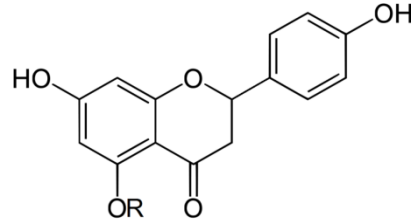
Flavonoller, sarı renkli, kristalsi veya amorf özelliklidir. Bu bileşikler genellikle oksijenli ortamda, flavonlara göre dayanıklılığı azdır. Kaemferol, quercetin ve myricetin flavonollere örnek verilebilir.



Şekil 1.23: Kaemferol

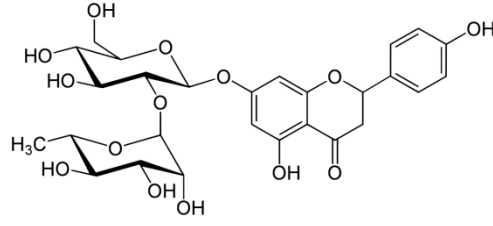
1.4.1.2.3 Flavanonlar

Flavanon yapısı, flavonlardan farklı olarak ortasındaki halkada çifte bağ içermez ve Şekil 1.24’de flavanonun yapısı görülmektedir [91].



Şekil 1.24: Flavanonun yapısı

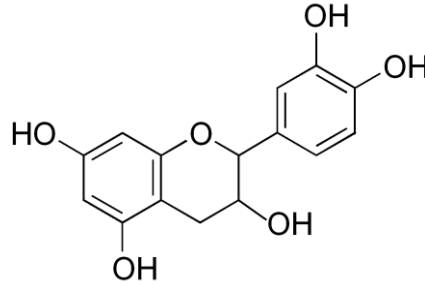
Glikozit formundaki flavanonlar turuncgillerde yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin; greyfurtlarda acı tadı veren naringin bir flavanon glikozittir [91].



Şekil 1.25: Naringin

1.4.1.2.4 Kateşinler

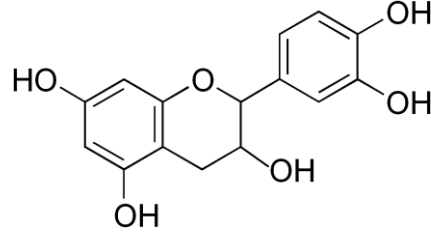
Kateşinler, antioksidan özelliği olan, çay ve bazı meyve-sebzelerde bulunan flavonoid grublarıdır. Yeşil çay kateşinler ve kateşin türevlerini kapsayan flavonoidler bakımından zengindir. Kimyasal yapıları flavan 3-ol'lerdir ve en sık bulunanları, (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin, (-)-epigallokateşindir. Kateşinler, iki asimetrik karbona ve bundan dolayı da dört olası izomere sahiptir; C2 ve C3 atomuna bağlı hidrojenler trans ise (+)-kateşin ve (+)-gallokateşinden, cis ise (-)-epikateşin ve (-)- epigallokateşin olarak bilinmektedir [92].



Şekil 1.26: Epikateşin

1.4.1.2.5 Proantosiyanidinler

Kateşinlerin oluşturduğu polimerik yapılara proantosiyanidinler adı verilir. Sadece epikateşin/kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin/gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin denir [93]. Bitkilerde yaygın olarak bulunan proantosiyanidinlere örnek olarak (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan yapılar verilebilmektedir [93,94].



Şekil 1.27: Kateşin

1.5 Antioksidanlar

Antioksidan maddeler, yükseltgeme engelleyici, yağların oksidasyonunu yavaşlatan ve başka moleküllerin oksidasyonunu engelleyen moleküllerdir.

Antioksidanlar canlılarda, serbest radikal, kimyasal süreçler ve oksitlenmenin oluşmasında etkindir. Elektronların bir atom ya da molekülden ayrılmasını sağlayan kimyasal reaksiyona oksidasyon denir. Serbest radikaller, zincir reaksiyonları oluşturarak, hücrenin hasarına hatta ölümüne neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda antioksidanlar devreye girerek, serbest radikalleri ortadan kaldırırlar ve zincir reaksiyonlarını sonlandırır. Antioksidanlar bunu yapmak için kendilerini okside ederler ve bunu indirgeyici ajanlar olan; tiyoller, askorbik asit ya da polifenoller gibi moleküllerle yaparlar [95].

Antioksidanlar, vücut tarafından üretildiği gibi gıda yoluyla alınabilen kimyasal maddelerdir. Dışarıdan gıda yoluyla alınan en önemli antioksidanlar A, C, E vitaminleri ve selenyum'dur. Bu antioksidanlar vücuda alındıkları zaman serbest radikallerin oluşumunu önlerler. Antioksidanlar serbest radikallerin hücreye zarar vermesini engelleyerek yaşlanmanın olumsuz etkilerini de ortadan kaldırma özelliğe sahiptir.

Antioksidanların en önemli görevi serbest radikallerin neden olacağı tüm hastalıklara karşı vücudu korumaktır. Kalp rahatsızlıkları, diyabet, makula dejenerasyonu, kanser ve bulaşıcı hastalıklara karşı koruyucu önlem sağlarlar. Antioksidan bu hastalıkların tedavi edilmesinde değil, bu hastalıklara yakalanmamak için koruyucu önlem olarak kullanılmalıdır. Serbest radikaller ileri yaşlarda ortaya

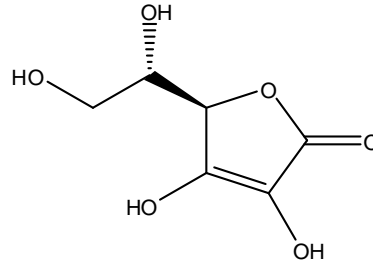
çıkacak hastalıkların daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenden dolayı antioksidanlar yaşlanmayı geciktirici etkiye de sahiptirler [96].

1.5.1 Antioksidanların Sınıflandırılması

1.5.1.1 Doğal Antioksidanlar

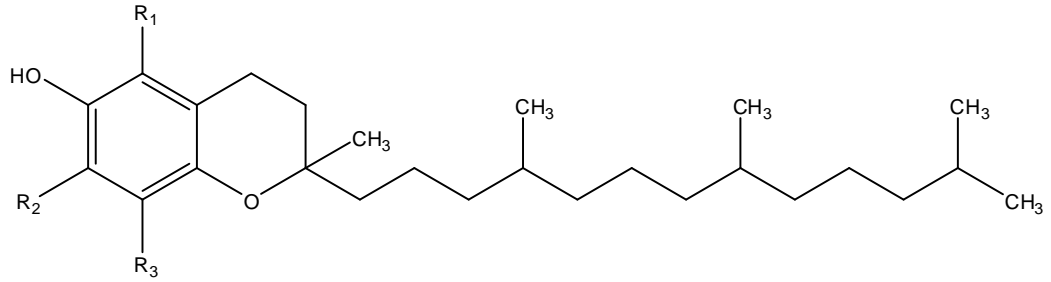
Doğal antioksidanlar bitkiler tarafından doğal olarak üretilmektedir. Vitaminler, fenoller, glutasyonlar, flavonoidler ve karotenoidler doğal antioksidanlara örnek verilebilir. Bu antioksidanlar bitkisel kaynaklı olup serbest radikal engelleyici, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve singlet ve triplet oksijen gidericisi olarak görev yapmaktadır [97].

Doğal antioksidan bileşikleri; sebzelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde bolca bulunmaktadır. Bu yüzden sebze ve meyvetüketiminin bol miktarda olması, hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır [98].



Şekil 1.28: C Vitamini (Askorbik asit)'in yapısı

Askorbik asit (C vitamini) (Şekil 1.28), karotenoidler, tokoferoller (Şekil 1.29) ve skualen en önemli doğal antioksidanlardandır [99]. Domates, ıspanak, brokoli, turunçgillerde, patates gibi meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Askorbik asit çok çabuk okside olduğundan meyve ve sebzeleri pişirirken ve hazırlarken işe yaramaz hale gelmektedir. Bu nedenden dolayı C vitamini içeren meyve ve sebzelerin; hafif pişirilmesi, gerekebiliyorsa çiğ yenmesi ve kesildikten sonra hemen tüketilmesi önerilmektedir [100].



R1	R2	R3	Adı
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -Tokoferol [2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]
CH ₃	H	CH ₃	β -Tokoferol [2,5,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]
H	CH ₃	CH ₃	γ -Tokoferol [2,7,8-trimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]
H	H	CH ₃	δ -Tokoferol [2,8-dimetil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)kroman-6-ol]

Şekil 1.29: E vitamininin kimyasal yapısı

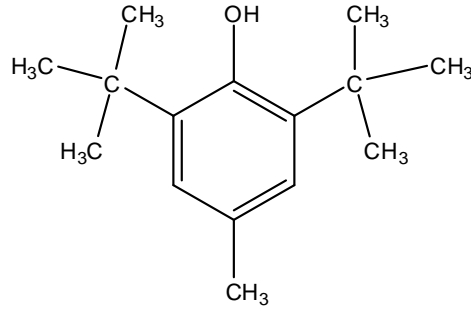
E vitamini (Şekil 1.29), yağda çözünen ve en çok hücre zarında bulunan bir vitamindir. E vitamini aktivitesi gösteren 4'ü tokoferol, 4'ü tokotrienol olmak üzere 8 bileşik vardır. Sağlıklı insanlarda genellikle E vitamini eksikliği görülmemektedir. Eksikliği genellikle yağ absorblama problemi olan uzun süreli rahatsızlıklarda ortaya çıkmaktadır[101].

Doğal antioksidanlar (α -tokoferol ve askorbik asit), sentetik antioksidanlardan (BHT, TBHQ, BHA ve PG) daha düşük aktiviteye sahip olduklarından dolayı besinlerin üretimlerinde ve depolanmasında kullanılmaktadır [102, 103].

1.5.1.2 Sentetik Antioksidanlar

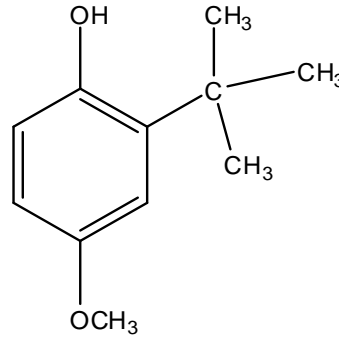
Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT), Butillenmiş Hidroksi Anisol (BHA), Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ), Propil Gallat (PG) ve Troloks sentetik olarak kullanılan antioksidanlardır [104]. Bu antioksidanlar genellikle yaygın olarak kullanılır ve bazı yan etkileri vardır [105, 106]. Ayrıca bazılarının da sağlık açısından tehlikeli oldukları bilinmektedir [105, 107, 108]. Örneğin BHT'nin karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiği yüksek dozda BHT verilen fare deneyleriyle ispatlanmıştır. Sentetik antioksidanlarda BHT fazla alındığında vücuttan atılması zorlaştığından dolayı yağ dokusunda depolanmaktadır [109].

Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) (Şekil 1.30); kauçuk, ilaç ve kozmetik sanayisinde, elektrik trafo yağı, jet yakıtlarında peroksit oluşumunu önlemek, petrol sektöründe ve yakıtlara katkı maddesi olarak kullanılır[110].



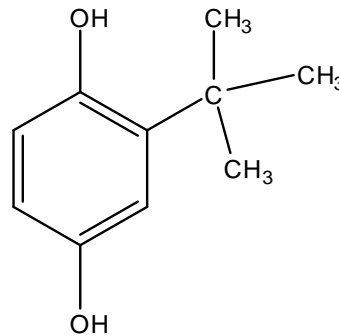
Şekil 1.30: BHT'nin kimyasal yapısı

Butillenmiş Hidroksi Anisol (BHA) (Şekil 1.31), E320 gıda katkı maddesi ve gıda koruyucu olarak kullanılır. Ayrıca gıda paketlenme, hayvan yemi, kauçuk, kozmetik ve petrol ürünleri gibi alanlarda kullanılmıştır [111].



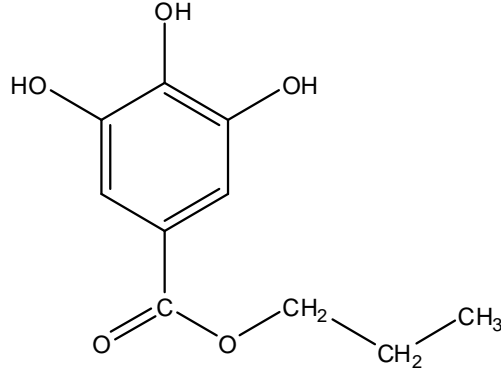
Şekil 1.31: BHA'nin kimyasal yapısı

Tersiyer Butil Hidrokinon (TBHQ) (Şekil 1.32) doymamış bitkisel yağlarda ve hayvansal yağlarda koruyucu olarak ve depolama ömrünü uzatmak için kullanılır. E319 olarak bilinmektedir. Ayrıca biyodizel ünitelerinde korozyon önleyici olarak kullanılmaktadır [112].



Şekil 1.32: TBHQ'nun kimyasal yapısı

(PG) (Şekil 1.33), kozmetik, saç ürünleri, yapıştırıcılar ve yağlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. E310 olarak bilinmektedir [113-115].

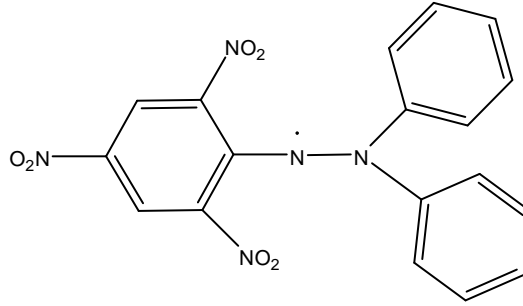


Şekil 1.33: Propil Gallat'ın kimyasal yapısı

1.5.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

1.5.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, kararlı ve uzun ömürlü bir azot radikalidir. Serbest elektronlardan birinin yer değiştirmesi ile koyu menekşe renk oluşmaktadır [116]. 517 nm' de absorbands verir. Reaksiyonun ilerleyişi spektrometre ile izlenmektedir.



Şekil 1.34: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin kimyasal yapısı

DPPH metodunda DPPH• radikalinin koyu mor rengi antioksidan maddeler tarafından indirgenerek açık pembe renge dönüşmektedir. Bu reaksiyon DPPH• radikalinin indirgenerek difenil-pikrilhidrazine dönüştüğünü göstermektedir. Bu metot temelde hidrojen veren gruplara sahip antioksidan maddelerin DPPH• radikalinin indirgenmesine dayanmaktadır. DPPH• molekülü 517 nm'de absorbsiyon verirken, indirgendiği zaman 517 nm'den kayma göstererek antioksidan miktarına bağlı olarak absorbsiyonda düzenli bir azalma göstermektedir. Bir bitki özütünün

IC50 parametre değeri ne kadar düşük olursa, ekstre o derecede güçlü radikal süpürme etkisi gösterir [117].

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalının metanolik çözeltisinin rengi koyu violeedir. Ortama antioksidan içerikli ekstre ilave edildiğinde bu koyu renk açılır. Bu renk açılımı spektrofotometrik olarak 517 nm de absorbansları ölçülerek tespit edilir[118].

DPPH basit, hızlı, doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar veren bir yöntemdir. Analizler için UV-GB spektrometre cihazı kullanılmaktadır. Eğer örnek sayısı fazla olursa 96 kuyucuklu tabaka kullanılmaktadır [119].

1.5.2.2 Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) metodu ile antioksidan aktivite tayini

CUPRAC yöntemi bir numunedeki Cu(II)'nin antioksidanlar tarafından Cu(I)'e indirgenmesidir. Bu yöntemde neokuproin'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans vererek bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır [119].

CUPRAC yönteminin avantajı, 10 dk'lık bir süre gerektiren çok hızlı bir yöntem olmasıdır. Ürik asit, askorbik asit, gallik asit ve kuersetin gibi moleküller için CUPRAC yöntemi birkaç dakikada sonuçlanırken, daha kompleks moleküller için 30-60 dk gerekmektedir [120]. Bu yöntem için kullanılan ayıraçlar ucuzdur ve yöntemin uygulanması için uzmanlık gerekmemektedir.

1.5.2.3 β -Karoten-Linoleik Asit yöntemi

β -Karoten-linoleik asit yönteminde, linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan radikallerin, β -karoten'le reaksiyona girmesiyle oluşan sarı rengin zamanla kaybolması ve bu renk kaybolmasının spektroskopik olarak takip edilmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon bitiminde çözeltide β -karotenin değişen sarı renginin

absorbans miktarı 490 nm’de spektrofotometrede ölçülür. Reaksiyon genellikle 50 °C civarında başlar. Antioksidan tayininde eğer antioksidan var ise rengin açılmadığı gözlenmektedir [121, 122].

β -karoten-lineolik asit yönteminde analiz süresi 3 saat boyunca sarı rengin kaybolmasının önlenmesi, fazla miktarda antioksidan olduğunu göstermektedir. Ortamda antioksidan miktarının fazla olması ya da ortama antioksidan eklenmesi, linoleik asitten oluşan peroksit ürünlerinin bu antioksidanlarla nötralize edilmesi β -karotenin karakteristik sarı renginin korunmasını sağlar. Bu nedenle absorbansın yüksek olması antioksidan aktivitenin de yüksek olduğunu gösterir [121]. Bu yöntemin üstünlüğü; hızlı, basit ve duyarlı bir yöntem olmasıdır [123]. β -karotenin renk açılımı ve bozunma hızı arasında, en düşük β -karoten bozunma hızına sahip ekstrenin, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu [117] şeklinde bir ilişki vardır.

1.5.3 Antikolinesteraz Yöntemi

1.5.3.1 AChE ve BChE Enzimleri

İnsan vücudunda AChE (asetilkolinesteraz) ve BChE (butirilkolinesteraz) olarak iki adet kolinesteraz enzimi bulunmaktadır [124]. Normal yetişkin beyinde AChE enzimi BChE enzimine göre daha çok bulunmaktadır [125]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirilkolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, plazma ve karaciğerde bulunmaktadır [124]. Beyinde kolinesteraz enzim aktivitesinin büyük kısmından AChE enzimi sorumludur. AChE enzimi kolinerjik iletimdeki rolü iyi olarak bilinmekte ancak BChE enzimi ile ilgili bilgi yeterince bulunamamıştır. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE enzimi tarafından yapılmaktadır [124].

Alzheimer hastalığında iki tedavi çeşidi vardır. Bunlar “kolinesteraz inhibitörler” ve “N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir”.

- AChE ve BChE kolinesteraz enzimleri bellek ve düşünce ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolin'in parçalanmasını önlemektedir [126].
- Öğrenme ve bellek fonksiyonları yönünden önemli olan glutat'ı düzenleyen NMDA reseptör antagonistleri vardır [126]. Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ile onaylanmış tek NMDA orta ve ciddi Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan memantindir [127].

Bu çalışma da antikolinesteraz aktiviteleri, Ellman yöntemi kullanılarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı belirlenmiştir.

1.5.3.2 Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemleri

Antikolinesteraz aktivite tayini için geliştirilen analiz yöntemleri aşağıdadır.

- Michel Yöntemi [128]
- Ellman Yöntemi [129]
- De la Huerge Yöntemi [128]

1.5.4 Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal aktivite testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in vitro* etkinliğini tespit etmektedir [130].

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar aşağıda verilmiştir.

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*
- *Mycobacterium smegmatis*

Escherichia coli: Çomak şeklinde, 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1ve 0,5 µm çapında olan gram negatif bir bakteridir. Sporsuz, hareketli ve aerobik bir bakteridir. *E. coli* normal bağırsak florasında bulunur ve burada diğer bakteriler ile denge

halinde olursa hastalık yapmaz. *E. coli* bakterisinin bulaşması sonucunda karın krampları, sürekli ve kanlı ishal, hafif ateş, aşırı yorgunluk, iştahsızlık ve sürekli mide bulantısı olmaktadır [131].

***Staphylococcus aureus*:** Çift, kısa zincirli ve üzüm gibi salkım halinde olan gram pozitif bir bakteridir. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdür. 37 °C’de ve pH 7.4’de ürerler. *S.aureus* bakterisinin bulaşması sonucunda abseler, kan çıbanı (carbuncle), blefarit (göz kapağı iltihabı), hordeolum (arpacık), farenjit, menenjit, sinüzit ve besin zehirlenmesi görülmektedir [131].

***Candida albicans*:** Bir maya mantarı türüdür. *C. albicans* ağızda ve sindirim sisteminde yaşayan canlı organizmalardan biridir. Hem bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla hem de mantarların çoğalmasını sağlayan şartlar oluştuğunda *C.albicans* istilacı ve küf gibi ipliksi biçimine dönüşür [131].

***Mycobacterium smegmatis*:** Aerop, sporsuz ve hareketsiz bakterilerdir. Mico bakterinin en önemli özelliği yavaş üremeleri, aside karşı dirençli olmaları ve hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleridir [131].

Antibiyotik duyarlılık testleri uygulandıkları test prensiplerine göre üç gruba ayrılabilir [132]:

1. Difüzyon Yöntemi: Disk difüzyon-Kirby Bauer metodu

2. Dilüsyon yöntemleri

- Broth (sıvı) dilüsyon yöntemi: Makrodilüsyon ve mikrodilüsyon
- Agar (katı) dilüsyon yöntemi

3. Difüzyon & Dilüsyon Yöntemi: Gradient Metodu

Disk diffüzyon yöntemi, antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde kullanılan basit, pratik ve iyi standardize edilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde belirli miktarlarda antibiyotik damlatılmış kağıt diskler, test edilecek olan bakterinin yoğun bir şekilde yayıldığı katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, yayılan mikroorganizma da çoğalmaya başlar.

Mikroorganizmaların besiyerinde üretilme süresinden sonra antibiyotiğin inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı disklerin etrafında üreme olmaz. Mikroorganizmanın ilaca karşı duyarlılığı diskin etrafındaki inhibisyon zoneyle doğru orantılıdır. Diskin etrafındaki inhibisyon zoneunun çapı ölçülerek, standart zone tablolarına göre değerlendirmeler yapılır. Mikroorganizmanın kullanılan antimikrobiğe karşı duyarlılığı belirlenir [133].

Dilüsyon yöntemleri (sıvı ve agar) ile bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini geciktirmek veya öldürmek için gerekli olan en düşük konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır. "Tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki çeşit dilüsyon testi uygulanmaktadır. Agar dilüsyon yönteminin prensipleri tüpdilüsyon yöntemine benzerdir. Agar dilüsyon yönteminde antibiyotik çözeltileri katıbesiyeri içine konulup, antibiyotik içeren besiyeri petri plaklarına dökülür. Plaklardaki antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarının etkisi bu yöntemle test edilebilmektedir [130,132].

Bu çalışma da antimikrobiyal aktivite deneyleri disk difüzyon deney yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1 Bitkisel Materyal

Origanum L. cinsi *Brevifilamentum* seksiyonuna ait türler Balıkesir Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından toplanıp teşhis edilmiş, birer örnekleri Balıkesir Üniversitesi NEF Botanik Laboratuvarı'na konulmuştur.

2.2 Uçucuyağlar

2.2.1 Clevenger Cihazı ile Hidrodestilasyon

Uçucu yağların eldesi Clevenger cihazı ile hidrodestilasyon yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla 500 mL'lik reaksiyon balonuna her bir bitkiden ayrı olarak 20'şer gram tartıldıktan sonra 250 mL saf su ile geri soğutucu altında 2,5 saat reflux yapılır. Süre sonunda Clevenger aparatının kapiler borusunda biriken uçucu yağ, pipet yardımıyla numune şişesine alınıp diklorometanda çözüldükten sonra analizi GC-MS cihazında yapılmıştır.

2.2.2 GC/MS-MS ile Analiz

Uçucu yağ analizi, Thermo Scientific GC/MS-MS TSQ Quantum XLS cihazı ile yapıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmış olup, akış hızı 1 mL/dk'dır. 1 µL örnek cihaza enjekte edilir. GC sıcaklık program değişimi şu şekildedir; 50 °C' de 5 dk, 5 °C/dk hızla 250 °C' de 5 dk bekleme. MS transfer hat sıcaklığı 230 °C, kütle aralığı 50 - 650 *m/z*'dir. Analizler için DB-5, 30 m, 0.25mm ID, 0.25 µm kolonu kullanılmıştır.

2.3 Fenolik Bileşenlerin Analizi

2.3.1 Ekstrelerin hazırlanması

Küçük parçalar haline getirilen bitki türleri yaklaşık 3 g ağırlığında tartılarak farklı amber şişelere konuldu, 100 mL metanol çözücüsü ile bir hafta süre ile masere edildi. Çözücüsü renklenen bitki örnekleri süzülerek çözücüsü uçuruldu. Ayrı bir şişede tartılan 3 g bitki örneği apolar çözücüden polar çözücüye doğru ekstre hazırlamak için tüketildi. Önce kloroform ile tüketilerek C ekstresi elde edildi. Kalan bitki 1 gün kurutulup aynı işlemler sırasıyla Ac ve MeOH içinde yapılarak ekstreler elde edildi. Çözücüler rotaevaporda uçurulduktan sonra metanol-1, kloroform, aseton ve metanol-2 ekstreleri elde edildi.

Hazırlanan ekstreler ile fenolik analizi, antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite analizleri yapılmıştır.

Bitki ekstrelerinden metanol çözücüsü içerisinde 20.000 ppm stok çözeltiler hazırlandı. LC-MS/MS cihazında analiz edilmek üzere 4000 ppm'e metanol ile seyreltildi. Analiz için vial hazırlanan iç standart (etanol içinde hazırlanmış 100 ppm kurkumin) eklendikten sonra LC-MS/MS cihazına enjekte edilerek analizleri yapılmıştır.

2.3.2 Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Fenolik bileşiklerinin ana stok çözeltisi 100 ppm olarak MeOH' de hazırlandı. 100 ppm lik stok çözeltiden 10 ppm ara stok çözeltisi hazırlandı. Ara stoktan farklı derişimlerde (5-2,5-1-0,5-0,25 ve 0,1 ppm) arasında farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanarak +4 °C de bekletildi. LC-MS/MS'de analiz edildi.

2.3.3 Enstrümental Analiz ve Kromatografik Koşullar

Analizlerde Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole kütle spektrometresi kullanılmıştır. Kromatografi kolonu olarak, Synergy Max C18 kolon (250 x 2 mm i.d, 5 µm partikül büyüklüğü) kullanıldı. Hareketli faz olarak içerisinde %0,05 formik asit bulunan distile su (A) ve MeOH (B) kullanıldı. Pompa programı dakikada 0,25 mL akış hızında olup, akış gradienti 0.00-1.00 dakikalarda %55 A ve %45B, 1.00-20.00 dakikalarda %100 B, 20.01-23.00 dakikalarda %55 A ve %40 B olacak şekilde ayarlandı. Kolon sıcaklığı 30 °C ve injeksiyon hacmi 10 µL'dir.

2.3.4 LC-MS/MS Prosedürü

Bitkinin analizlerinde Zivak Tandem Gold Triple Quadrupole kütle spektrometresi cihazı kullanılmıştır. CID gaz basıncı 2.0 mTorr, 4000 V ESI iğne voltajı, 600V sprey koruma voltajı, 300 °C kurutma gaz sıcaklığı, 55 psi nebulizer gaz basıncı ve 35 psi kurutma gaz basıncı olmak üzere optimum ESI parametreleri kullanıldı. Standart bileşiklerin LC-MS/MS karakteristikleri belirlenerek ölçüm metodu oluşturuldu. Seçilen bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1: Seçilen bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri.

Bileşikler	Ana iyon	Parçalanma iyonu	Çarpışma enerjisi (V)
1 Gallik asit	168,6	124	13
2 Kaemferol	287	152,3	30
3 Salvigenin	329	295,8	15
4 Eubotriol	343	343	13
5 Penduletin	345,2	311	25
6 Kuersitrin	471,9	309,9	16
7 Fumarik asit	115	71	8
8 Pirogallol	125	80	16
9 Salisilik asit	136,7	92,5	10
10 p-OH benzoik asit	136,7	92,6	12
11 vanilin	150,7	135,4	12
12 P-koumarik asit	163,2	118,7	14
13 Kafeik asit	179	135	10
14 t-ferulik asit	193	133	15
15 Şirinjik asit	196,7	181,4	12
16 İzoramnetin	315	300	15
17 Kuersetagetin-3,6-dimetileter	345,1	329,5	16
18 Klorojenik asit	353	191	14
19 Rozmarinik asit	359,2	160,5	15
20 Luteolin-7-glukozit	447	284,5	14
21 Luteolin-5-glukozit	447	289,5	20
22 Ursolik asit	455,6	455,1	10
23 İzokuersetin	463,3	300	25
24 7-asetil sideroksol	385,4	325	16
25 Linearol	385	385	30
26 1-okso-salvibretol	313	295	14
27 Rutin	609	301	16
28 Liriodendrin	766	603	35
29 Siderol	369	309	18
30 Pelorganin klorit	595	271	30
31 Palargonin	271,2	121	34
32 Apigenin	269	151	22
33 Saponarin	595	415	18
34 Kurkumin*	369,3	176,9	20

* Kullanılan iç standart

2.4 Antioksidan Aktivite Analizi

2.4.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözüldü.

Örnek çözeltileri farklı konsantrasyonlarda (10 µg ve 100 µg arasında) hazırlandı. 1 mL numuneye 4 mL DPPH çözeltisinden eklendi. 1 mL BHA (kontrol çözeltisi) çözeltisi eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyondan yapıldı. 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$DPPH\ Giderim\ Aktivitesi(\% \text{ inhibisyon}) = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100$$

$A_{kontrol}$ =Kontrolün absorbansı

$A_{örnek}$ =Örneğin absorbansı

DPPH’in renginin açılması absorpsiyonun azaldığını gösterir. Reaksiyon karışımının absorpsiyonunun düşük olması serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu gösterir.

2.4.2 CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayini

7.5×10^{-3} M Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 156.2 mg neokuproin tartılır. 100 ml ye EtOH ile tamamlanır.

Amonyum Asetat çözeltisinin hazırlanması: 19.27 g amonyum asetat tartılır. 250 ml ye saf su ile tamamlanır.

10^{-2} M Bakır-II-klorür çözeltisinin hazırlanması: 426.2 mg bakır-II-klorür tartılır. 250 ml ye saf su ile tamamlanır.

Örnek çözeltileri:(10^{-3} M olarak hazırlanacaktır.)

Bir cam tüp içerisine bakır (II) çözeltisi (10^{-2} M), neokuproin çözeltisi (7.5×10^{-3} M) ve amonyum asetat tamponundan (pH=7) sırasıyla 1'er ml eklenir. Üzerine (a) mL örnek çözeltisi ve (1-a) ml H₂O ilave edilip iyice çalkalanır (toplam hacim 4.1 ml). Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 1/2 saat boyunca bekletilir. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan çözeltiliye karşı 450 nm'de soğurum (absorbans) değerleri ölçülür.

Bu yöntemle öncelikle, çalışılan saf bileşiğin ölçümleme/ ölçülüleme (kalibrasyon) eğrisini çizilir. Bu maddenin, doğrusal (lineer) olduğu aralık tespit edilerek ölçülüleme eğrisinden, molar soğurum (absorplama) katsayısını (ϵ) bulunur. Daha sonra ilgili maddenin molar soğurum katsayısını troloksun (tralox) molar soğurum katsayısına bölerek maddenin TEAC_{CUPRAC} değeri hesaplanır.

2.4.3 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi)

β -Karoten çözeltisinin (0,1 mM) hazırlanması: 0,2 mg β -karoten tartılarak 1 mL kloroform içerisinde çözüldü. Sonrasında 200 mg Tween 40 ve 20 μ g linoleik asit eklendi. Rotaevaporatör yardımıyla kloroform uçuruldu. Daha sonra, çözelti 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş saf su ilave edilerek karıştırıldı.

Örnek çözeltileri ve pozitif kontrol olarak hazırlanan α -Toc, BHT, kersetin çözeltileri üzerine, son konsantrasyonları 10, 25, 50 ve 100 μ g/mL olacak şekilde, 4 mL β -karoten çözeltisi ilave edildi ve bekletilmeden spektrofotometre ile başlangıç absorbans değerleri 490 nm'de ölçüldü. Ölçüm sırasında kontrol örneği olarak alkol kullanıldı. Daha sonra, kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karoten'in rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) hazırlanan tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı. Çözeltilerin absorbans değerleri tekrar 490 nm'de ölçüldü. β -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

ln: doğal logaritma, *a*: başlangıç absorbansı, *b*: inkübasyondan sonraki absorbans, *t*: inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\% \text{ inhibisyon}) = (R_{kontrol} - R_{örnek}) / R_{kontrol} \times 100$$

$R_{kontrol}$: Kontrolün renginin açılma hızı

$R_{örnek}$: Örneğin renginin açılma hızı

2.4.4 Antikolinesteraz aktivite tayini

0,1 M $H_2PO_4^-$ Çözeltisinin Hazırlanması: 1,56 g NaH_2PO_4 tartıldı. 100 mL saf suda çözüldü.

0,1M HPO_4^{2-} Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g NaH_2PO_4 tartıldı. 200 mL saf suda çözüldü.

0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 94,7 mL HPO_4^- ve 5,3 mL $H_2PO_4^{2-}$ çözeltilerinden alındı. 100 mL saf su eklendi.

0,1 M pH=7 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 3,9 mL $H_2PO_4^-$ ve 6,1 mL HPO_4^{2-} çözeltilerinden alındı. 10 mL saf su eklendi.

DTNB Çözeltisinin Hazırlanması: 16 mg DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) tartılıp 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldü. 7,5 mg $NaHCO_3$ tartılıp 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldü. Sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Deney aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

AcI: 32,8 mg AcI (Asetilkolin iyodür) tartıldı. 8 mL saf su eklendi. Deney aşamasında 8 mL pH=8 tampon çözeltisi ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

BuI: 4 mg BuI (Bütirilkolinyodür) tartıldı. 8 mL saf su eklendi. Deney aşamasında 8 mL pH=8 tampon çözeltisi ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

AChE Enzimleri: 1,17 mg AChE enzimi tartıldı. 5 mL pH=8 tampon çözeltisi eklenerek çözüldü. Çözelti 5'e ayrıldı. Her birinin konsantrasyonu 0,235

mg/mL olan beş çözelti elde edildi. 8 mL saf su eklenerek 0,02925 mg enzim içeren 125 µL'lik enzim çözeltileri elde edildi. Hazırlanan çözeltilere 460 µL pH:8 tampon çözeltisi eklendi. Toplam hacmi 585 µL çözelti 25µL'lik 23 adet şişeye doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya konuldu. Stok çözeltiler kullanılmadan önce tampon çözeltisi (pH:8) ile 3mL'ye tamamlandı.

BChE Enzimleri: 1 mg BChE enzimi tartıldı. 5 mL tampon çözeltisi (pH=8) eklenerek çözüldü. Hazırlanan çözeltiden küçük şişelere 300 µL doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuya konuldu. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 µL tampon çözeltisi (pH=8) ilave edildi.

2.4.4.1 AChE aktivite testi

Fosfat tamponu (pH=8) hazırlanarak 130 µL mikroplakadaki kuyucuklara, bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden her bir kuyucuğa 20 µL konulur. Bu solüsyon 25°C de 10 dakika inkübe edilir. Bu süre sonunda 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) 20 µL ilave edilir. *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin standart olarak kullanılır. Daha sonra mikroplaka 412 nm dalga boyunda ELISA okuyucuya yerleştirilerek absorbans okunur. Vmax değerlerinin hesaplanması için kullanılan program (Softmax Pro Default Protocol) yardımıyla absorbans değerleri hesaplanır. Bu şekilde aktivite gösteren bileşikler tespit edilmiş olur. Daha sonra aktivite gösteren bileşiklerin solüsyonları, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilerek IC50 değerleri ölçüm işlemleri aynı şekilde yapılarak hesaplanır.

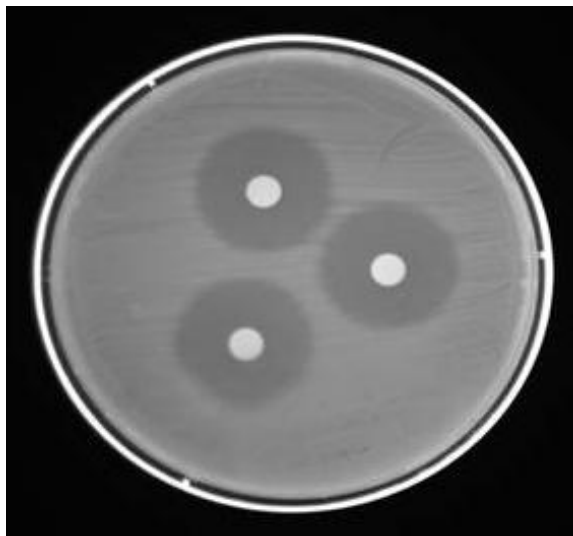
2.4.4.2 BChE aktivite testi

Fosfat tamponu (pH=8) hazırlanarak 130 µL mikroplakadaki kuyucuklara, bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve Bütirikolinesteraz (BChE) enzim çözeltisinden 20 µL konulur. Bu solüsyon 25°C de 10 dakika inkübe edilir. Bu süre sonunda 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL BuI

(bütirilkolinyodür) substrat olarak her bir kuyucuğa eklenir. *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkolooid tipi ilaç olan Galantamin standart olarak kullanılır. Daha sonra mikroplaka 412 nm dalga boyunda ELISA okuyucuya yerleştirilerek absorbans okunur. Vmax değerlerinin hesaplanması için kullanılan program (Softmax Pro Default Protocol) yardımıyla absorbans değerleri hesaplanır. Daha sonra aktivite gösteren bileşiklerin solüsyonları, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilerek IC50 değerleri ölçüm işlemleri aynı şekilde yapılarak hesaplanır.

2.5 Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemlerinden biri olan disk difüzyon yöntemi için Whatmann No:1 kağıdından 6 mm boyutunda hazırlanan diskleri steril edildi. 24 saat inkübasyona bırakılan test mikroorganizmaları 0.5 McFarland standardına göre hücre sayısı $1,5 \times 10^8$ CFU/mL olacak şekilde ayarlandı ve 100 µL alınarak petrilere yayma ekim yapıldı. Boş disklere 10 µL ekstre emdirildi ve petride belli noktalara yerleştirildi. Negatif kontrol olarak %100 DMSO kullanıldı. Pozitif kontrol olarak Ampisilin, Kloramfenikol ve Ofloksasin antibiyotik diskleri kullanıldı. 2 saat +4 °C'de emilimin sağlanması için bekletilen petrilere ardından 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Petrilere meydana gelen inhibisyon zon çapları ölçülerek ekstraların antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi.



Şekil 2.1: İnhibisyon zon çapları

3. BULGULAR

3.1 *Origanum* cinsi *Brevifilamentum* Seksiyonu Bitkilerinden Elde Edilen Uçucu Yağ Analiz Sonuçları

Origanum cinsi *Brevifilamentum* seksiyonu türlerinden elde edilen yağların analizi sonucu toplam 74 kimyasal bileşen elde edilmiş olup bunlar OA için %98.8, OB için %99.8, OH için %94.1, OHB için %99.8, OL için %99.0 ve OR için %99.2' sini oluşturmaktadır. Bileşenler kimyasal yapılarına göre 6 sınıfa ayrılmıştır: hidrokarbonlar ve türevleri, monoterpen hidrokarbonlar, oksijenli monoterpenler, seskiterpen hidrokarbonlar, oksijenli seskiterpenler ve fenolik bileşikler (Tablo 3.1) dir.

Tablo 3.1: Uçucu yağ GC-MS analiz sonuçları.

Bileşen	KI	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Hidrokarbonlar ve türevleri							
3-metil-nonan	971	-	-	-	-	t	-
1-okten-3-ol	979	-	0.4	-	-	0.6	-
3-oktanol	991	-	0.4	-	-	0.2	-
2-metil-dekan	1063	-	1.0	-	-	-	-
undekan	1100	-	0.3	-	-	0.2	-
menth-3-en-8-ol	1150	-	-	-	22.6	-	-
geranil butirat	1564	-	-	4.5	-	-	-
% Tespit		-	2.1	4.5	22.6	1.0	-
Monoterpen hidrokarbonlar							
α -tujen	930	-	-	-	t	-	-
α -pinen	939	-	-	-	0.3	t	-
kamfen	954	-	-	-	0.6	0.2	-
sabinen	975	-	-	-	0.1	-	-
β -pinen	979	0.9	-	-	0.1	0.1	-
2-karen	1002	1.3	-	0.9	-	-	-
α -fellandren	1003	-	-	-	0.1	-	-
terpinen	1017	-	-	-	0.6	0.1	-
<i>p</i> -simen	1025	-	1.3	-	3.0	17.1	-
limonen	1029	0.3	-	-	-	0.1	-
β -fellandren	1030	-	-	-	0.2	-	-
(<i>Z</i>)- β -osimen	1037	-	-	-	-	t	-
τ -terpinen	1048	3.4	-	1.9	-	-	-
(<i>E</i>)- β -osimen	1050	-	-	-	3.8	-	-
γ -terpinen	1060	1.4	-	-	0.6	3.7	-
<i>m</i>-simen	1085	39.2	-	0.6	-	-	-
% Tespit		46.5	1.3	3.4	9.4	21.3	-
Oksijenli monoterpenler							
ökaliptol	1031	1.9	-	2.1	-	t	-
<i>cis</i> -sabinen hidrat	1070	-	-	-	1.6	-	-
α -terpinolen	1089	0.5	-	-	-	0.5	-
<i>trans</i> -sabinen hidrat	1098	-	-	-	0.4	-	-
pinen hidrat	1123	-	-	-	1.0	-	-
limonen oksit	1137	0.1	-	-	-	-	15.3
<i>trans</i> -pinokarveol	1139	0.4	-	-	-	-	-
<i>cis</i>-β-terpineol	1144	0.3	-	-	24.3	-	-
kamfor	1146	-	0.1	-	-	0.8	-
menton	1153	-	-	-	13.1	-	-
<i>trans</i> - β -terpineol	1163	-	-	-	0.3	-	-
borneol	1169	-	7.1	-	-	16.0	-
4-terpineol	1177	-	0.5	-	-	1.3	-
<i>p</i> -simen-8-ol	1180	-	-	-	1.4	-	-
α -terpineol	1189	-	3.4	-	-	5.5	-
dihidrokarvon	1190	0.4	-	1.9	-	-	-

Tablo3.1: (devam ediyor).

mirtenol	1196	-	0.2	-	0.3	0.3	-
linalil format	1216	4.6	-	-	-	-	-
karveol-cis	1229	-	-	-	0.8	-	-
karvon	1243	-	9.1	-	-	-	-
karvakrol metil eter	1245	-	-	-	0.6	-	-
linalil asetat	1257	1.2	-	-	-	-	-
<i>p</i> -simen-7-ol	1287	-	-	-	-	2.3	-
bornil asetat	1289	-	-	-	-	1.6	-
karvakrol etil eter	1298	-	-	-	0.8	-	-
izopulegil asetat	1335	-	-	-	-	-	19.8
karvakril asetat	1367	0.2	-	-	-	-	-
% Tespit		9.6	20.4	4.0	44.6	28.3	35.1
Seskiterpen hidrokarbonlar							
α -kopaen	1377	-	-	-	1.2	-	-
β -borbonen	1388	-	-	-	2.4	1.7	-
(<i>Z</i>)-karyofilen	1409	-	1.6	-	-	5.1	-
aromadendren	1437	11.8	-	23.7	8.4	-	15.7
α -himakalen	1451	0.2	-	12.0	-	-	-
α -humulen	1455	-	-	-	2.3	-	-
(<i>E</i>)- β -farnesen	1457	-	-	-	2.9	-	-
<i>allo</i> -aromadendren	1458	24.8	-	15.2	0.5	-	5.0
germakren-D	1485	-	0.3	-	0.6	6.6	-
τ-muurolen	1480	-	0.6	-	-	20.1	-
γ -kadinen	1514	0.3	-	-	-	0.9	-
α -kadinen	1539	0.5	0.1	-	-	0.4	-
% Tespit		37.6	2.6	50.9	18.3	34.8	20.7
Oksijenli seskiterpenler							
bizabolen epoksit	1504	-	-	3.3	-	-	5.6
spatulenol	1572	-	0.8	-	1.6	8.5	-
karyofilen oksit	1583	-	0.6	4.2	-	4.0	-
viridiflorol	1593	-	-	-	-	0.4	10.0
α-kadinol	1660	1.1	-	7.6	-	0.7	27.8
% Tespit		1.1	1.4	15.1	1.6	13.6	43.4
Fenolik bileşen							
Timol	1290	1.2	-	-	t	-	-
Karvakrol	1299	2.8	72.1	16.2	3.3	-	-
% Tespit		4.0	72.1	16.2	3.3	-	-
Toplam (%)		98.8	99.8	94.1	99.8	99.0	99.2

3.2 *Origanum* cinsi *Brevifilamentum* Seksiyonunun Fenolik Bileşenlerinin Analizi

Gölgede kurutulmuş toz haline getirilen bitkinin metanol-1 (M1), kloroform (C), aseton (Ac) ve metanol-2 (M2) ile ekstre edilmesiyle hazırlanan ekstraların fenolik bileşenleri ve miktarları LC-MS/MS tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşikler üç grupta analiz edilmiştir. (I) flavonoidler ve türevleri, (II) kumarik asit ve türevleri ve (III) basit fenolikler ve diğerleri. Ekstrelerin fenolik bileşenlerinin sonuçları Tablo 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Metanol-1 ekstresinin fenolik bileşenleri.

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Flavonoidler ve türevleri						
Kaemferol	21024.29±1483.89	262.88±18.55	167.2±11.8	20.74±1.46	63.09±4.45	217.11±15.32
Kaemferol-3-rutinosit	130.74±11.82	-	2.83±0.26	-	-	0.23±0.02
Salvigenin	204.12±13.89	-	0.47±0.03	-	-	106.44±7.24
Penduletin	1339.08±135.75	10.42±1.06	46.2±4.68	-	6.61±0.67	0.17±0.02
İzoramnetin	-	-	-	-	-	10.44±0.92
Kuersetin	7.18±0.95	4.56±0.61	-	-	-	-
Kuersetagetin-3,6-dimetileter	-	4.02±0.75	355.18±66.5	-	-	156.31±29.27
Izokuersetin	621.16±178.23	0.67±0.19	6.53±1.87	-	-	-
Kuersitrin	-	-	-	-	-	-
Luteolin	8858.06±2275.32	62.28±16	56.27±14.45	-	6.47±1.66	83.83±21.53
Luteolin-7-O-Glukozit	2177.97±221.64	10.27±1.04	14.17±1.44	-	-	17.84±1.82
Luteolin-5-O-Glukozit	1707.99±109.89	-	35.59±2.29	-	-	0.31±0.02
Apigenin	5164.75±416.06	-	68.4±5.51	-	-	-
Rutin	1569.63±102.81	15.53±1.02	31.29±2.05	1.55±0.1	2.78±0.18	78.41±5.14

Tablo 3.2:(devam ediyor).

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Koumarik Asitler ve Türevleri						
<i>p</i>-Koumarik asit	709.28±109.19	-	-	-	-	2.40±0.37
Kafeik asit	6126.98±1212.46	174.78±34.59	190.06±37.61	45.86±9.08	44.69±8.84	191.50±37.9
(<i>E</i>)-Ferulik asit	12150.65±849.07	134.55±9.4	353.19±24.68	96.42±6.74	57.56±4.02	134.96±9.43
Klorojenik asit	-	11.13±1.54	-	10.45±1.45	11.55±1.6	11.81±1.64
Rozmarinik asit	102800±7882.62	-	2092.79±160.47	27.47±2.11	1556.15±119.32	3520.48±269.95
Temel Fenolikler ve diğerleri						
Fumarik asit	24053.6±1668.09	369.43±25.62	165.59±11.48	37.07±2.57	126.31±8.76	1827.03±126.7
Gallik asit	-	7.00±0.49	-	7.99±0.55	5.85±0.41	-
Pirogallol	657.8±43.77	50.02±3.33	15.1±1.01	27.51±1.83	-	32.97±2.19
Ellagik asit	-	-	-	-	-	-
Vanilin	-	-	-	-	-	-
Siringik asit	746.23±50.25	47.39±3.19	12.52±0.84	-	-	-
Salisilik asit	990.02±399.68	-	67.05±27.07	-	-	18.30±7.39
<i>p</i>-OH benzoik asit	-	-	-	-	-	-
Toplam	191039.53	1164.93	3680.43	275.06	1881.06	6410.54
(mg/kg kuru bitki)						

Tablo 3.3: Metanol-2 ekstresinin fenolik bileşenleri.

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Flavonoidler ve türevleri						
Kaemferol	253.07±17.86	-	162300±11455.09	-	177.01±12.49	57.88±4.09
Kaemferol-3-rutinosit	-	-	12174.51±1100.24	-	-	-
Salvigenin	-	-	648.93±44.16	-	-	-
Penduletin	-	-	4366.06±442.62	-	-	-
İzoramnetin	-	-	592.15±52.26	-	-	-
Kuersetin	-	-	2104.05±279.72	-	-	-
Kuersetageetin-3,6-dimetileter	24.05±4.50	-	76700±14360.91	-	-	0.52±0.1
Izokuersetin	6.69±1.92	-	5749.28±1649.65	-	-	-
Kuersitrin	31.58±2.01	-	-	-	-	-
Luteolin	95.9±24.63	-	79350±20382.18	430.84±110.7	36.85±9.46	16.00±4.11
Luteolin-7-O-Glukozit	50.18±5.11	-	30083.67±3061.44	207.93±21.16	6.64±0.68	2.48±0.25
Luteolin-5-O-Glukozit	22.29±1.43	-	58400±3757.47	-	-	-
Apigenin	23.72±1.91	-	33201.13±2674.60	-	-	-
Rutin	26.6±1.74	-	14892.73±975.44	-	6.54±0.43	4.16±0.27

Tablo 3.3: (devam ediyor).

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Koumarik Asitler ve Türevleri						
<i>p</i>-Koumarik asit	-	323.90±64.1	4931.1±759.08	-	-	-
Kafeik asit	119.58±23.66	-	190450±37687.79	154.49±30.57	125.75±24.89	118.46±23.4
(<i>E</i>)-Ferulik asit	422.47±29.52	-	399000±27881.52	-	123.61±8.64	92.74±6.48
Klorojenik asit	37.49±5.19	123.21±17.06	11027.18±1527.00	52.2±7.23	9.68±1.34	22.06±3.05
Rozmarinik asit	2494.15±191.25	-	-	-	2105.32±161.43	2634.67±22.02
Temel Fenolikler ve diğerleri						
Fumarik asit	538.13±37.32	-	117500±8148.5	-	290.83±20.17	1031.18±71.51
Gallik asit	-	487.27±33.79	-	333.56±23.13	6.24±0.43	-
Pirogallol	21.06±1.40	-	24833.91±1652.56	-	22.03±1.47	26.03±1.73
Ellagik asit	-	-	-	-	-	-
Vanilin	-	-	-	-	-	-
Siringik asit	10.9±0.73	-	19628.58±1321.70	-	9.58±0.65	-
Salisilik asit	21.43±8.65	-	106550±43015.10	-	-	48.75±19.68
<i>p</i>-OH benzoik asit	135.99±10.80	-	32429.73±2576.46	-	-	151.56±12.04
Toplam (mg/kg kuru bitki)	4335.28	934.38	1386912.28	1179.02	2920.08	4206.49

Tablo 3.4: Kloroform ekstresinin fenolik bileşenleri.

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Flavonoidler ve türevleri						
Kaemferol	-	-	18.42±1.3	-	-	-
Kaemferol-3-rutinosit	-	-	-	-	-	-
Salvigenin	4.41±0.3	12.06±0.82	-	18.16±1.24	11.06±0.75	69.84±4.75
Penduletin	20.56±2.08	4.80±0.49	14.6±1.48	9.43±0.96	81.83±8.3	93.35±9.46
İzoramnetin	-	-	-	-	-	-
Kuersetin	-	-	-	-	-	-
Kuersetagetin-3,6-dimetileter	38.82±7.27	-	133.11±24.92	-	-	87.42±16.37
Izokuersetin	-	-	-	-	-	-
Kuersitrin	-	-	-	-	-	-
Luteolin	-	-	-	-	-	-
Luteolin-7-O-Glukozit	-	-	-	-	-	-
Luteolin-5-O-Glukozit	-	-	-	-	-	-
Apigenin	-	-	9.64±0.78	-	-	-
Rutin	-	-	-	-	-	-

Tablo 3.4: (devam ediyor).

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Koumarik Asitler ve Türevleri						
<i>p</i> -Koumarik asit	-	7.91±1.56	-	-	-	-
Kafeik asit	-	-	-	6.24±1.23	12.05±2.38	-
(<i>E</i>)-Ferulik asit	-	-	-	-	-	-
Klorojenik asit	-	6.83±0.95	-	10.18±1.41	7.8±1.08	-
Rozmarinik asit	-	3.37±0.26	-	3.53±0.27	3.63±0.28	-
Temel Fenolikler ve diğerleri						
Fumarik asit	-	-	-	-	-	-
Gallik asit	-	-	-	-	-	-
Pirogallol	-	-	-	-	-	-
Ellagik asit	-	-	-	-	-	-
Vanilin	-	-	-	4.7±0.43	6.33±0.58	-
Siringik asit	-	-	-	-	-	-
Salisilik asit	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -OH benzoik asit	-	-	-	4.15±0.33	5.49±0.44	-
Toplam						
(mg/kg kuru bitki)	63.79	34.97	175.77	56.39	128.19	250.61

Tablo 3.5: Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri.

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Flavonoidler ve türevleri						
Kaemferol	349.4±24.66	1149.62±81.14	85.38±6.03	170.9±12.06	577.63±40.77	65.64±4.63
Kaemferol-3-rutinosit	3.83±0.35	27.32±2.47	-	-	2.49±0.23	-
Salvigenin	-	-	-	10.24±0.7	-	16.08±1.09
Penduletin	4.17±0.42	44.86±4.55	18.8±1.91	12.26±1.24	54.7±5.55	43.55±4.41
İzoramnatin	-	71.15±6.28	-	5.5±0.49	-	-
Kuersetin	3.48 ±0.46	79.15±10.52	-	3.03±0.4	7.9±1.05	-
Kuersetağetin-3,6-dimetileter	10.25±1.92	31.16±5.83	179.49±33.61	-	-	45.53±8.53
Izokuersetin	-	-	-	-	-	-
Kuersitrin	-	-	-	-	-	-
Luteolin	134.77±34.62	329.99±84.76	22.36±5.74	58.34±14.99	129.97±33.38	10.51±2.70
Luteolin-7-O-Glukozit	4.71±0.48	31.71±3.23	-	-	-	-
Luteolin-5-O-Glukozit	-	8.84±0.57	-	-	-	-
Apigenin	67.05±5.40	-	32.56±2.62	-	-	21.19±1.71
Rutin	4.93±0.32	9.24±0.61	16.18±1.06	8.21±0.54	1.59±0.1	1.45±0.09

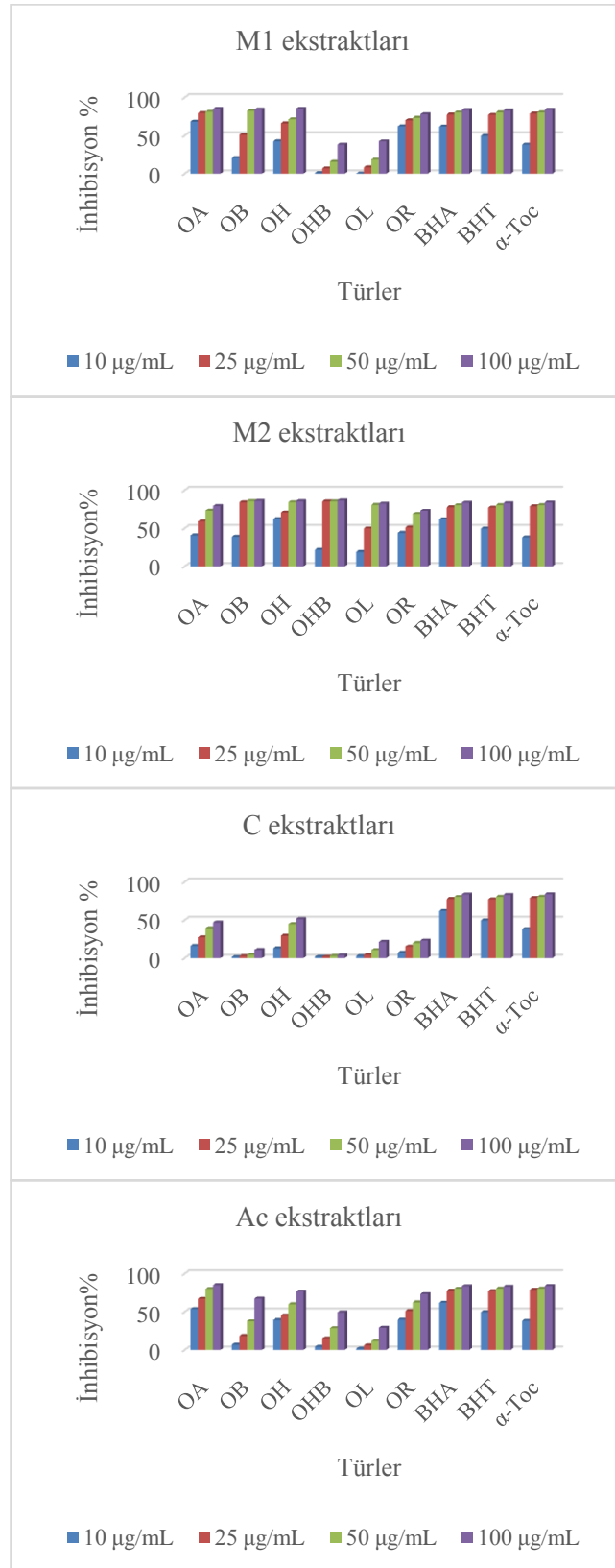
Tablo 3.5: (devam ediyor).

Bileşenler	OA	OB	OH	OHB	OL	OR
Koumarik Asitler ve Türevleri						
<i>p</i>-Koumarik asit	-	96.55±19.11	-	14.53±2.24	-	-
Kafeik asit	50.22±9.94	-	65.62±12.99	59.7±11.81	32.39±6.41	21.05±4.17
(<i>E</i>)-Ferulik asit	25.86±1.81	-	27.69±1.94	46.92±3.28	-	9.02±0.63
Klorojenik asit	-	7.16±0.99	-	8.18±1.13	6.78±0.94	-
Rozmarinik asit	574.02±44.02	1404.50±107.7	1056.84±81.04	1002.22±76.85	322.06±24.7	78.67±6.03
Temel Fenolikler ve diğerleri						
Fumarik asit	-	-	-	4.27±0.3	-	-
Gallik asit	-	8.78±0.61	-	12.09±0.84	5.40±0.37	-
Pirogallol	-	-	-	-	-	-
Ellagik asit	-	9.82±0.66	-	-	-	-
Vanilin	8.5±0.78	-	-	46.38±4.24	22.33±2.04	-
Siringik asit	9.49± 0.64	10.88±0.73	-	18.04±1.21	1.25±0.08	-
Salisilik asit	-	-	-	-	-	-
<i>p</i>-OH benzoik asit	-	-	-	47.05±3.74	22.83±1.81	-
Toplam	1250.68	3320.73	1504.92	1527.86	1187.32	312.69
(mg/kg kuru bitki)						

3.3 Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları

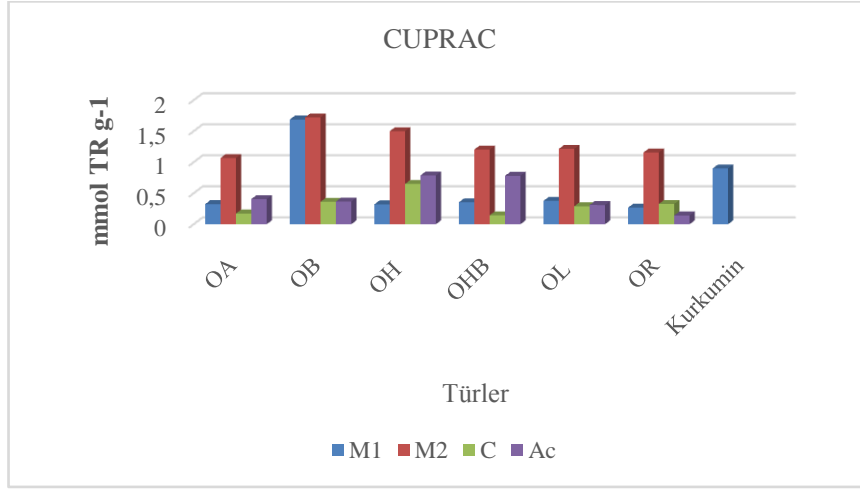
Origanum cinsi *Brevifilamentum* seksiyonu türlerinden elde edilen ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri  yöntemle tayin edilmiştir. Bunlar DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi, CUPRAC metodu ve β -Karoten-Linoleik Asit yöntemidir. Bu yöntemlere ait bulgular Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3' deki grafiklerde verilmiştir.

3.3.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin sonuçları



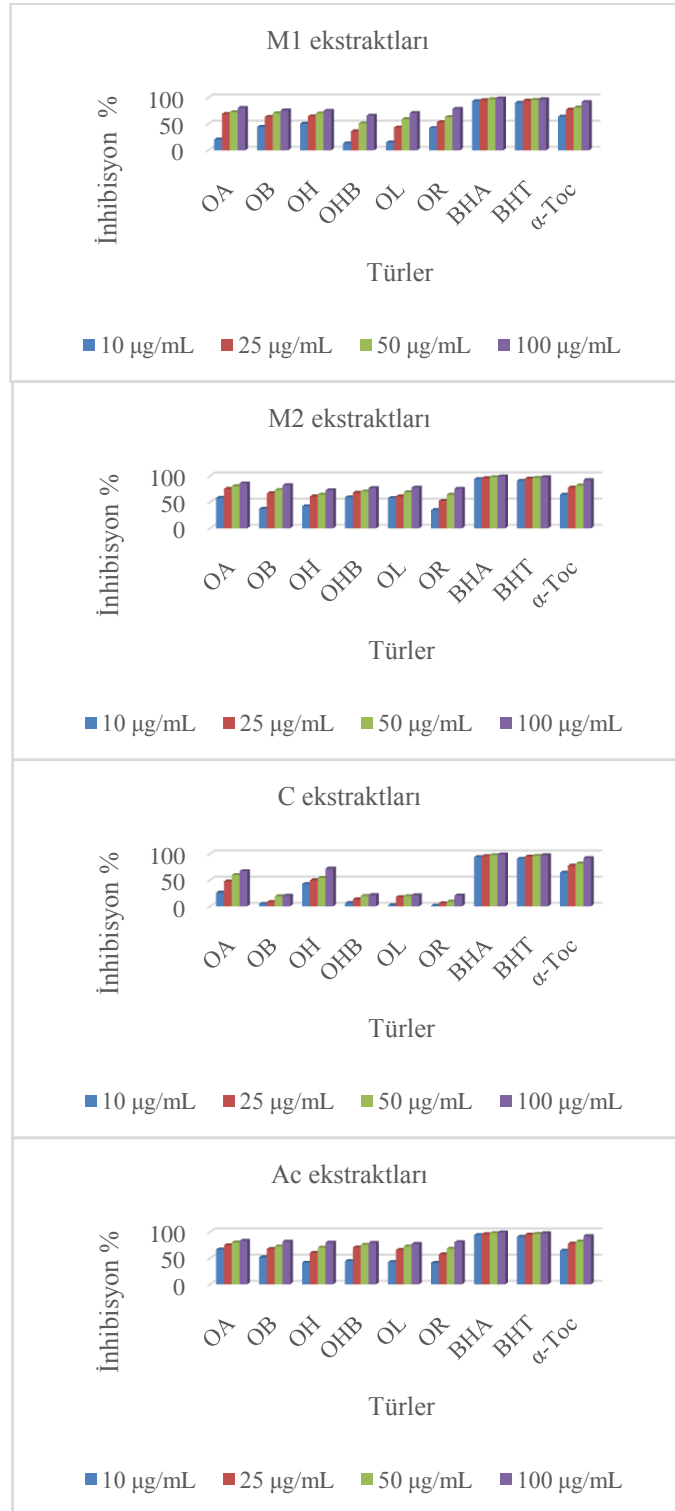
Şekil 3.1: Ekstraktların DPPH antioksidan aktivite sonuç grafiği

3.3.2 CUPRAC metodu sonuçları



Şekil 3.2: Ekstraktların Cuprac metoduna göre belirlenen aktivite sonuçları

3.3.3 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi) sonuçları



Şekil 3.3: Ekstraktların beta karoten antioksidan aktivite sonuç grafiği

3.4 Antikolinesteraz aktivite tayini sonuçları

Origanum cinsi *Brevifilamentum* seksiyonuna ait türlerden elde edilen ekstrelerinin antikolinesteraz aktivite tayini için AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibisyonları ölçülmüş ve sonuçlar % inhibisyon değeri olarak verilmiştir. Bu yöntemle ait bulgular Tablo 3.6' da verilmiştir.

Tablo 3.6: Ekstraktların antikolinesteraz aktivite tayini sonuçları.

	İnhibisyon% (200µg/mL)							
	AChE				BChE			
	M1	C	Ac	M2	M1	C	Ac	M2
OA	0	0	0	0	52.67±0.22	50.64±0.21	45.93±0.86	0
OB	0	33.48±1.23	23.33±0.45	5.59±0.29	14.88±0.35	35.20±0.93	49.63±0.66	0
OH	0	0	0	0	41.08±0.79	38.90±1.12	31.47±0.58	9.52±0.48
OHB	0	0	0	0	23.14±0.43	33.49±1.65	31.91±0.63	0
OL	0	0	0	0	8.44±0.16	50.93±1.35	47.97±0.62	0
OR	0	0	0	0	23.98±0.63	36.22±0.82	37.64±0.93	0
Kontrol*	80.24±0.28	82.10±0.51	82.10±0.51	80.24±0.28	80.78±1.22	82.05±0.48	82.05±0.48	80.78±1.22

* Kontrol olarak Galantamin kullanılmıştır.

3.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Antimikrobiyal aktivite belirleme yöntemlerinden biri olan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Çalışılan *Origanum* türlerinden elde edilen uçucu yağlara ait antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: *Origanum* türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları.

Tür	$\mu\text{g}/\text{disc}$	$\mu\text{l}/\text{disc}$	İnhibisyon alanı (mm)			
			<i>C. albicans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>O. brevidens</i>	-	5	162	140	63	32
<i>O. haussknechtii</i>	52	-	0	8	0	0
<i>O. acutidens</i>	-	5	71	99	39	30
Ketokonazol	50	-	25	-	-	-
Streptomisin	100	-	-	40	-	-
Okzasillin	50	-	-	-	36	-
Gentamisin	50	-	-	-	-	23

DMSO negatif kontrol olarak kullanılmış olup herhangi bir inhibisyon alanı gözlenmemiştir.

Ketokonazol, streptomisin, okzasillin, gentamisin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

($\mu\text{l}/\text{disc}$) her diskte doğrudan kullanılan 5 μl uçucu yağ gösterir.

($\mu\text{g}/\text{disc}$) DMSO ile seyreltilen uçucu yağ miktarını gösterir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1 Uçucu Yağ Analiz Sonuçları

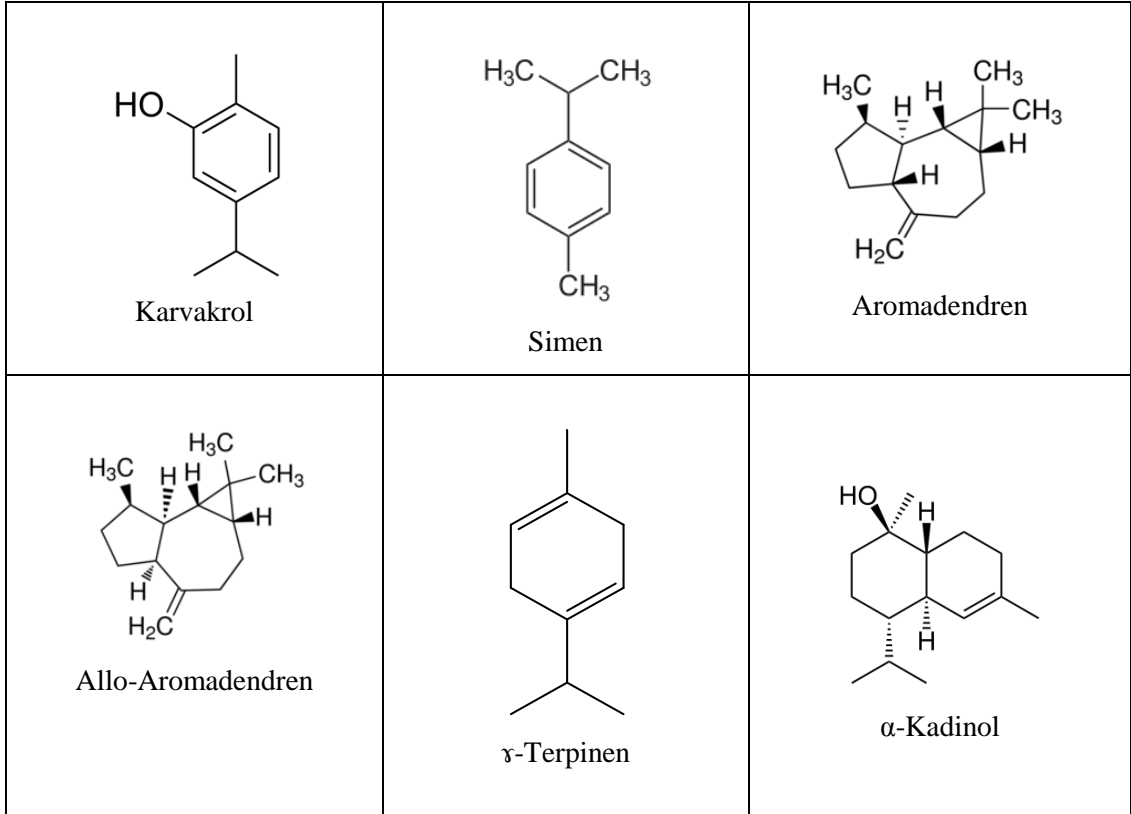
Bu çalışmada *Origanum* cinsi *Brevifilamentum* seksiyonuna ait (OA, OB, OH, OHB, OL ve OR) türler çiçeklenme döneminde toplanmış, gölgede kurutulduktan sonra hidrodestilasyon yöntemi ile uçucu yağları elde edilmiştir. Elde edilen yağların analizi sonucunda 74 bileşen belirlenmiştir. Bileşenler kimyasal yapılarına göre 6 sınıfa ayrılmıştır: hidrokarbonlar ve türevleri, monoterpen hidrokarbonlar, oksijenli monoterpenler, seskiterpen hidrokarbonlar, oksijenli seskiterpenler ve fenolik bileşiklerdir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1' de verilen türlere ait uçucu yağ analiz sonuçları incelendiğinde yüksek oranlı bileşenler; karvakrol (% 72.1), simen (% 39.2), α -kadinol (% 27.4), aromadendren (% 23.7), izopulegil asetat (% 19.8), τ -muurolen (%18.6) ve allo-aromadendren (% 15.7) olarak belirlenmiştir.

O. acutidens (OA), monoterpen hidrokarbonlardan zengin olup m-simen ana bileşenidir (% 39,2). Diğer bileşikler allo-aromadendren (% 24,8) ve aromadendren (% 11,8) dir. Daha önceki çalışmalarda OA, karvakrol tipi olarak bildirilmiştir [38]. *O. brevidens*' nin (OB), fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve ana bileşiklerinin karvakrol (% 72,1), karvon (% 9,1) ve borneol (% 7,1) olduğu tespit edilmiştir. Karvakrol, yağın büyük bölümünü oluşturur ve uçucu yağın geri kalan kısmı oksijenlenmiş monoterpenikler bakımından zengindir. *O.haussknechtii* (OH) ve *O. leptocladum* (OL), seskiterpen hidrokarbonlar açısından zengindir (% 35,7 ve % 34,8). OH ve OL uçucu yağının ana bileşikleri sırasıyla aromadendren (% 23,7) ve τ -muurolenedir (% 20,1). OL için diğer ana bileşikler p-simen (% 17,1) ve borneol (% 16), OH için carvacrol (% 16,2), allo-aromadendrene (% 15,2) olarak belirlenmiştir.

Bu bölümün diğer bir üyesi olan *O. husnucan-baseri* (OHB), oksijenlenmiş monoterpenlerden zengin ve ana bileşikleri cis- β -terpineol (% 24,3), ment-3-en-8-ol (% 22,6) ve mentondur (% 13,1). Bu tür daha önce monoterpenoid zengini olarak

rapor edilmiştir ve ana bileşikler borneol, α -terpineol ve trans-sabinen hidrattır. Son olarak OR bitkisi oksijenlenmiş seskiterpenoidler bakımından zengindir. Ana bileşiği α -kadinoldür (% 27,8). Diğer ana bileşiklerinde limonen oksit (% 15,3) ve izopülagil asetat (% 19,8) olduğu bulunmuştur. Literatürde *O. ratundifolium* (OR) uçucu yağın monoterpeneoidlerden zengin olduğu bildirilmiştir. En fazla belirlenen bileşenlerin yapıları Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Origanum* cinsinde miktarca fazla belirlenen uçucu yağ bileşenlerinin kimyasal yapıları

Bu çalışmada *Origanum* türlerinin uçucu yağ bileşimlerini oluşturan bileşenler aromatik monoterpene yapısında olup bu cinse özgü aromayı veren kimyasallardır. Özellikle karvakrol ve timol taşıyan türler halk arasında yaygın kullanıma sahiptir. Karvakrol ve timol ile ilgili yapılan çalışmalarda her iki maddeninde güçlü antibakteriyal özellik gösterdiği, ayrıca antifungal, antimikrobiyal ve insektisidal aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir [22].

4.2 Fenolik Bileşen Analiz Sonuçları

Gölgede kurutulmuş toz haline getirilen *Origanum* türlerinin C, Ac ve MeOH ile ekstre edilmesiyle hazırlanan M1, C, Ac, M2 ekstralarının fenolik bileşenleri ve miktarlarının analizi LC-MS/MS aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. M1 kodu doğrudan hazırlanan metanol ekstresini, C doğrudan hazırlanan kloroform ekstresini, Ac kloroformla tüketildikten sonra geri kalan bitkiden hazırlanan aseton ekstresini, M2 ise asetonla tüketildikten sonra geri kalan bitkiden elde edilen metanol ekstresini göstermektedir. Fenolik bileşikler üç grupta analiz edilmiştir. (I) flavonoidler ve türevleri, (II) kumarik asit ve türevleri ve (III) basit fenolikler ve diğerleri. Ekstrelerin fenolik bileşenlerinin sonuçları mg/kg kuru bitki cinsinden Tablo 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5’de verilmiştir.

Tablolar incelendiğinde polar M1 ve M2 ekstralarında yüksek miktarda fenolik bileşikler tespit edilirken Ac ve C ekstralarında daha az fenolik bileşik tespit edilmiştir.

Metanol (M1) ekstresinin fenolik bileşen tablosu (Tablo 3.2) incelendiğinde *Origanum acutidens* türünün bitki ekstresi 19 farklı bileşenle fenolik bileşik bakımından en zengin olmakla birlikte *O. husnucan-baseri* türü 9 farklı bileşenle en az fenolik bileşen içeren tür olarak tespit edilmiştir. M1 ekstresinin fenolik bileşenleri miktarca incelendiğinde *O. acutidens* en zengin tür olarak tespit edilirken, bu türü *O.haussknechtii*, *O.rotundifolium* ve *O.brevidens* takip etmektedir. Bu ekstralarda ana bileşenler kumarik asit ve türevleri ve basit fenoliklerden oluşmaktadır.

Metanol (M2) ekstresinin fenolik bileşen tablosu (Tablo 3.3) incelendiğinde *O. haussknechtii* türünün bitki ekstresi 22 farklı bileşenle en zengin tür olarak tespit edilirken, *O. acutidens*, *O. rotundifolium* ve *O. leptocladum* türlerinde daha az bileşen tespit edilmiştir. M2 ekstraları arasında miktarca en zengin tür *O. haussknechtii* olarak belirlenmiştir.

Kloroform (C) ekstresinin fenolik bileşen tablosu (Tablo 3.4) incelendiğinde *O. leptocladum* ve *O. husnucan-baseri* türlerinin bitki ekstralarından 7’şer bileşen ile en fazla bileşene sahip oldukları tespit edilmiştir. *O. acutidens* ve *O. rotundifolium* türlerinin bitki ekstralarında 3’er bileşen ile en az bileşene sahip oldukları tespit edilmiş olup bu ekstraların çoğunluğunun flavanoit ve türevlerinden oluştuğu belirlenmiştir.

Aseton (Ac) ekstralarının fenolik bileşen tablosu (Tablo 3.5) incelendiğinde *O. brevidens* türünde en fazla bileşen tayin edilirken, *O. haussknechtii* türünde 9 adet bileşen tayin edilebilmiştir. Ac ekstraları arasında *O. brevidens* miktarca da en zengin tür olarak belirlenmiştir.

Ekstrelerin fenolik bileşen tablolarındaki en fazla bileşikler şunlardır: M1 ekstresinde: OA, OH, OL ve OR için rozmarinik asit, OB için fumarik asit ve OHB için (E)-ferulik asit. M2 ekstresinde: OA, OL ve OR için rozmarinik asit, OB için galik asit, OH için (E)-ferulik asit, OHB için luteolin. Ac ekstresinde: rozmarinik asit OA, OB, OH, OHB ve OR'nin ana bileşiği olarak bulunurken, kaempferol OL türlerinin ana bileşiği olarak bulunmuştur. Fenolik bileşenler bakımından en fakir ekstre olan C ekstresinde OA ve OH için ana bileşik, kuersetagetin-3,6-dimetileter, OB ve OHB için salvigenin ve OL ve OR için penduletin bulunmuştur.

4.3 Biyolojik Aktivite Sonuçları

Antioksidan aktiviteleri, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, β -karoten linoleik asit yöntemi ve CUPRAC yöntemi yapılarak belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonunun ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesi farklı derişimlerde (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tayin edilmiştir.

Antioksidan aktivite sonuçları, çalışılan türler için uygulanan üç yöntem içinde iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

4.3.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde standart olarak BHT (Bütihidroksitoluen), BHA (Bütihidroksianisol) ve α - tokoferol (Vitamin E) kullanılmıştır. Ekstrelerin sonuçları Şekil 3.1'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde özellikle 50 ve 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ konsantrasyonlarına sahip metanol ekstraları için DPPH yöntemine göre yüksek antioksidan aktivite sonuçları elde edilmiştir. Düşük fenolik içeriği düşünüldüğünde antioksidan aktivitenin düşük olması normaldir. Kloroform ekstraları en düşük aktiviteye sahip oldukları görülmüştür. Metanol ekstralarında

OA, OB ve OH, kloroform ekstresinde OA ve OH, aseton ekstralarında OA, OB ve OH yüksek aktivite göstermektedir.

4.3.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu (β -Karoten / Linoleik Asit)Yöntemi Sonuçları

β -Karoten / Linoleik Asit aktivite yönteminde standart olarak BHT, (Bütildihidroksitoluen), BHA (Bütildihidroksianisol) ve α -tokoferol (Vitamin E) kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.3' de verilmiştir. Bu aktivite yönteminde M2 ekstraları en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Özellikle 100 μ g/mL derişimde bu ekstralar standartlara yakın derecede inhibisyon değerine sahiptirler.

4.3.3 CUPRAC Yöntemi

TEAC CUPRAC sonucu, referans olarak trolox (TR) üzerinden mmol TR g-1 olarak verilmiştir. (+) kontrol olarak kurkumin bileşigi kullanılmış olup kurkumin için bakır indirgeme kapasitesi bu yöntemle 0,9 mmol TR g-1 olarak belirlenmiştir.

Ekstreler aktiviteler bakımından incelendiğinde CUPRAC yöntemi için (Şekil 3.2) OB en iyi aktiviteyi göstermiştir. OB ve diğer bitkilerin M2 ekstraları standart olarak kullanılan curcumin'den daha iyi aktiviteye sahiptir. Kloroform ekstraları en düşük aktiviteye sahiptir.

4.3.4 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Anti-Alzheimer aktivitenin belirlenmesi için asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzimleri kullanılarak 200 μ g/mL derişimde % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak galantamin kullanılmıştır.

Ekstre sonuçları incelendiğinde (Tablo 3.6) AChE enziminin sadece OB'de düşük inhibisyon değerine sahiptir. OH'nin M2 ekstresi haricindeki diğer türlerde

BChE enzimi için inhibisyon gözlemlenmemiştir. OA en yüksek BChE inhibisyonu değerine sahiptir.

Bu türe ait yüksek aktivitenin, yüksek fenolik bileşik miktarı ile bağlantılı olduğu sonucuna varılabilir. C ekstraktlarında, yüksek miktarda kersetagetin-3,6-dimetiler ve salvigenin bulunduğu türler daha iyi BChE inhibisyon değerlerine sahiptir. M1 ve Ac ekstraktları orta derecede BChE enzim inhibisyon kapasitesine sahiptir.

4.3.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. *Escherichia coli* DSMZ1103, *Staphylococcus aureus* DSMZ1104, *Candida albicans* DSMZ1386, *Mycobacterium smegmatis* ATCC14468 mikroorganizmaları kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak DMSO, pozitif kontrol olarakda ketokonazol, streptomisin, okzasillin, gentamisin kullanılmıştır. Elde edilen biyolojik aktivite sonuçları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Özellikle *O. acuditens* ve *O. brevidens* çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı oldukça iyi sonuçlar vermiştir.

Bu çalışmada, *Origanum* cinsi *Brevifilamentum* seksiyonuna ait dördü endemik olan altı tür, uçucu yağ içeriği ve antimikrobiyal aktivitesi ile türlerden hazırlanan metanol, kloroform ve aseton ekstraktlarının fenolik içerik, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesi bakımından incelenerek rapor edilmiştir. *Origanum* türlerinin uçucu yağ içeriklerine ait birçok çalışma olmasına rağmen fenolik içeriklerine dair çalışma oldukça azdır. Özellikle *Brevifilamentum* seksiyonu için bu çalışma ilk çalışma olup ekstraktların aktivitelerinde ilk defa bu çalışma ile incelenmiştir. Uçucu yağ sonuçlarına göre *Brevifilamentum* seksiyonu farklı tiptedir. Ancak, fenolik bileşenler bakımından incelendiğinde kumarik asit ve türevlerinin baskın olduğu görülmekte olup kumarik asit zengin olduğu söylenebilir. Bu seksiyonun ana bileşeninin rozmarinik asit olduğu belirlenmiş olup, ayrıca rozmarinik asitçe zengin olan ekstraktların en iyi aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile halk arasında da baharat, çay, geleneksel tıpta ilaç

olarak ta yaygın kullanıma sahip *Origanum* türünün *Brevifilamentum* seksiyonu fitokimyasal olarak incelenmiş, elde edilen kimyasal içerik ve aktivite sonuçları bilim dünyasının kullanımına sunulmuştur.

5. KAYNAKLAR

- [1] Baytop, T., *Türkiye’de bitkiler ile tedavi*, İstanbul, Türkiye: İstanbul Üni. Yay, (1984).
- [2] Baydar, H., *Tıbbi, Aromatik ve Kefy Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 51, (2007).
- [3] Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S., *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt I, Konya: Sel. Üniv. Yayınları, 374, (2002).
- [4] Sarı, A. ve Oğuz, B., *Türkiye ve Dünyada Bazı Tıbbi, Kokulu ve Baharat Bitkilerinin Yeri ve Önemi*, İzmir: Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayını, 98, (2000).
- [5] Özhatay, N., Koyuncu M., Atay, S. ve Byfield, A., *Türkiye’nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma*, İstanbul: Doğal Hayatı Koruma Derneği, ISBN:975-96081-9-7, 121, (1997).
- [6] Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, D., “Tıbbi Ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları”, *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ankara, 437-456, (2010).
- [7] Heywood, V.H., *Flowering Plants of the World*, London: BT Batsford Ltd., 239, (1996).
- [8] Başer, K.H.C., *Essential Oil of Labiatae from Turkey-Recent*, 3, Lamiales Newsleter, 6-11, (1994).
- [9] Korosou, R., *Distribution ans Clinal Variation of Salvia fruticosa Mill, on The Island of Crete*, 27(1-2), Willnowia: 113-120, (1997).
- [10] Metcalfe, C.R. and Chalk, L., *Anatomy of Dicotyledon*, 1, Oxford: Clarendon Press, 502-535, (1972).

- [11] Saleem M., *Chemical and Biological Screening of Some Relatives of Lamiaceae (Labiatae) Family and Marina Algae Conidium iyengarii*, Karachi: P.H.D. Thesis, University of Karachi, (2000).
- [12] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M., *Turkey bitkileri listesi (damarlı bitkiler)*, İstanbul: Nezahat Gökyiğit botanik bahçesi ve flora araştırmaları derneği yayını, (2012).
- [13] Özcan, T., Dirmenci, T., Coşkun, F., Akçiçek, E. ve Güner, Ö., “A new species of Teucrium sect. Scordium (Lamiaceae) from SE of Turkey”, *Turk. J. Bot.*, 39, 310-317, (2015).
- [14] Vural, M., Duman, H., Dirmenci, T. ve Özcan. T., “A new species of Teucrium sect. Stachyobotrys (Lamiaceae) from the south of Turkey”, *Turk. J. Bot.*, 39, 318-324, (2015).
- [15] Duman, H. ve Dirmenci, T., “A new species of Micromeria (Lamiaceae) from Köyceğiz (Muğla, southwest of Turkey)”, *Turk. J. Bot.*, DOI: 10.3906/bot-1612-49, (in press), (2017).
- [16] Celep, F. ve Dirmenci, T., “Systematic and Bio-Geographic Overview of Lamiaceae in Turkey”, in *Proceedings of International Symposium on Advances in Lamiaceae Science*, Antalya, Turkey, (2017).
- [17] Clive, A. ve Stace, C., *Plant Taxonomy and Biosistematics*, London, (1980).
- [18] Estilai, A. and Hatemi, A., “Chromosome Number and Meiotic Behavior of Cultivated Chia, *Salvia hispanica* (Lamiaceae)”, *Hortscience*, 25, 12, 1646-1647, (1990).
- [19] Watson, L. and Dallwitz, M. T., “The Families of Flowering Plants”, *Oxford University Press*, London, (1978).
- [20] Davis, P.H., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, *Edinburgh University Press*, 7, Edinburgh, 300-307, (1982).
- [21] Kokkini, S., “Taxonomy, diversity and distribution of origanum species”, *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*, CIHEAM, Valenzano (Bari), 212, (1996).

- [22] Başer, K. H. C., *The Turkish Origanum Species. In: Oregano. The Genera Origanum and Lippia*, Taylor and Francis, London, (2002).
- [23] Joshi, P. K., Joshi, N., Tewari, G. and Tandon, S., “Chemical, biological and pharmacological aspects of Origanum species: A brief review”, *J. Indian Chem. Soc.*, 92, 1603-1615, (2015).
- [24] Özkan, G., ve Özcan, M. M., “Some phenolic compounds of extracts obtained from Origanum species growing in Turkey”, *Environ.Monit.Asses.*, 186, 4947-4957,(2014).
- [25] Basli, A., Delaunay, J. C., Pedrot, E., Bernillon, S., Madani, K., Monti, J. P., Merillon, J. M., Chibane, M. and Tristan R., “New cyclolignans from Origanum glandulosum active against b-amyloid aggregation”, *Rec. Nat. Prod.*, 8(3), 208-216, (2014).
- [26] Gülsoy, S., “Evaluation of essential oils and phenolic compounds of some Origanum (Labiatae/Lamiaceae) taxonomy”, *Asian J. Chem.*, 24(6), 2479, (2012).
- [27] Bernath, J., “Some scientific and practical aspects of production and utilization of oregano in central Europea”, *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy, 76-91, (1996).
- [28] http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=7869; Erişim tarihi; 10.05.2017
- [29] Baytop, T., *Farmakognozi Ders Kitabı*, Cilt I, 168-170, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3399, Eczacılık Fakültesi, 51, (1986).
- [30] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., “Biological Effects of Essential Oils-A Review”, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475, (2008).
- [31] Bağcı, E. ve Dığrak, M., “Bazı Gök nar Türleri Uçucu Yağlarının İn Vitro Antimikrobiyal Etkileri”, *Tr. J. of Biology*, 21, 273-281, (1997).

- [32] Svoboda, K. P., Hampson, J. and Hunter, E. A., "Secretory Tissues: Storage and Chemical Variation of Essential Oils in Secretory Tissues of Higher Plants and Their Bioactivity", *J. Aromatherapy*, 9(3), 124-131, (1999).
- [33] Tanker, M. ve Tanker, N., *Farmakognozi*, No.65, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 269-393, (1990).
- [34] Ceylan, A., *Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri)*, Cilt II, İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, 481, (1997).
- [35] Sakar, M. K. ve Tanker, M., *Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon*, No:67, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yay., 181, (1991).
- [36] Guenther, E., *The Essential oils*, Vol: I-IV, Malabar: Florida, Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., (1948).
- [37] Isman, M. B., "Plant Essential oils for pest and disease management", *Crop Protection*, 19, 603-608, (2000).
- [38] Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M. ve Mete, E., "Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene", *Bioresource Technology*, 99, 8788-8795, (2008).
- [39] Özek, T., "Micromeria congesta Uçucu Yağının Bileşimi", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, (1990).
- [40] Duru, M. E., "Liquidambar Orientalis var. Orientalis ve Liquidambar Orientalis var. Integriloba Yapraklarından Elde Edilen Uçucu Yağın Analizi", Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi*, Erzurum, (1993).
- [41] Poche, W.A., *Perfume, Cosmetics and Soaps 9th edition*, vol II, Chapman & Hall, (1993).
- [42] Thapa, B. B., *Extraction of essential oil, national workshop on chemical investigation and processing of aromatic plants*, Nepal: 71-81, (1989).

- [43] Wijesekera, R. O. B., *Practical manual on: The essential oil industry, agrotechnology, processing, quality assessment*, Viyana: Avusturya Thailand Institute of Scientific and Technological Research Press, (1992).
- [44] El-Gammal, S. Y., "Extraction of volatile oils throughout history", *Hamdard*, 34, 57-80, (1991).
- [45] Curtis, T. and Williams, D. G., *Introduction to perfumery*, New York: Ellis Horwood, 220-22, (1994).
- [46] Boydağ, İ., "Origanum onites L. (Kekik) yağ altı suyunun uçucu bileşikleri", *Anadolu üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 3-25, (2004).
- [47] Baddal, M. K., "Origanum minutiflorum bitkisinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, (2010).
- [48] Sell, C. S., *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry, 2, (2003).
- [49] Hornback, J. M. and Murugaverl, B., *Organic Chemistry*, 2nd Edition by Hornback, USA: Thomson Brooks/Cole, 1184-1219, (2006).
- [50] Tanker, M. ve Tanker, N., *Farmakognozi*, Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay., No:65, s:282-284, 287, 300, 317, 332, 343-344, (1990).
- [51] Gören, A. C., "Bazı Sideritis (Sideritis Argyrea, Sideritis Dichotoma, Sideritis Trojana) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, (2002).
- [52] Kılıç, T., "S. lycia ve S. leptoclada Türlerinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2002).
- [53] Finar, I. L., B. Sc., Ph. D. (Lond.), A. R. I. C., *Organic Chemistry, Vol.2*, London: Stereochemistry and The Chemistry of Natural Products, Longman, 354-358, 440-441, 451,459, (1959).

- [54] Manitto, P., *Biosynthesis of natural products*, Ellis harwood Ltd. Connecticut, 255-262, (1981).
- [55] Sell, C. S., *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry, 2, (2003).
- [56] Robbers, J.E., Speedie, M.K. and Tyler, V.E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, USA: 81-107, (1996).
- [57] Hanson, J. R., *Natural Products: The Secondary Metabolites, Tutorial Chemistry Texts*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 112, (2003).
- [58] Tetik S. Ş., “Cistus laurifolius L. ve Cistus parviflorus Lam. Uçucu Yağlarının Bileşimi”, *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 12-23, (1996).
- [59] Çarıkçı, S., “Bazı Sideritis (Sideritis niveotomentosa, Sideritis hololeuca, Sideritis brevidens) Türlerinin Diterpenik Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, (2010).
- [60] McMurry, J., *Fundamentals of Organic Chemistry*, United Kingdom: Brooks Cole Publishing Company, 1099-1123, (1986).
- [61] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 1, 533, (1984).
- [62] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 3, 307, (1986).
- [63] Simmonds, M. S. V., Blaney, W. M., Ley, S. V., Savona, G., Bruno, M. and Rodriguez, B., “The antifeedant activity of clerodane diterpenoids from Teucrium”, *Phytochemistry*, 28, (4), 1069-1071, (1989).
- [64] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 7, 149, (1990).
- [65] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 4, 399, (1987).

- [66] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 1, 171, (1984a).
- [67] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *J. Natural Product Reports Articles*, 6, 347, (1988).
- [68] Samaranayake, G., Neidigh, K. A. and Kingston, D. G., “Modified taxols 8-deacetylation and reacylation of Baccatin III”, *Journal of Natural Products*, 56, 6, 884-898, (1993).
- [69] Saldamlı, İ., *Gıda Kimyası*, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, (2007).
- [70] Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S. ve Cabaroğlu, T., “Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri”, *II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Tokat, 309-312, (2006).
- [71] Stavric, B., “Role of Chemopreventers in Human Diet”, *Clin. Biochem.*, 27(5), 319-332, (1994).
- [72] Stavric, B., “Quercetin in Our Diet: From Potent Mutagen to Probable Anticarcinogen”, *Clin. Biochem*, 27(4), 245-248, (1994).
- [73] Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran M., “Flavonoid As Antioxidants: Determination of Radical-Scavenging Efficiencies”, *Methods in Enzimology*, 186, 343-355, (1990).
- [74] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémés, C. and Jiménez, L., “Polyphenols: Food Sources and Bioavailability”, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747, (2004).
- [75] Cemeroğlu, B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, 1, Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 35, 77-88, (2004).
- [76] Alpkent, Z. ve Demir, M., “Gıdalarda Bulunan Antioksidan Maddeler ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, (2006).

- [77] Kılınç, K. ve Kılınç, A., *Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri*, 33(2), Hacettepe Tıp Dergisi, 110-118, (2002).
- [78] Yen, G. C., Duh, P. D. and Tsai, C. L., “Relationship Between Antioxidant Activity and Maturity of Peanut hulls”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 67-70, (1993).
- [79] Prior, R. L. and Cao, G. H., “Analysis of Botanicals and Dietary Supplements for Antioxidant Capacity, A Review”, *Journal of AOAC International*, 83 (4), 950-956 (2000).
- [80] İnce, A. E., “Usage of Microwave and Ultrasound in the Extraction of Essential Oils and Phenolic Compounds”, Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, Ankara, (2011).
- [81] Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., “Phenolic Compounds in Plants and Agriindustrial By-products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses”, *Food Chemistry*, 99, 191-203, (2006).
- [82] Cadenas, E. and Packer, L., *Handbook of Antioxidants*, 2nd Edition, New York: Marcel Dekker, Inc., 279-337, 473-489, (2002).
- [83] Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara P., “Effect of Natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro”, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1205-1210, (2001).
- [84] Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M. and Duran, N., “Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines”, *Food Chemistry*, 82, 409-416, (2003).
- [85] Rice-Evans, C.A., Miller, N. J. and Paganga, G., “Structureantioxidant Activity Relationship of Flavonoids and Phenolic Acids”, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, (1996).
- [86] Bilaloğlu, G. V. ve Harmandar, M., *Flavonoidler*, İstanbul: Aktif Yayınevi, 334-354, (1999).
- [87] Dillard, C. J. and German, J. B., “Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health”, *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1744-1756, (2000).

- [88] Prior, R. L., "Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage", *Am. J. Clin. Nutr.*, 78(Suppl), 570-578, (2003).
- [89] Keskin, H. ve Erkmen, G., *Besin Kimyası*, İstanbul: Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, (1987).
- [90] Bohm, B.A. and Fong, C., *Phytochemistry*, 29, 1175, (1990).
- [91] Cemeroğlu, B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, 1, Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 35, 77-88, (2004).
- [92] Köksal, G., "Şeftali Meyvesinde Fenolik Madde Dağılımı ve Pulpa İşleme Sırasında Değişimi", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 34-36, (2008).
- [93] Shahidi, F. and Naczk, M., *Food Phenolics*, Lanchester, USA: Technomic Publishing Company Book, 199-225, (1995).
- [94] Saldamlı, İ., *Gıda Kimyası*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, (2007).
- [95] Sies, H., "Oxidative stress; oxidants and antioxidants", *Experimental Physiology*, 82(2), 291-5, (1997).
- [96] <http://www.bitkiseldiyet.com/antioksidan-nedir-faydalari-nelerdir.html> erişim tarihi:01.06.2017
- [97] Lam, L.K., et al., "The antioxidants of higher plants", *Phytochemistry*, 27, 969-978,(1988).
- [98] Almes, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M., "Oxidants, antioxidant and the degenerative diseases of ageing", *Proceeding of national Academy of Sciences USA*, 90,7915-7922, (1993).
- [99] Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K. and Levine, M., "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of the role of disease prevention." *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1), 18-35, (2003).
- [100] Müftüoğlu, O., *Yaşasın Hayat*, İstanbul: Doğan Kitapçılık, (2003).

- [101] Fiege, H., Voges, H.W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.J., Garbe, D. and Paulus, W., *Fenol Türevleri*, Weinheim: Endüstriyel Kimya, WileyVCH Ullmann Ansiklopedisi, (2002).
- [102] Osawa, T. and Namiki, M.A., “A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves”, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 735-739, (1981).
- [103] Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H. and Osawa, T., “Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt”, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 735-739, (1991).
- [104] Mavi, A., “İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 52–53, (2005).
- [105] Branen, A.L., “Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene”, *Journal of the American oil chemists Society*, 52, 59-63, (1975).
- [106] Imaida, K., Fukushima, S., Shivai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K. and Ito, N., “Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl trans peptidase positive foci development in the liver of rats”, *Carcinogenesis*, 4, 969-978, (1983).
- [107] Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M. and Ogiso, T., “Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats”, *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 343-347, (1983).
- [108] Gülçin, İ., “The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 491-499, (2005).
- [109] Halliwell, B. and Gutteridge, J., “*Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed)*”, 11- 21, (1996).

- [110] Di etil eter, 1ppm inhibitörü olarak BHT; susuz % 99.7 içerir, Sigma Aldrich, Eylül, (2012).
- [111] Önerilen Diyet Ödenek, Gıda ve Beslenme Kurulu, Yaşam Bilimleri Komisyonu, Onuncu Edition Alt Komitesi Ulusal Araştırma Konseyi.
- [112] Almedia, E.S., et. al., “Storage stability and corrosive character of biodiesel behavior antioxidant TBHQ Fuel”, 90 (11), 3480-3484, (2011).
- [113] Amadasi, A., Mozzarelli, A., Meda, C., Maggi, A. and Cozzini, P., “Silico ve vitro Yaklaşım Entegre tarafından Gıda Katkı içinde xenoestrogens belirlenmesi” , (2009).
- [114] *Propil Gallat en Değişik Güvenlik Değerlendirmesi Nihai Rapor*, Toksikoloji Dergisi, 26(ek3), 89-118, (2007).
- [115] Widengren, J., Chmyrov, A. and Eggeling, H., “Ultrasensitif Floresans Spektroskopi içinde Photostabilities Geliştirmek için Stratajiler“, *Fizikokimya A Dergisi*, 111(3), 429-440, (2007).
- [116] Albayrak, S., Sağdıç, O. ve Aksoy, A., “Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü dergisi*, 26(4), 401-409, (2010).
- [117] Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A. and Adenan, I., “Antioxidant Capacity and Phenolic Content Of Cocoa Beans”, *Food Chemistry*, 100, 1523-1530, (2007).
- [118] Molyneux, P., “The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity”, *Songklanakarın Journal of Science Technology*, 26(2), 211-219, (2004).
- [119] Büyüktuncel, E., “Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler”, 17, 2, 93-103, (2013).
- [120] Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302, (2005).

- [121] Eryiğit, F., “Mentha pulegium L. ve Salvia tomentosa Miller Bitkilerinin Metanol Özütlerinin in Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, (2006).
- [122] Kulisic., “Antioxidant Properties of Thyme (Thyme vulgaris L.) And Wild Thyme (Thyme serpyllum L.) Essential Oils”, *Italian Journal of Food Science*, 17(3), 315-324, (2004).
- [123] Koleva, II., Van Beek, R.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A. and Evstatieva, L.N., “Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparison Study On Three Testing Methods”, *Phytochemical Analysis*, 13, 8-17, (2002).
- [124] Hartman, R. E., *Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimers Disease Pathology*, Taylor& Francis Group, LLC, chapter 16, (2010).
- [125] Poole, C. F., *Chromatography Today*, Elsevier Science B.V. pp. 649726.
- [126] John, B. and Standridge, M.D., “Pharmacotherapeutic Approaches to the Treatment of Alzheimers Disease”, *Clinical Therapeutics*, 26, 5, (2004).
- [127] Xilong, Z., “In vitro galantamine-memantine co-application: Mechanism of beneficial action”, *Neuropharmacology*, 51, 1181-1191, (2006).
- [128] Jamshidzadeh, A., Niknahad, H., Mohammadi-Bardbori, A. and Talati, M., “Comparative measurement of serum acetyl cholinesterase enzymeusing three different methods”, *Toxicology Letters*, 180, 237, (2008).
- [129] Ellman, G. L., Courtney, K. D. and Andres, V., “Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochem. Pharmacol*, 7, 88-95, (1961).
- [130] Lorian, V., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, (2005).
- [131] Murray, P., *Klinik Mikrobiyoloji*, Atlas Yayınevi, 390-443, <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>, (2009).

- [132] Altındış, M., *Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı*. 1. baskı. İstanbul: Nobel, (2013).
- [133] Madigan M.T., *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Ankara: Palme Yayınları, (2012).

EKLER

6. EKLER

