



***LAGOECIA CUMINOIDES* L. BİTKİSİNİN
UÇUCU YAĞ VE EKSTRELERİNİN
KİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ceyda Afşin BERDANOĞLU

Eskişehir 2021

***LAGOECIA CUMINOIDES* L. BİTKİSİNİN UÇUCU YAĞ VE
EKSTRELERİNİN KİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ceyda Afşin BERDANOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gülmira ÖZEK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2021

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ceyda Afşin BERDANOĞLU'nun "*Lagoecia cuminoides* L. Bitkisinin Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Kimyasal ve Biyolojik Aktivite Açısından Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 15/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



ÖZET

LAGOECIA CUMINOIDES L. BİTKİSİNİN UÇUCU YAĞ VE EKSTRELERİNİN KİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ceyda Afşin BERDANOĞLU

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2021

Danışman: Prof. Dr. Gülmira ÖZEK

Türkiye'nin Antalya bölgesinde toplanan *Lagoecia cuminoides* L. bitkisi üzerinde kapsamlı kimyasal kompozisyon ve biyolojik aktivite araştırması gerçekleştirilmiştir. Bitki meyvesinden hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağları (LCUY-1, LCUY-2), yine meyveden sabit yağ asitleri (LCSY-1 ve LCSY-2, meyve, yaprak ve kök kısımlarından %60 metanol ile ekstreleri (sırasıyla, LCMEM; LCMEY; LCMEK) elde edilmiştir. Uçucu yağ ve sabit yağ asitlerinin kompozisyonları GK-AİD/KS tekniği, polar ekstrelerin ise SK-KS/KS tekniği ile araştırılmıştır. Uçucu yağ ve ekstrelerin antioksidan etkileri DPPH, TEAC ve YPİTK-biyootografik yöntemler ile değerlendirilmiştir. Ekstrelerde toplam fenol ve flavonoid miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, uçucu yağ ve ekstrelerinin anti- α -amilaz, anti-asetilkolinesteraz ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Uçucu yağlarda ana bileşikler olarak timol (%85,7 ve 28,8), γ -terpinen (%6,4 ve 56,8) ve *p*-simen (%4,8 ve 9,4) tespit edilmiştir. Doymamış yağ asitlerinden, oleik asit LCSY-1 yağının %76,5'ini oluştururken, LCSY-2'de ise linoleik, oleik ve linolenik asitler sırasıyla, %25,8, %24,0 ve %10,7'sini oluşturmaktadır. Doymuş yağ asitleri her iki yağda hegzadekanoik asit (%5,7 ve 28,5) ile temsil edilmiştir. Uçucu yağlarında güçlü ABTS^{•+} katyon radikali süpürücü etki, ekstrelerinde ise güçlü DPPH• serbest radikali süpürücü etki saptanmıştır. Semipreparatif YPİTK-biyootografi tekniği ile antioksidan etkili bileşikler izole edilerek spektrometrik yöntemlerle teşhis edilmiştir. Timol, 3-kafeoilkuinik asit ile kersetin glikozitleri (rutinozit, pentozit, heksozit) antioksidan etkiden sorumlu bileşikler olarak saptanmışlardır. Ellman deneyinde en yüksek anti-asetilkolinesteraz aktiviteyi uçucu yağlar (%36,5 ve 39,3) göstermişlerdir. Pankreatik α -amilaza karşı tüm numuneler zayıf inhibitör etki sergilemişlerdir. MİK ve MBK değerlendirilmesinde numuneler zayıf antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir.

Anahtar Sözcükler: *Lagoecia cuminoides* L., Timol, 3-Kafeoilkuinik asit, Antioksidan, GK-AİD/KS, SK-KS/KS, YPİTK

ABSTRACT

EVALUATION OF CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF *LAGOECIA CUMINOIDES* L.

Ceyda Afşin BERDANOĞLU

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2021

Supervisor: Prof. Dr. Gülmira ÖZEK

A comprehensive chemical composition and biological activity study was carried out on the *Lagoecia cuminoides* L. plant collected in the Antalya region of Turkey. The fruits essential oils (LCUY-1, LCUY-2) were hydrodistilled, and the fruit, leaf and root extracts (LCMEM; LCMEY; LCMEK, respectively) were obtained with 60% methanol. The fatty acids (LCSY-1 and LCSY-2) were obtained from the fruits. The compositions of the essential oils, fatty acids and polar extracts were investigated with GC-FID/MS and LC-MS/MS techniques. The antioxidant effects of the essential oils and the extracts were evaluated by DPPH, TEAC and bioautographic-HPTLC methods. The total phenol and total flavonoid contents have been determined in all the extracts. Also, the anti- α -amylase, anti-acetylcholinesterase and antimicrobial activities of the essential oil and extracts have been investigated. Thymol (85,7 and 28,8%), γ -terpinene (6,4 and 56,8%), and *p*-cymene (4,8 and 9,4%) were determined as major compounds in the essential oils. Oleic acid comprised 76,5% of LCSY-1 lipids. Unsaturated fatty acids in LCSY-2 were represented by linoleic (25,8%), oleic (24,0%) and linolenic (10,7%) acids. Saturated fatty acids were represented by hexadecanoic acid (5,7 and 28,5%) in the both fixed oils. The compounds with antioxidant effects were isolated using semipreparative HPTLC-bioautography technique and identified by spectrometric methods. Thymol, 3-cafeoylquinic acid and quercetin glycosides (rutinoside, pentoside, hexoside) have been found to be the compounds responsible for the antioxidant effect. The essential oils showed the highest anti-acetylcholinesterase activity (36,5 and 39,3%) in the Ellman's test. All samples exhibited weak inhibitory effect against pancreatic α -amylase. The tested samples showed weak to moderate antimicrobial activity in the assessment of MIC and MBC.

Keywords: *Lagoecia cuminoides* L., Thymol, 3-Cafeoylquinic acid, Antioxidant, GC-FID/MS, LC-MS/MS, HPTLC.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde danışmanlığımı yaptığı için kendimi çok şanslı hissettiğim, eğitimim boyunca beni sabır ve anlayışla destekleyen, fikirleri ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten, yaptığım hatalarda bir anne hoşgörüsüyle motive edip, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda beni dinleyen ve yol gösteren, bana bilimi çok daha fazla sevdiren sevgili danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülmira ÖZEK'e,

Lisans döneminde tanıştığım ve Farmakognozi anabilim dalını seçmemde büyük rol oynayan, desteğini her zaman hissettiğim ve örnek aldığım hocam Sayın Prof. Dr. Temel ÖZEK'e,

Tez çalışmamda, deneyimlerini esirgemedi bana yol gösteren hocam Sayın Doç. Dr. Fatih GÖGER'e ve çalışma arkadaşım Sayın Süleyman YUR'a,

Tez bitki materyalini sağlayan Öğr. Gör. Dr. Safinaz ELMASULU ve Dr. Ahu ÇINAR'a, Bitki teşhisinde yardımını esirgemeyen Dr. Gökhan DENİZ'e,

Antimikrobiyal aktivite değerlendirmesinde yardımını esirgemeyen Uzm. Biol. Müslime TANRISEVEN'e,

Tez çalışmalarım süresince deneysel çalışmalarda imkanlarını kullandığım Farmakognozi Anabilim Dalı'na ve BİBAM'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte beraber olduğum yol arkadaşlarım Uzm. Dyt. Hilal DOĞAN GÜNEY'e, Uzm. Dyt. Ahsen YETİK'e ve gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen Ecz. Tuğba TÜYSÜZ'e,

Hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen canım arkadaşım ve biricik dostum Kadri GÜLEÇ'e,

Desteğini, sevgisini her zaman hissettiğim bir telefon kadar uzağımda olan ve lisans döneminden bu yana bağlarımızın hiç kopmadığı çok kıymetli canım hocam Sayın Mert SANDALCI'ya,

Sevgisini ve ilgisini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan hayattaki en büyük şansım olan aileme; annem, ilkokul öğretmenim, herşeyim Nurgül BERDANOĞLU'na, babam Cahit BERDANOĞLU'na, abim Cihat Bertan BERDANOĞLU'na, ablam Duygu Ruken ASLANTAŞ'a,

Hayatımda örnek aldığım, emeklerini asla unutamayacağım ve Covid-19 pandemisinde kaybettiğimiz güzeller güzeli anneannem Lütfiye SUBAŞI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	5
2.1. Apiaceae Familyası.....	5
2.2. <i>Lagoecia</i> Cinsi Botanik Bilgileri.....	6
2.3. <i>Lagoecia</i> Cinsinin Fitokimyasal Bilgileri.....	9
2.4. <i>Lagoecia cuminoides</i> L. Biyolojik Aktivite Araştırmaları.....	10
2.5. Antioksidan Aktivite Araştırmalarının Önemi.....	10
2.6. Antidiyabetik Aktivite Araştırmalarının Önemi.....	11
2.7. Antikolinesteraz Araştırmalarının Önemi.....	14
2.8. Antimikrobiyal Araştırmalarının Önemi.....	15
2.9. Timol ve Karvakrolün Biyolojik Aktiviteleri.....	16
2.10. YPİTK ve İTK Teknikleri.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1 Bitkisel Materyal.....	21
3.2 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler.....	22
3.3 Cihazlar ve Apareyler.....	24
3.4 Uçucu Yağ Eldesi.....	25
3.5 Sabit Yağ Asitlerinin Eldesi ve Metillenmesi.....	25
3.6 Ekstrelerin Elde Edilmesi.....	27

	<u>Sayfa</u>
3.7. Uçucu Yağların, Sabit Yağ Asitlerinin ve Ekstrelerin Kromatografik Analizleri.....	28
3.7.1. Uçucu yağların ve sabit yağ asitlerinin GK/KS ve GK-AİD analizleri.....	28
3.7.2. Ekstrelerin SK-KS/KS analizi.....	29
3.8. Ekstrelerin Toplam Fenol Miktar Tayini.....	30
3.9. Ekstrelerin Toplam Flavonoid Miktar Tayini.....	30
3.10. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	31
3.10.1. Antioksidan aktivitenin incelenmesi.....	31
3.10.1.1. <i>Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasitenin incelenmesi</i>	31
3.10.1.2. <i>DPPH' serbest radikalini süpürücü etkinin incelenmesi</i>	33
3.10.1.3. <i>YPİTK tekniği kullanılarak biyootografik yöntemle antioksidan aktivitenin incelenmesi</i>	34
3.10.2. Antidiyabetik aktivitenin değerlendirilmesi.....	37
3.10.3. Antikolinesteraz aktivitenin değerlendirilmesi.....	38
3.10.4. Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi.....	39
3.10.4.1. <i>Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) saptanması</i>	39
3.10.4.2. <i>Minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) saptanması</i>	41
3.10.4.3. <i>Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz</i> ...	41
4. BULGULAR.....	42
4.1 Uçucu Yağların Verimi, Özellikleri ve Kimyasal Kompozisyonları.....	42
4.2. Sabit Yağ Asitlerinin Verim ve Kimyasal Kompozisyonları.....	45
4.3. Ekstrelerin Verim, Özellikleri ve Kimyasal Kompozisyonları...	46
4.4. Ekstrelerin Toplam Fenol Miktarları.....	49
4.5. Ekstrelerin Toplam Flavonoid Miktarları.....	50
4.6. Biyolojik Aktivite Etkileri.....	51
4.6.1. ABTS ⁺⁺ radikalini süpürme etkisi.....	51

	<u>Sayfa</u>
4.6.2. DPPH' radikalini süpürme etkisi.....	52
4.6.3. Biyootografik antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	53
4.6.4. Antidiyabetik aktivite değerleri.....	56
4.6.5. Antikolinesteraz aktivite değerleri.....	56
4.6.6. Antimikrobiyal aktivite değerleri.....	57
4.6.6.1. <i>Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK)</i>	57
4.6.6.2. <i>Minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesi (MBK)</i>	60
5. TARTIŞMA.....	63
5.1. Uçucu Yağın Değerlendirilmesi.....	63
5.2. Sabit Yağ Asitlerinin Değerlendirilmesi.....	64
5.3. Ekstrelerin Değerlendirilmesi.....	65
5.4. Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	65
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	68
KAYNAKÇA.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Halk arasında diyabete karşı kullanılan Apiaceae familyası bitkileri.....	3
Tablo 2.1. Apiaceae familyasının terapötik ve ticari öneme sahip bazı türleri.....	6
Tablo 2.2. <i>Lagoecia cuminoides</i> 'in uçucu yağlarında tanımlanan bileşik yüzdeleri.....	9
Tablo 2.3. α -Glukozidaza ve α -amilaza karşı inhibitör aktivitesi olan doğal bileşikler.....	12
Tablo 2.4. Timolün biyolojik aktiviteleri.....	17
Tablo 2.5. Karvakrolce zengin <i>Origanum</i> taksonları.....	18
Tablo 2.6. İTK ve YPİTK tekniklerinin özellikleri.....	19
Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri.....	22
Tablo 3.2. Kullanılan cihaz ve aпарeylerin bilgileri.....	24
Tablo 3.3. SK-KS/KS analiz şartları.....	29
Tablo 3.4. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstreleri için uygulanan YPİTK analiz şartları.....	35
Tablo 4.1. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu.....	42
Tablo 4.2. <i>L. cuminoides</i> sabit yağ asitlerinin kompozisyonu.....	45
Tablo 4.3. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinde tespit edilen bileşiklerin ekstrelerdeki dağılımı.....	47
Tablo 4.4. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerine ait toplam fenol miktarları.....	49
Tablo 4.5. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerine ait toplam flavonoid miktarları....	50
Tablo 4.6. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin TEAC değerleri....	52
Tablo 4.7. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin DPPH testinde IC ₅₀ değerleri.....	53
Tablo 4.8. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstreleri için test edilen hareketli fazlar.....	54
Tablo 4.9. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri.....	56

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.10. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstralarının AChE enzimi yüzde inhibisyon değerleri.....	57
Tablo 4.11. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstralarının patojen mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon dozları.....	59
Tablo 4.12. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstralarının patojen mikroorganizmalara karşı minimum bakterisidal konsantrasyon dozları.....	61



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Lagoecia cuminoides</i> 'in doğadaki görüntüsü.....	7
Şekil 2.2. <i>Lagoecia cuminoides</i> meyvelerinin şemsiye ve küresel hali.....	7
Şekil 2.3. <i>L. cuminoides</i> 'in çizimi.....	8
Şekil 2.4. <i>L. cuminoides</i> taksonunun Türkiye'deki dağılımı (İstanbul, Mardin, Şırnak, Burdur, Çanakkale, Hatay, İçel, İzmir, Manisa, Muğla, Tekirdağ, Şanlıurfa).....	8
Şekil 2.5. Timolün molekül yapısı.....	17
Şekil 2.6. Karvakrolün molekül yapısı.....	18
Şekil 3.1. Kurutulmuş <i>Lagoecia cuminoides</i> L. bitkisi.....	21
Şekil 3.2. <i>L. cuminoides</i> örneğinin toplanma bölgesi: (Δ) Antalya Bölgesi (6b).....	21
Şekil 3.3. Bitkisel materyalin (meyve) Clevenger apareyinde hidrodistilasyonu.....	25
Şekil 3.4. <i>L. cuminoides</i> meyve kısımlarının ekstraksiyona hazırlanması..	25
Şekil 3.5. Bitkisel materyalin (meyve) CHCl ₃ :CH ₃ OH (2:1, <i>h/h</i>) ile çalkalayıcıda maserasyonu.....	26
Şekil 3.6. Ekstre saflaştırma çalışması: %0,4'lük CaCl ₂ çözeltisi ile yıkama işlemi.....	26
Şekil 3.7. Yağ asitlerinin Boron triflorür reaktifi ile metillenme tepkimesi.....	27
Şekil 3.8. Bitkisel materyallerin (meyve, yaprak, kök) %60'luk metanol ile çalkalayıcıda maserasyonu.....	28
Şekil 3.9. Ekstrelerden rotavapor ile çözücü uzaklaştırma işlemi.....	28
Şekil 3.10. Ekstrelerin liyofilizasyonu.....	28
Şekil 3.11. GK-AİD/KS sistemi.....	29
Şekil 3.12. SK-KS/KS sistemi.....	30
Şekil 3.13. Flavonoid ve AlCl ₃ reaktifi arasında gerçekleşen tepkime.....	31
Şekil 3.14. Antioksidan ve ABTS ^{•+} katyon radikal arasındaki tepkime.....	32
Şekil 3.15. Antioksidan ve DPPH [•] serbest radikalının arasındaki tepkime...	33
Şekil 3.16. CAMAG Automathic İTK Sampler 4.....	36

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.17. CAMAG ADC2 Automathic Developing Chamber.....	36
Şekil 3.18. CAMAG Reprostar 3.....	36
Şekil 3.19. CAMAG Chromatogram Immersion Device III.....	36
Şekil 3.20. Ellman metodunda gerçekleşen renk reaksiyonu.....	38
Şekil 3.21. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin seri dilüsyon dozları.....	40
Şekil 3.22. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin seri dilüsyon dozlarının mikroorganizmalar üzerine uygulanması.....	40
Şekil 4.1. <i>L. cuminoides</i> bitkisinden Clevenger apareyinde uçucu yağının elde edilmesi.....	42
Şekil 4.2. <i>L. cuminoides</i> meyve uçucu yağlarının gaz kromatografik profilleri. LCUY-1 ve LCUY-2: <i>L. cuminoides</i> uçucu yağları (meyve).....	44
Şekil 4.3. <i>L. cuminoides</i> meyve uçucu yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı.....	44
Şekil 4.4. <i>L. cuminoides</i> sabit yağ asitlerinin gaz kromatografik profilleri. LCSY-1 ve LCSY-2: <i>L. cuminoides</i> sabit yağları.....	46
Şekil 4.5. <i>L. cuminoides</i> bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen ekstreleri.....	46
Şekil 4.6. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin kromatografik profilleri. LCMEM: <i>L. cuminoides</i> meyve metanollü ekstresi; LCMEY: <i>L. cuminoides</i> yaprak metanollü ekstresi; LCMEK: <i>L. cuminoides</i> kök metanollü ekstresi.....	47
Şekil 4.7. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinde tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları.....	48
Şekil 4.8. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin toplam fenol miktar tayini sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	49
Şekil 4.9. Gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.10. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin toplam flavonoid miktar tayini sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	50
Şekil 4.11. Kersetin kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.12. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin etkisi ile ABTS reaktifinin renk değişimi.....	51

	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.13. Troloks kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi.....	51
Şekil 4.14. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin etkisi ile DPPH reaktifinin renk değişimi.....	52
Şekil 4.15. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin IC ₅₀ değerleri.....	53
Şekil 4.16. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağlarının (LCUY-1 ve LCUY-2) bileşenlerinin YPİTK tekniği ile ayrımı. T-1, T-2: Timol standardı.....	54
Şekil 4.17. <i>L. cuminoides</i> ekstrelerinin bileşenlerinin YPİTK tekniği ile ayrımı.....	55
Şekil 4.18. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin semipreparatif fraksiyonlaması.....	55
Şekil 4.19. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzim inhibisyonu sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	56
Şekil 4.20. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin AChE enzim inhibisyon deneyi sonucunda meydana gelen renk değişimi.....	57
Şekil 4.21. <i>S. aureus</i> ATCC 29213 üzerine LCUY-2 uygulamasının absorbans değerleri.....	62
Şekil 4.22. <i>S. aureus</i> ATCC 29213 üzerine LCUY-2 uygulamasının doza bağlı % inhibisyon değerleri.....	62
Şekil 5.1. <i>L. cuminoides</i> meyve uçucu yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı.....	64
Şekil 5.2. <i>L. cuminoides</i> meyve sabit yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı.....	64
Şekil 5.3. <i>L. cuminoides</i> uçucu yağ ve ekstrelerinin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%Inh.	: Yüzde İnhibisyonu
<i>p</i>-NPG	: <i>p</i> -Nitrofenil- β -glukopiranozit
Aβ	: Amiloid Beta Proteini
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Abs	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenztiyazoline-6-sulfonik asit)
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer Hastalığı
AKDE	: Akdeniz Üniversitesi Eğitim Fakültesi
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
APH	: Anterior Farinks Defektli
APP	: β -Amiloid Prekürsör Proteini
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATCI	: Asetiltiyokolin İyodür
ATP	: Adenozin Trifosfat
BHT	: Butil Hidroksi Toluen
BSA	: Bovine Serum Albümin/Sığır Serum Albümini
CAT	: Katalaz
ChAT	: Kolin Asetiltransferaz
ChEI	: Kolinesteraz İnhibitörü
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute
DM	: Diabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)/Ellman Reaktifi
EP	: Avrupa Farmakopesi
FCR	: Folin-Ciocalteu Reaktifi
FDA	: Food and Drug Administration
GAE	: Gallik Asite Eşdeğer Miktar

GK-İİD	: Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektörü
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi
GK-KS/İİD	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi/Alev iyonlaşma Dedektörü
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
IC₅₀	: %50 İnhibisyon Gösteren Konsantrasyon
KE	: Kersetin
LCMEK	: <i>L. cuminoides</i> Kök Metanollü Ekstresi
LCMEM	: <i>L. cuminoides</i> Meyve Metanollü Ekstresi
LCMEY	: <i>L. cuminoides</i> Yaprak Metanollü Ekstresi
LCUY-1	: <i>L. cuminoides</i> Meyve Uçucu Yağı-1
LCUY-2	: <i>L. cuminoides</i> Meyve Uçucu Yağı-2
LDL	: Low Density Lipoprotein
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MPO	: Myeloperoksidaz
MS	: Multipl Skleroz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCT	: Nicastrin
NFT	: Nörofibriler Düğüm
NIST	: National Institute of Standards and Technology
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NPR	: Natural Product Reagent
Ort.	: Ortalama değer
PEG	: Polietilen Glikol
PEN	: Presenilin Arttırıcı
Ph. Eur.	: Avrupa Farmakopesi
PSEN	: Presenilin
R_f	: Retention Faktör
RNS	: Reaktif Azot Türleri

ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RTİ	: Relatif Tutunma İndisi
RuE	: Rutine Eşdeğer Miktar
SK-KS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
SK-KS/KS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
S.S.	: Standart Sapma
TEAC	: Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasite
UV	: Ultraviyole
YPD	: Maya Pepton Dekstroz
YPİTK	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde birçok uçucu yağ ve ekstrenin biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilimsel olarak saptanmıştır. Uçucu yağların ve ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin araştırılmasının sebepleri arasında piyasada bulunan sentetik veya yarı-sentetik ilaçların yan etkileri, pahalı olmaları, kanserojen, toksik ve alerjen olmaları sayılabilir. Diğer taraftan elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin doğal olması, yan etkilerinin düşük olması veya olmaması ve yurdumuz topraklarında yetişmesi sentetik ilaçlara karşı avantajlarıdır (Nakatsu vd., 2000).

Dünya’da çok eski çağlardan beri birçok bitkinin tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Tarihte, tıbbi bitkiler ve onların kullanımları ile ilgili en eski bilgiler Çin, Mısır ve Yunan tarihinden gelmekte olup, Anadolu’da da Hitit’ler döneminde bazı drogların üretilip ihraç edildiği; günümüzde ise dünyada kullanılan bitki sayısının 20,000 civarında olduğu, bunlardan 4,000 drogun yaygın şekilde kullanıldığı, yaklaşık 400 kadarının ise ticaretinin yapıldığı bildirilmektedir (Baytop, 1999). İnsanlık tarihi boyunca birçok hastalık (şeker hastalığı, sarılık, nefes darlığı vb.) bitkiler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmış ve çalışılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, dünya nüfusunun %80’i bitkisel ilaçlarla tedavi olmaktadır. Örneğin ülkemizde halk arasında *Rosa canina* L., *Urtica dioica*, *Morus nigra* L. ve *Viscum album* L. ssp. *album*, diabetes mellitusa karşı sıklıkla kullanılan bitkilerdir. Bununla beraber Lamiaceae familyasında yer alan ve birçok Akdeniz ve Avrupa Ülkeler’inde üretimi yapılan *Thymus*, *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha* türleri değerli uçucu yağ kaynaklarıdır. Bu nedenle, familyadaki birçok bitki antimikrobiyal ve antioksidan özellikler göstermektedir (Arituluk ve Ezer, 2012; Önenç ve Aç, 2005).

Etnobotanik araştırmalar sonucunda, Bayramiç bölgesinde *Lagoecia cuminoides*’in abdominal ağrı tedavilerinde kullanıldığı rapor edilmiştir (G. Bulut ve Tuzlaci, 2008).

Ayrıca etnobotanik olarak; tonik, ekspektoran, antitüssif, karminatif, De Materia Medica’da (Dioscorides) litholitik olduğu yer almaktadır ve safra taşına, ishale, idrar yolları rahatsızlığına karşı kullanımı belirtilmiştir (Amiri ve Joharchi, 2016; Memariani vd., 2018).

Asetilkolinesteraz’ın Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Unutkanlıkla karakterize olan hastalık ABD’de ölüm sebepleri arasında 6. sırada bulunmaktadır. Bu hastalığın tedavisinde antikolinesteraz etkili antinörodejeneratif bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Adewusi ve Steenkamp, 2011).

Diabetes mellitus (DM) olarak bilinen diyabet hastalığı kronik hiperglisemi olarak da karakterize edilir. Diabetes mellitus, insülin salgısından sorumlu pankreasın yeterli miktarda insülin sekresyonunu gerçekleştiremediğinden, biyokimyasal metabolizmalarda bozulmalara sebep olan, metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi; koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık, retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler komplikasyonların yanı sıra makrovasküler komplikasyonlara da neden olabilmektedir. Kronik hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ve inflamasyonun, patogeneizde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Arıtuluk ve Ezer, 2012; Hajizadeh-Sharafabad vd., 2020).

Diabetes mellitus yirmi birinci yüzyılda insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biridir ve yaygınlığı dramatik bir şekilde artmaktadır. Hastalığın prevalansının 2015 yılında dünyada 415 milyon (%8,8) kişi olduğu, dünya nüfusunun %46,5'inin ise diyabet olduklarından habersiz oldukları tahmin edilmektedir. Bunun yanı sıra hastalığın 2030 ve 2040 yıllarında sırasıyla 439 ve 642 milyona ulaşacağı da tahmin edilmektedir (Hajizadeh-Sharafabad vd., 2020).

Yaş, obezite, cinsiyet ve diyet gibi birçok faktör DM'nin etiyolojisinde rol oynar. Genetik faktörler, çevresel faktörler ve yaşam tarzı arasındaki karmaşık etkileşimler nedeniyle ortaya çıkan birkaç farklı DM tipi tanınmıştır. Uluslararası Ekspertler Komitesi, diyabetin tedavi gereksinimlerinden ziyade etiyolojisini dikkate alarak bir sınıflandırma yapmış ve 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği tarafından bu sınıflandırma yayınlanmıştır. Sınıflandırmada; Tip-1, Tip-2, diğer spesifik tipler ve gestasyonel diyabet yer almaktadır (Arıtuluk ve Ezer, 2012; Bi, Lim ve Henry, 2017).

Günümüzde, ilaç ve diyet terapileri, DM'nin önlenmesi ve kontrolü için kullanılan iki ana yaklaşımdır. DM'yi tedavi etmek için geleneksel diyet yöntemleri; bitkilerin ve baharatların kullanımını içerir. Geleneksel diyet yöntemleri; antioksidan, antienflamatuar ve antidiyabetik özellikleri nedeniyle uzun zamandır bilinmektedir. Günümüzde, DM'nin komplikasyonlarını önlemek, tedavi etmek ve kontrol etmek için bitkisel, tamamlayıcı tedavi ve alternatif tıp kullanımı çok dikkat çekmiştir. Bu bağlamda halk arasında DM'ye karşı kullanılan Apiaceae familyasına ait bitkilerin özetlendiği bilgiler Tablo 1.1'de gösterilmiştir (Bi, Lim ve Henry, 2017).

Tablo 1.1. Halk arasında diyabete karşı kullanılan *Apiaceae* familyası bitkileri (Arıtuluk ve Ezer, 2012)

Bitkinin Latince Adı	Bitkinin Yöresel Adı	Kullanılan Kısım	Hazırlanışı	Kullanıldığı Yöre
<i>Eryngium campestre</i> L. var.	Yer	Gövde	Çiğ olarak	Ankara
<i>virens</i> (Link) Weins	kestanesi			
<i>Ferula caspica</i> M. Bieb.	Gırmızı bolu	Herba	Dekoksiyon	Doğu Anadolu
<i>Ferula orientalis</i> L.	Çakşır	Tüm bitki	İnfüzyon, Pişirilerek	Kars
<i>Ferula rigidula</i> DC. ssp. <i>rigidula</i>	Çaşır	Herba	Lapa olarak	Doğu Anadolu
<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym. ex A. W. Hill	Maydanoz	Yaprak, Herba	Dekoksiyon	Trabzon, Konya
<i>Peucedanum longifolium</i> Waldst.&Kit.	Domuz rezenesi	Herba	Turşusu hazırlanarak	Doğu Anadolu
<i>Prangos ferulacea</i> (L.) Lindl.	Eşek çakşırı	Taze sürgünler	Haşlanarak	Erzurum
		Gövde	Piştirilerek	
<i>Zosima absinthifolia</i> (Vent.) Link	Peynir otu	Yaprak	Dekoksiyon	Doğu Anadolu

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan türler arasında oksidanlar lehine bir dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan moleküllerin azalması veya inaktivasyonu sonucunda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve diğer oksidan moleküllerin artmasının yanı sıra otoksidasyona sahip endojen metabolitlerin artması söz konusudur. Oksidan türler arasında ROS ve süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ile nitrik oksit yer almaktadır. Diğer ROS kaynakları, endoplazmik retikulum ve ksantin oksidaz, NADPH plazmatik membran oksidaz enzimleridir. Reaktif azot türleri (RNS), ağırlıklı olarak mitokondride moleküler oksijen ve azottan üretilir. Glutasyon (GSH), insan vücudundaki antioksidandır ve ROS'un hücrel bileşenlere verdiği hasarı önemli ölçüde önleyebilir. Genel olarak oksidatif stres; kanser, solunum yolu hastalıkları ve nörodejenerasyon gibi çoğu kronik hastalıkta rol oynamaktadır (Blanco ve Blanco, 2017; Peña-Bautista vd., 2019; Sindhi vd., 2013).

Antioksidan; proteinlerin, karbonhidratların, lipitlerin ve DNA'nın oksidasyonunu geciktiren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Antioksidan etki mekanizması üç ana kategoride sınıflandırılmaktadır:

1. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon redüktaz (GR) ve Se, Cu, Zn gibi mineralleri içeren; ilk hat savunma antioksidanları.

2. Glutasyon (GSH), C vitamini, albümin, E vitamini, karotenoidler, flavonoidler vb. içeren; ikinci hat savunma antioksidanları.

3. Hasarlı DNA, hasarlı proteinler, oksitlenmiş lipidler ve peroksitlerin onarımı için lipaz, proteaz, DNA onarım enzimleri, transferazlar, metiyonin sülfoksit redüktaz gibi karmaşık bir enzim grubu içeren; üçüncü hat savunma antioksidanları (Sindhi vd., 2013).

Eksojen antioksidanlar temel olarak meyveler, sebzeler, tahıllar, mantarlar, çiçekler, baharatlar gibi gıda ve tıbbi bitkilerden elde edilir. Bitki materyallerinden elde edilen bu doğal antioksidanlar esas olarak polifenoller (fenolik asitler, flavonoidler, antosiyaninler, lignanlar ve stilbenler), karotenoidler (ksantofiller ve karotenler) ve vitaminlerdir (E ve C vitamini). Genel olarak bu doğal antioksidanlar, özellikle polifenoller ve karotenoidler; antienflamatuar, antibakteriyel, antiviral, yaşlanma karşıtı ve antikanser gibi çok çeşitli biyolojik etkiler gösterirler. Önemli sağlık etkileri göz önüne alındığında, doğal antioksidanların etkin ekstraksiyon yöntemleri, antioksidan aktivitenin uygun değerlendirilmesi büyük ilgi görmektedir (Xu vd., 2017).

Yapılan kapsamlı literatür araştırması sonucu Türkiye’de yetişen *Lagoecia cuminoides* L. bitkisi ekstraktlarının, sabit yağ asitlerinin kompozisyonu hakkında ve uçucu yağı üzerinde yürütülen herhangi bir biyolojik aktivite çalışması bulunmamaktadır. Bu sebeple *L. cuminoides* bitkisinin uçucu yağ ve ekstraktlarının üzerinde kapsamlı fitokimyasal ve biyolojik aktivite taraması önem taşımaktadır.

Bu tezin amacı *L. cuminoides* bitkisinin uçucu ve uçucu olmayan bileşenlerinin kimyasal kompozisyonlarının ve antioksidan, antidiyabetik, antikolinesteraz, antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasıdır. Bu doğrultuda tez kapsamında *L. cuminoides* bitkisinin üzerinde aşağıdaki araştırmalar hedeflenmiştir:

- Doğal ortamda yetişen bitkinin çiçeklenme-meyvelenme döneminde toplanması ve kurutulması.
- Bitkinin uçucu yağ, sabit yağ ve ekstraktlarının elde edilmesi.
- Bitkinin uçucu yağ ve sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonunun gaz kromatografi tekniği ile araştırılması.
- Bitki ekstraktlarının kimyasal kompozisyonunun sıvı kromatografisi tekniği ile araştırılması.
- Ekstrelerde toplam fenol ve toplam flavonoid miktarlarının değerlendirilmesi.
- Uçucu yağ ve ekstraktların antioksidan, antidiyabet, antikolinesteraz ve antimikrobiyal etkilerinin araştırılması.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Apiaceae Familyası

Apiaceae familyası, üç alt familyaya ayrılmış 434 cins, 3780 türden oluşan çiçekli bitkilerin en önemli familyalarındandır. Alt familyaları; Hydrocotyloideae, Saniculoideae ve Apioideae'dır. Ancak Heywood, Brummitt ve Culham (2007) Apiaceae'yı; Apioideae, Saniculoideae, Azorelloideae ve Mackinlayoideae olarak dört alt familyaya ayırmıştır. Apiaceae familyasının türleri dünyaya yayılmış ve daha çok kuzey ılıman bölgelerde ve tropik bölgelerde yüksek rakımlarda bulunmaktadır (Heywood, Brummitt ve Culham, 2007).

Apiaceae türlerinin temel ortak özellikleri; alternate yapraklar, içi boş saplar, küçük çiçekler, basit veya birleşik umbel ve meyvelerde çiçek salkımları veya yağ kanallı tohumlar olarak özetlenebilir (Heywood, 2007; Sayed-Ahmad vd., 2017).

Genellikle kereviz, havuç veya maydanoz familyası olarak bilinen Apiaceae veya Umbelliferae, içi boş gövdeli aromatik bitkilerin bir familyasıdır. Bu familyanın birçok bitkisi, bazıları tıbbi özelliklere sahip olan çeşniler veya sebzelerdir. Apiaceae familyasına ait türler tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık bitkilerdir. Ancak küçük bir azınlık kısmı odunsu çalılar veya *Bupleurum fruticosum* gibi küçük ağaçlardır. Yaprakları değişken boyuttadır. Yapraklar saplı veya sapsız olabilir. Yaprak diseke edilir, sumru veya pinnatifiddir, ancak bazı cinslerde basit ve bütündür. Yaprakları ezildiğinde genellikle belirgin bir aromatik koku yayar. Ancak bazı türlerde bu özellik yoktur (Heywood vd., 2007; Tamokou, Mbaveng ve Kuete, 2017).

Son zamanlarda, bu familyaya ait bitkilerin farmakolojik özelliklerini keşfetmek için birçok deneysel ve biyolojik araştırma yapılmıştır. Etnobotanik çalışmalar, Apiaceae familyası bitkilerinin insanlar arasında birçok hastalığı tedavi etmek amacıyla kullanıldığını göstermektedir. Afrika ve Asya geleneksel toplumlarında, Apiaceae familyasına ait türlerin, farklı kısımları; mide rahatsızlıkları, bulantı, apandisit, hipertansiyon, kardiyovasküler problemler, kabızlık ve sivrisinek ısırıkları gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Abdulmanea vd., 2012; Heywood, 2007; Zengin vd., 2019).

Apiaceae familyası bitkileri, antik çağlardan beri halk ilacı olarak da kullanıldığı gibi aynı zamanda; gıda maddelerinde, içeceklerde, parfümeride, ilaç ve kozmetik ürünlerinde aromatan olarak da kullanılmaktadır. Apiaceae familyasındaki bitkiler, sahip oldukları salgı yapılarının (kanallar ve vittalar) fazlalığı nedeniyle uçucu yağlar

bakımından zengin kaynaklardır. Bu bitkilerde uçucu yağlar, köklerden şizokarplara (tohumlara) kadar kanallar ve vittaların içinde depolanır. Uçucu yağlar, protozal enfeksiyonlarla mücadelede yeni terapötik seçenek olarak görülmektedir (Kamte vd., 2018; Sayed-Ahmad vd., 2017). Ayrıca, Apiaceae familyasına ait olan; rezene (*Foeniculum vulgare*), dere otu (*Anethum graveolens*), kişniş (*Coriandrum sativum*), ajwain (*Trachyspermum copticum*) ve kimyon (*Carum carvi*) ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Apiaceae familyasının terapötik ve ticari öneme sahip bazı türleri Tablo 2.1’de listelenmiştir (Saleem vd., 2017).

Tablo 2.1. Apiaceae familyasının terapötik ve ticari öneme sahip bazı türleri (http-1)

<i>Anethum graveolens</i> L. (Dill)	<i>Carum carvi</i> L.
<i>Angelica geniculata</i> (Hook.f.) F. Först	<i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>sativus</i> (Hoffm.) Arcang.
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L.) Hoffm.	<i>Dorema ammoniacum</i> D. Don.
<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Ferula asafoetida</i> Linn.
<i>Azorella compacta</i> Phil.	<i>Ferula galbaniflua</i>
<i>Carum bulbocastanum</i> (L.) W. D. J. Koch	<i>Ferula sumbul</i> (Kauffman) Hook. fil.
<i>Cicuta douglasii</i> (DC.) Coult.&Rose	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	<i>Oenanthe aquatica</i> (L.) Poir.
<i>Coriandrum sativum</i> L.	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym. ex A. W. Hill
<i>Cuminum cyminum</i> L.	<i>Pastinaca sativa</i> subsp. <i>urens</i> (Req. ex Godr.) Celak.

2.2. *Lagoecia* Cinsinin Botanik Bilgileri

Lagoecia L. cinsi Apiaceae familyasına aittir. Cins adı yunanca tavşan evi (bitki, tavşanların yuvalarının sık görüldüğü yerlerde görülür) anlamı taşımaktadır (Şekil 2.1). Türkiye’de *L. cuminoides*, cinsin tek temsilcisidir. Farsça “yabani kimyon” anlamına gelen, Türkiye’de halk arasında “pülüskün” ismi ile anılan bu bitki; Akdeniz bölgesinde, İran’ın güney ve güneybatı bölgelerinde yetişmektedir. Yıllık 0,3 m’ye kadar büyüebilmektedir ve çiçekler hermafrodittir (http-2).



Şekil 2.1. *Lagoecia cuminoides* 'in doğadaki görüntüsü (<http-3>)

Lagoecia cinsi; basit pinnat, dar yapraklara sahip tek yıllık bir bitkidir. Meyveler önce şemsiye gibi aşağı doğru sallanırken, sonra dikleşip yoğun küresel bir hal alır (Şekil 2.2). Brakteler, brakteoller ve sepaller±pektinat. Çiçek durumu bir umbelden oluşur ve petalleri beyaz, uzun aristat esnek kıllar ile yapının her tarafında konumlanmıştır. Meyvedeki bir merikarp; beyaz yoğun kıllarla örtülü, siyah oval±terete yapılardır. Çıkıntılar belirgin değildir. Salgı kanalları; apikal, 2 kommissural, 3 dorsal olacak şekilde zor ayırt edilir. Monotipiktir (Davis, 1965).



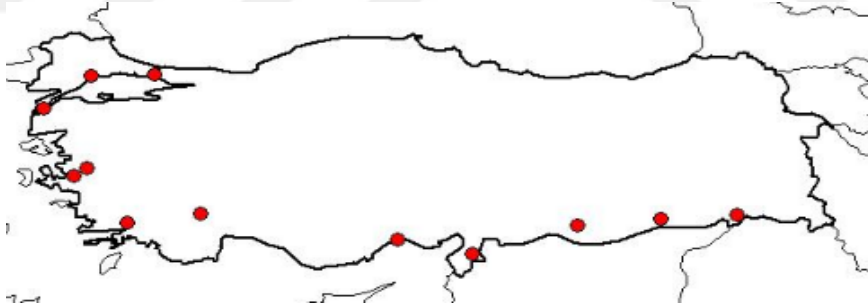
Şekil 2.2. *Lagoecia cuminoides* meyvelerinin şemsiye ve küresel hali (<http-4>)

L. cuminoides 'in sinonimi *Cuminoides obliqua* Moench'tir. Nemli toprağı, güneşli ya da yarı gölgeli bölgeleri tercih eder. *L. cuminoides*, hafif (kumlu), orta (tınlı) ve ağır (kil), asit, nötr ve bazik topraklarda, açık ormanlık veya gölgesiz ortamlarda büyüebilmektedir. Gövde düz, yuvarlak, çizgili ve serttir. Alt yapraklar dar oblong veya dar eliptik ve sayısı 18'e kadar çıkan çift yaprakçık barındırır. Nisan, mayıs ve haziran aylarında çiçek açmaktadır ve çiçeklenme küremsidir. Şekil 2.3'te *L. cuminoides* 'in çizimi yer almaktadır.



Şekil 2.3. *L. cuminoides*'in çizimi (Evergetis ve Haroutounian, 2015)

Tohumu, kimyonun yerine kullanılabilir. Köklerde önemli bir bileşendir ayrıca bisküvi, kek ve ekmekte de lezzet verici olarak kullanılabilir. Sindirimi iyileştirmeye yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Tohum tamamen olgunlaştığında hasat edilir ve kurutulur daha sonra hava geçirmez kavanozlarda saklanır (Bahmanzadegan vd., 2019; [http-2](#); [http-5](#)). Taksonun Türkiye'deki dağılımı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. *L. cuminoides* taksonunun Türkiye'deki dağılımı (İstanbul, Mardin, Şırnak, Burdur, Çanakkale, Hatay, İçel, İzmir, Manisa, Muğla, Tekirdağ, Şanlıurfa) ([http-6](#))

Sap terete, striat, katı, 6-40 cm. Alt yaprakları dar dikdörtgen ila dar eliptik, 3-18x0,5-3 cm, 18 çift kadar yaprakçıklar, oval, derin kesik, tırtıklı, kabuksu, kenardaki her diş aristat. Meyveler küresel, c. 9-18 mm çapında. Brakteler 8-10. Brakteoller c. 4. Sepaller; tabanda bağlanır, meyvede kalıcı, 2-4 mm. Meyve c. 1,5 mm. Yol kenarları, kuru alan ve yamaçlar, denizden yüksekliği 1100 m şeklindedir. *L. cuminoides*'e ait taksonomi bilgileri aşağıda verilmiştir (Davis, 1965).

Alem: Plantae

Şube: Magnoliophyta

Alt Sınıf: Magnoliidae

Familiya: Apiaceae

Cins: *Lagoecia*

Tür: *Lagoecia cuminoides* (http-7)

2.3. *Lagoecia* Cinsinin Fitokimyasal Bilgileri

Lagoecia cinsi üzerinde yapılan kaynak taraması sırasında çok kısıtlı bilgiye rastlanmıştır. Baser ve Tümen (1994) tarafından, Türkiye’de yetişen *Lagoecia* cinsi üzerinde bir çalışma sonucu rapor edilmiştir; bu çalışmada Balıkesir, Manisa ve Kırklareli illerinden toplanan *L. cuminoides* topraküstü kısımlarının uçucu yağ kimyasal kompozisyonları araştırılmıştır ve Tablo 2.2’de *L. cuminoides* bitkisinin başlıca uçucu bileşikleri sıralanmıştır (Baser ve Tümen, 1994; Bulut, 2015).

Tablo 2.2. *Lagoecia cuminoides*’in uçucu yağlarında tanımlanan bileşik yüzdeleri (Baser ve Tümen, 1994)

Bileşik	A	B	C
1,8-Sineol	0,21	0,10	0,08
γ -Terpinen	15,80	3,87	0,40
<i>p</i> -Simen	5,36	2,15	0,27
1-Okten-3-ol	0,16	0,22	0,13
Terpinen-4-ol	1,06	1,28	0,90
β -Farnesen	0,10	0,26	0,34
Timol	72,83	89,20	94,76
Karvakrol	0,56	0,39	0,62

A=Balıkesir: Kúpeler köyü, Temmuz 1993’te Türkiye (Yerel ad: Bayır Çayı),

B=Manisa: Kula, Gümüşçay köyü, Ağustos 1993’te Omurbaba dağı (Yerel ad: Omurbaba Çayı),

C=Kırklareli: Makri, Dedeğaç, Karamazan Sekizi dağı, Ağustos 1993 (Yerel ad: Mente).

İran’da yetişen *L. cuminoides*’in üzerinde Bahmanzadegan vd. tarafından yapılan çalışmanın sonucunda uçucu olmayan sekonder metabolitlerin kompozisyonu rapor edilmiştir. Majör fenolik bileşiklerin arasında; klorojenik asit, hesperidin, rosmarinik asit, hesperetin ve vanilin tespit edilmiştir (Bahmanzadegan vd., 2019).

2.4. *Lagoecia cuminoides* L. Biyolojik Aktivite Araştırmaları

Baser ve Tümen'in 1994 yılında *L. cuminoides* ile ilgili yayınlamış oldukları rapor, Bayramiç bölgesindeki tıbbi bitkilerin geleneksel kullanımlarının ilk kapsamlı çalışmasıdır ve *L. cuminoides* ile ilgili yapılan Türkiye'deki ilk rapordur. *L. cuminoides*'in ilk defa Türkiye'de halk arasında şifalı bir bitki olarak kullanıldığı kaydedilmiştir (Baser ve Tümen, 1994).

İran'da yetişen *L. cuminoides* topraküstü kısımlarından elde edilen metanollü ekstrenin antioksidan aktivite değerlendirme sonuçları rapor edilmiştir. DPPH testi sonuçlarına göre ekstrenin etkisi IC₅₀ 1,597 mg/mL olarak saptanmıştır (Bahmanzadegan vd., 2019).

Lübnan'da yetişen *L. cuminoides* sulu ve metanollü ekstralarının Giorgio tarafından yapılan incelemesinde (2008) sulu ekstrenin IC_{50-Human} 124,9 µg/mL, metanollü ekstrenin IC_{50-Human} 26,5 µg/mL, diklorometanlı ekstrenin IC_{50-Human} 29,6 µg/mL toksik dozları saptanmıştır (Di Giorgio vd., 2008).

2.5. Antioksidan Aktivite Araştırmalarının Önemi

Antioksidan metabolizma, hücrenin hayatta kalmasında hayati öneme sahip oksidatif süreçleri ifade eder. Aerobik metabolizmada üretilen serbest radikaller, hücre proliferasyonu, apoptoz ve gen ekspresyonu gibi bir dizi düzenleyici süreçte yer alır. Aşırı miktarda üretildiğinde, serbest radikaller antioksidan sistemin savunma kabiliyetine karşı koyabilir, hücre zarı lipidlerini, hücre proteinlerini, karbonhidratları, DNA ve enzimleri oksitleyerek hücre içindeki temel biyomolekülleri bozabilir. Moleküler oksijenin aşamalı olarak azaltılması sırasında, bir dizi yeni reaktif oksijenli tür meydana gelir. Reaktif türler, değerlik kabuğunda eşlenmemiş bir elektrona sahip olan kimyasal türler olarak tanımlanan oksijenlenmiş/azotlu serbest radikaller veya nötr moleküllerdir. Oksijenlenmiş moleküller; süperoksit anyon radikali O₂^{•-}, hidroksil HO[•], hidroperoksil HO₂[•], peroksil ROO[•], alkoksil RO[•] ve azotlu serbest radikaller; nitrik oksit NO[•], peroksinitrit ONOO⁻ ve nitrojen dioksit NO₂ iken, nötr moleküllere ise H₂O₂ ve HClO örnek olarak verilebilir (Patel vd., 2013; Pisoschi vd., 2016).

Geçmişte ve günümüzde uygulanan geleneksel bitkisel tedaviler tıbbın temeli olarak kabul edilmiştir. Bitkinin kabuk, yaprak, sap, kök, çiçek, meyve, tohum gibi bitkinin tüm kısımlarında doğal olarak sentezlenirler. Fitokimyasallar (sekonder metabolitler) olarak isimlendirilen bu yapılar bitki kaynaklı biyoaktif kimyasallardır.

Bitkilerden elde edilen ilaçların, klinik olarak etkili ve mevcut ilaçlardan nispeten daha az toksik olduğu, yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra sekonder metabolitler, serbest radikallere karşı savunmada önemli bir rol oynar (Al-Rifai vd., 2017).

Hücre içinde iki sıra antioksidan savunma vardır. Yağda çözünen hücresel zarda bulunan ilk savunma hattı; E vitamini, β -karoten ve koenzim Q'dan oluşmaktadır. Bunlardan E vitamini, hücre zarındaki en güçlü zincir kırıcı antioksidan olarak kabul edilmektedir. Hücrenin içinde suda çözünür antioksidan temizleyiciler de bulunur. Yapraklı sebzelerde ve tohumlarda doğal olarak bulunan askorbik asit, E vitamini ve fenolik bileşikler gibi antioksidanlar, birçok hastalıkla ilişkili oksidatif hasarı azaltma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle birçok araştırmacı doğal antioksidanlara odaklanmış ve bitkilerden çok sayıda antioksidan bileşiğin eldesi için çalışmalar yürütmüş ve doğal bileşiklerin antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Karagöz vd., 2015).

2.6. Antidiyabetik Aktivite Araştırmalarının Önemi

Diabetes mellitus, giderek büyüyen bir küresel sağlık sorunudur. Diyabet prevalansı %6 ila %13 arasında değişmektedir ve düşük gelirli ülkelerde daha yüksektir. 2005 ve 2015 yılları arasında, diyabet insidansının endişe verici bir hızda arttığı, 333 milyon vakadan 435 milyon vakaya ve 2025 yılına kadar 700 milyondan fazla yetişkinin diyabet olması beklenmektedir. 2014 yılında küresel diyabet maliyetinin yıllık 825 milyar dolar olduğu düşünülmektedir (Tabb vd., 2017).

α -Amilaz (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.1), glikozidik bağlantıların hidrolizini katalizleyen; mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvan salgılarında yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Karbonhidrat insan diyetinin ana bileşenini oluştururken, nişasta karbonhidratların büyük bir kısmını oluşturur. Nişastanın α -amilazlar ile parçalanması karbonhidrat metabolizmasında gerekli olan polisakkaritlerin enzimatik yolağında ilk adımı oluşturur (Payan, 2004).

α -Amilaz, postprandiyal glikoz seviyelerinden sorumludur ve bu nedenle postprandiyal kan glikoz seviyelerini düşürebilmektedir. Diyet karbonhidrat emilimini engellemek için; doğal kaynaklar, sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahip olduklarından, karbonhidrat sindirim enzimi inhibitörleri olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla α -glukozidaza ve α -amilaza karşı inhibitör aktivitesi olan doğal bileşikler Tablo 2.3'te gösterildiği gibidir. Günümüzde, doğal ürünlerin, diyabet ve obezitenin

önlenmesinde ve iyileştirilmesinde fizyolojik etkileri nedeniyle bitkisel kaynaklı ekstrelelere yönelik araştırmalar hız kazanmaktadır (Agarwal ve Gupta, 2016; Tundis, Loizzo ve Menichini, 2010).

Tablo 2.3. α -Glukozidaza ve α -amilaza karşı inhibitör aktivitesi olan doğal bileşikler (Gajbhiye, Ganapathy ve Parasuraman, 2018)

Bitki türleri ve familyası	Bileşik Adı	Substrat	IC ₅₀
<i>Adhatoda vasica</i> Nees. (Familya: Acanthaceae)	Vasisin	Sükroz	125 μ M
	Vasisinol	Sükroz	250 μ M
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr. Serr. (Familya: Rutaceae)	Anhidroaegeline	<i>p</i> -NPG	35,8 μ M
<i>Alstonia scholaris</i> (Linn.) R. Br. (Familya: Apocynaceae)	Kersetin 3-O- β -D- ksilopiranosil (1" $\rightarrow$ 2")- β -D- galaktopiranozit	Sükroz	1,96 mM
	(-)-Lyoniresinol 3-O- β -D- glukopiranozit	Sükroz, Maltoz	1,95 mM 1,43 mM
<i>Andrographis paniculata</i> Nees. (Familya: Acanthaceae)	Andrographolide	<i>p</i> -NPG, Nişasta	11,0 mg/mL 11,3 mg/mL
<i>Azadirachta indica</i> (L.) Adelb. (Familya: Meliaceae)	Meliasinolin	Nişasta	46,74 μ g/mL
<i>Barringtonia racemosa</i> Roxb. (Familya: Lecythidaceae)	Bartojenik asit	<i>p</i> -NPG	168,09 μ g/mL
<i>Bergenia ciliate</i> Haw. (Familya: Saxifragaceae)	(-)-3-O-Galloylepikateşin	Sükroz, Maltoz, Nişasta	560 μ M 334 μ M 739 μ M
	(-)-3-O-Galloylkateşin	Sükroz, Maltoz, Nişasta	297 μ M 150 μ M 401 μ M
<i>Bergenia ligulata</i> Wall. (Familya: Saxifragaceae)	(+)-Afzelechin	<i>p</i> -NPG	0,13 mM
<i>Commiphora wightii</i> (Familya: Burseraceae)	Epi-mukulin	<i>p</i> -NPG	159,33 μ M
	Diasesartemin	<i>p</i> -NPG	60,55 μ M
	(Z)-Guggulsteron	<i>p</i> -NPG	132,14 μ M
<i>Curcuma longa</i> Linn. (Familya: Zingiberaceae)	Kurkumin	<i>p</i> -NPG	37,2 μ M
	Demetoksikurkumin	<i>p</i> -NPG	42,7 μ M
	Bisdemetoksikurkumin	<i>p</i> -NPG	23 μ M
<i>Derris scandens</i> Benth. (Familya: Fabaceae)	Skandinon	<i>p</i> -NPG	34,74 μ g/mL
	Skandenon	<i>p</i> -NPG	33,83 μ g/mL
	Skandenin A	<i>p</i> -NPG	25,17 μ g/mL

Tablo 2.3. (Devam) α -Glukozidaza ve α -amilaza karşı inhibitör aktivitesi olan doğal bileşikler (Gajbhiye, Ganapathy ve Parasuraman, 2018)

Bitki türleri ve familyası	Bileşik Adı	Substrat	IC ₅₀
<i>Dichrostachys cinerea</i> (L.) Wight et Arn (Familya: Mimosaceae)	(-)-Mesquitol	<i>p</i> -NPG	83,32 μ M
<i>Hydnocarpus wightiana</i> Blume (Familya: Achariaceae)	Luteolin	<i>p</i> -NPG	23,52 μ M
<i>Piper longum</i> Linn. (Familya: Piperaceae)	İzohidnokarpin	<i>p</i> -NPG	23,9 μ M
	Pipatalin	<i>p</i> -NPG	32,10 μ g/mL
	Pellitorin	<i>p</i> -NPG	34,39 μ g/mL
	Sesamin	<i>p</i> -NPG	36,39 μ g/mL
	Brakistamid B	<i>p</i> -NPG	34,09 μ g/mL
	Guineensin	<i>p</i> -NPG	19,26 μ g/mL
<i>Pistacia integerrima</i> (<i>Pistacia chinensis</i> var. <i>integerrima</i> J. L. Stewart ex Brandis) (Familya: Anacardiaceae)	Pistagramik asit	<i>p</i> -NPG	89,12 μ M
			62,47 μ M
<i>Psidium guajava</i> Linn. (Familya: Myrtaceae)	Kersetin	Sükroz,	3,5 mM
		Maltoz,	4,8 mM
		Nişasta	4,8 mM
	Kaempferol	Sükroz,	5,2 mM
		Maltoz,	5,6 mM
		Nişasta	5,3 mM
	Mirisetin	Sükroz,	3,0 mM
		Maltoz,	4,1 mM
		Nişasta	4,3 mM
<i>Salvia moorcraftiana</i> Wall (Familya: Lamiaceae)	5-Hidroksi-7,4'- dimetoksiflavon	<i>p</i> -NPG	4,38 μ M
	Oleanolik asit	<i>p</i> -NPG	5,64 μ M
<i>Solanum torvum</i> Swartz (Familya: Solanaceae)	Metil kafeat	Sükroz	1,5 mM
		Maltoz	2,0 mM
<i>Terminalia superba</i> Engl.&Diels (Familya: Combretaceae)	Gallik asit	<i>p</i> -NPG	5,2 μ M
	Metil gallat	<i>p</i> -NPG	11,5 μ M

Cezayir geleneksel tıbbında, *Ammodaucus leucotrichus* (Apiaceae) tohumları gastrointestinal rahatsızlıkları, hipertansiyon ve diyabeti tedavi etmek için kullanılmaktadır. Telli vd.'lerinin yaptıkları çalışmada, *A. leucotrichus* tohumlarının sulu ekstrelerine uygulanan antioksidan ve α -amilaz inhibisyon testi yer almaktadır. ABTS radikalini IC₅₀ 175,67 $\pm$ 2,36 μ g/mL ve DPPH radikalini IC₅₀ 232,89 $\pm$ 19,28 μ g/mL değeri

ile α -amilaz enzimini ise önemli derecede (%68,83) inhibe etmişlerdir (IC₅₀ 2,65 mg/mL) (http-8).

2.7. Antikolinesteraz Araştırmalarının Önemi

Dünya çapında milyonlarca yaşlıyı etkileyen, yaşa bağlı en yaygın nörodejeneratif bozukluk olarak; Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS), Huntington hastalığı ve Multipl Skleroz (MS) gibi hastalıklar sayılabilmektedir. Bu bozukluklar arasında, Alzheimer hastalığı (AH) en yaygın kronik nörodejeneratif hastalık olmakla birlikte 65 yaş ve üstü bireylerin yaklaşık %7'sini etkilediği düşünülmektedir. AH, yalnızca ABD'de 5,7 milyon insanda görülmekte ve bunun 2050 yılına kadar 13,8 milyon kişiye yükselmesi öngörülmektedir. AH, esas olarak ilerleyici bilişsel bozulma ve hafıza bozukluğundan kaynaklanan demansla ilişkili bir hastalıktır (Dinda vd., 2019; Fish vd., 2019).

Bu hastalığın etiyolojisi tam olarak bilinmemesine karşın hastalık, özellikle hipokampus ve beyin korteks bölgelerinde bulunan nöronlarda hiperfosforile tau proteinlerinden oluşan hücre dışı amiloid beta proteinlerinin (A β) ve hücre içi nörofibriller düğümlerin (NFT) birikmesiyle karakterize edilir ve nöron kaybına neden olur. Bu nedenle, birçok araştırma bu plakları azaltmaya odaklanmıştır. Hastalığın hem genetik duyarlılığa hem de çevresel faktörlere bağlı olduğuna inanılsa da en önemli faktörün yaş olduğu düşünülmekte ancak yaşlanmanın kaçınılmaz bir sonu olmadığı vurgulanmaktadır. Nöronal disfonksiyon ve hücre ölümü bu hastalıkların anahtar olaylarıdır. Bunun yanı sıra reaktif oksijen türlerinden (ROS) ve azot türlerinden (RNS) kaynaklanan oksidatif stresin, bu bozukluğun ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Broom, Shaw ve Rucklidge, 2019; Fish vd., 2019).

A β peptidi ilk olarak 1984'te meningovasküler amiloidin birincil bileşeni ve daha sonra amiloid nevritik plaklarda ana bileşen olarak tanımlanıp; sonraki on yıllar boyunca, bu peptidin altta yatan biyolojisini ve AH patofizyolojisindeki rolünü açıklığa kavuşturmak için muazzam araştırma çabaları harcanmıştır. A β , β -amiloid öncü proteininin (APP) β -sekretaz ve γ -sekretaz ile sırayla bölünmesiyle üretilir. γ -sekretaz kompleksi presenilin (PSEN), presenilin arttırıcı (PEN), anterior farinks defektli (APH) ve nicastrin (NCT) olmak üzere dört protein alt biriminden oluşur. A β peptitleri, AH beyinde saptanabilen yüksek dereceli oligomerler, protofibriller ve fibriller formunda β yapraklı konformasyonlarda birikmeye eğilimlidir (Long ve Holtzman, 2019).

Semptomatik AH'de global aktivitelerde bilişsel bozukluk ve disfonksiyonun yönetimi için şu anda FDA onaylı dört ilaç bulunmaktadır. Bunlar arasında üç kolinesteraz inhibitörü (ChEI; galantamin, donepezil ve rivastigmin) ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör modülatörü olan memantindir. Aslında bu onaylanmış ilaçların (galantamin, donepezil, takrin ve rivastigmin) çoğunluğu, beyindeki etkili bilişsel aktiviteler için önemli olan kimyasal habercilerin bozulmasını önleyerek doğrudan kolinesteraz enzim inhibitörleri olarak işlev görürler. Ancak günümüzde etkili bir tedavi mevcut değildir. Bu birçok deneme başarısızlığı, AH'de klinik deneme tasarımına farklı yaklaşımlar gerektiğini vurgulamaktadır (Long ve Holtzman, 2019; Masondo vd., 2019).

AH hastalarının beyinde bulunan nörotransmitter değişikliklerinden biri, kolinerjik belirteçler kolin asetiltransferaz (ChAT) ve asetilkolinesterazın (AChE) kaybıdır. Asetilkolin (ACh)'in parçalanmasında anahtar enzim olarak bilinen AChE'nin inhibisyonu, AH tedavisi için umut verici bir yaklaşım olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların beyindeki nörotransmitter kimyasallarının yukarı regülasyonu yoluyla AH ile ilişkili semptomları geçici olarak iyileştirdiği bilinmektedir (Masondo vd., 2019; Talesa, 2001).

Diğer yandan memantin, kısmi bir N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistidir ve NMDA reseptöründeki glutamaterjik iletimin sinyal-cevap oranını iyileştirmek için işlev görmektedir. AH tedavisinde AChE inhibitörünün ana dezavantajı, maksimum 12-24 ay süren orta ve geçici faydasının olmasıdır. Bununla birlikte, bir ilaç hedefi olarak, AChE inhibitörleri, uzun vadede bilişsel veya fonksiyonel kapasitelerdeki düşüş oranını azaltmamaktadır (Masondo vd., 2019).

Amaryllidaceae familyasındaki bitkilerden izole edilen galantamin, bilinen bir alkaloittir ve AH'nin nörolojik dejenerasyon sürecini yavaşlatmak için kullanılan önemli bir terapötik seçenek haline gelmiştir (Eckert, 2010).

2.8. Antimikrobiyal Araştırmalarının Önemi

Artan antibiyotik direnci ve yeni antimikrobiyallerin azlığı uzun zamandır kabul edilmektedir. Küresel sağlık hizmetlerinde karşılaşılan en büyük zorluk, özellikle ölümlerin yarısının bulaşıcı hastalıklardan kaynaklandığı düşünüldüğünde, mikrobiyal enfeksiyonları tedavi etmek için yeni, etkili ve uygun fiyatlı ilaçlara duyulan ihtiyacın her geçen gün artması ve bu ihtiyacın karşılanamamasıdır. Çok sayıda tıbbi bitki, bakteriyel

enfeksiyonların tedavisinde potansiyel olarak etkili olabilecek doğal kaynaklar kabul edilmiştir (Elisha vd., 2017; Manandhar, Luitel ve Dahal, 2019).

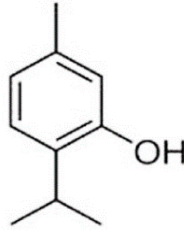
Birçok bitki, bitkinin sekonder metabolizmasında sentezlenen fitokimyasallara bağlı (bunlar tanenler, alkaloidler, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler) antimikrobiyal olarak kullanılmıştır. Bazı kaynaklarda, gıda zehirlenmeleri, idrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal bozukluklar, solunum yolu hastalıkları ve kutanöz enfeksiyonların tedavisinde kullanılan çeşitli tıbbi bitkilerden bahsedilmiştir (Manandhar, Luitel ve Dahal, 2019).

Literatürde, kekik yağının *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Pimenta racemosa* ve *Eugenia caryophyllata* yağlarının *Escherichia coli*'ye karşı çok etkili olduğu bildirilmiştir (Falcone vd., 2005).

2.9. Timol ve Karvakrolün Biyolojik Aktiviteleri

Timol ve karvakrol, biyolojik aktiviteleri *in-vitro* ve *in-vivo* şartlarda yapılan çalışmalarda tespit edilmiş olan en önemli sekonder metabolitler arasında (fenolik bileşikler) yer almaktadır (Marchese vd., 2016).

Timol (2-izopropil-5-metilfenol) (Şekil 2.5); Lamiaceae familyasına ait bitkilerden elde edilen ve *Thymus vulgaris* L., *Ocimum gratissimum* L., *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. *eu-ciliatus*, *Satureja thymbra* L., *Thymus zygis* L., *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague, *Carum copticum* L., *Satureja intermedia* C. A. Mey., *Thymbra capitata* (L.) Cav., *Lippia multiflora* Moldenk, *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus*, *Zataria multiflora* Boiss., *Satureja hortensis* L., *Centipeda minima* (L.) A. Br. gibi bitkilerin uçucu yağlarında bulunan ana monoterpen fenoldür. *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), *Euphrasia rostkoviana* Hayne (Scrophulariaceae), *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) ve *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae) gibi diğer türlerde de bulunur. Timolün antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar, antioksidan, antimutajenik, larvasidal, analjezik, antimikrobiyal, akarisidal, antikonvülsan, antiepileptojenik, yara iyileştirici, antihemolitik, antiflojistik, antileishmanial ve radyoprotektif özellikleri birçok çalışmada araştırılmıştır (Nagoor Meeran vd., 2017). Yukarıda sayılan türlerden elde edilen uçucu yağlar, antik çağlardan beri antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri sayesinde koruyucu ve ayrıca lezzet verici maddeler olarak kullanılmaktadır (Marchese vd., 2016). Timolün bazı biyolojik aktivite örnekleri Tablo 2.4'te sıralanmıştır.



Şekil 2.5. Timolün molekül yapısı

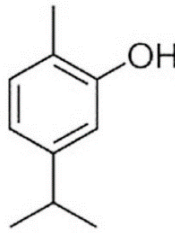
Tablo 2.4. Timolün biyolojik aktiviteleri (Marchese vd., 2016)

	Timolün biyolojik aktivitesi	Test edilen konsantrasyonlar
1	Timolün; domuz yağı ve ayçiçek yağının saflaştırılmış bir triaçilgliserol fraksiyonundan, lipit sisteminde <i>in vitro</i> antioksidan aktivitesi.	Domuz yağı ve Ayçiçek yağı triaçilgliserol; %0,02; 0,05; 0,10 ve 0,20
2	Timol, insan nötrofillerinin elastaz salgısına müdahale ederek kalsiyum girişini inhibe eder ve böylece elastaz salgısında bir azalmaya neden olur.	10 ve 20 µg/mL
3	Kemirgenlerde antienflamatuar aktivite ve sikatatize edici aktivite: Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin, toplam hücre sayısının ve histolojik analizin değerlendirilmesine göre timol, ödemi önemli şekilde azaltmaktadır. Yaralar, yüksek yara retraksiyon oranları göstermekte ve granülasyon reaksiyonunu geliştirmektedir.	10, 30 ve 100 mg/kg. Yara iyileşme potansiyeli analiz edildi. Timolün kollajen bazlı pansuman filmlerine dönüştürülmesi
4	Antinosiseptif ve lokal anestezik etkiler: Timol, voltajla çalışan sodyum kanallarını bloke ederek etki eder.	104 ve 149 µmol
5	İzole sıçan aortunda vazorelaksan etkiler: Timol, sarkoplazmik retikulumdan Ca ²⁺ salınımını inhibe ederek, kasların Ca ²⁺ 'ya duyarlılığını azaltarak ve Ca ²⁺ 'nın membran boyunca akışını bloke ederek, sıçan izole aortunda endotelyumdan bağımsız bir gevşeme indükleyebilir.	300 ve 1000 µM
6	Antikanser etkisi: Timol, hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi yoluyla insan mide kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesi göstermiştir.	100, 200 ve 400 µM

Karvakrol (2-metil-5-(1-metil etil)-fenol) (Şekil 2.6); timolün bir izomeridir ve vanilin, öjenol, gayakol ve zingeron gibi monoterpenoid fenol türevidir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada, antibakteriyel, antioksidan, antiseptik, antispazmotik, büyüme

destekleyici, antifungal, antiviral, antienflamatuar, ekspektoran, antitussif, immünomodülatör ve kemopreventif olmak üzere çeşitli biyoaktivitesi olduğu gösterilmiştir (Alagawany, 2015; Mbese ve Aderibigbe, 2018).

Karvakrol, kekik türlerinin uçucu yağlarının önemli bir bileşimidir. Karvakrol içeren cinsler arasında, *Origanum*, *Thymbra*, *Thymus*, *Satureja*, *Coridothymus* ve Verbenaceae familyasının *Lippia* cinsinde bulunur. *Origanum* türleri, dünya çapında ticareti yapılan kekiklerin en büyük kısmını oluşturur. Türkiye'nin karvakrol açısından zengin *Origanum* taksonları Tablo 2.5'te gösterilmiştir (Alagawany, 2015; Baser, 2008).



Şekil 2.6. Karvakrolün molekül yapısı

Tablo 2.5. Karvakrolce zengin *Origanum* taksonları (Baser, 2008)

Takson	Yağ Verimi (%)	Karvakrol (%)
<i>O. majorana</i> L.	5,2-7,8	32-84
<i>O. onites</i> L.	1,1-4,7	67-82
<i>O. minutiflorum</i> O. Schwarz et. P.H. Davis	1,1-3,8	42-82
<i>O. vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i>	1,1-6,5	23-79
<i>O. syriacum</i> L. var. <i>bevanii</i> (Holmes) letsw.	0,4-3,7	43-79
<i>O. acutidens</i> (Hand.-Mazz.) letsw.	1,4	63-66
<i>O. bilgeri</i> P. H. Davis	1,3	66
<i>O. hypericifolium</i> Schwarz et Davis	0,9-2,5	34-64
<i>O. x intercedens</i> (<i>O. onites</i> ve <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> 'un doğal hibriti)	4,3	46
<i>O. x adanense</i> (<i>O. laevigatum</i> ve <i>O. bargyli</i> 'nin doğal hibriti)	0,2	17
<i>O. bargyli</i> Mouterde	1,1	15

Elde edilen etnobotanik bilgilere göre, Türkiye'de mide ağrısı ve soğuk algınlığı için kekik infüzyonu kullanılır veya karın ağrısına karşı oral yolla tüketilir. Hücre geçirgenliğinin artması ve hücre bileşenlerinin sızmasından kaynaklı karvakrol gibi uçucu yağların antibakteriyel aktivitesi, hidrofobikliklerinden kaynaklanmaktadır. Bakteriler; hücre bileşenlerinin kaybı, hücre zarının hasarının şiddetinden etkilenir ve

hücre zarının bozulması ile bakteri hücresinin yapısal makromolekül sentezi ve ATP üretimi gibi hayati fonksiyonları engellenir (Baser, 2008; Mbese ve Aderibigbe, 2018).

Karvakrolün antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili çalışmalar sonucunda, gıda bozulmaları veya patojenik mantarlar, maya ve bakterileri, insan ve hayvan patojenik mikroorganizmaları, bitki patojen mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu tür mikroorganizmalar arasında *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (O157:H7), *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kloeckera apiculata*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Microsporum canis*, *Mucor sp.*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium roquefortii*, *Pichia membranea*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas vulgaris*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisia*, *Salmonella aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Shigella boydii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Trichoderma viride*, *Trichophyton mentagrophytes* sayılabilir (Baser, 2008).

2.10. YPİTK ve İTK Teknikleri

Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (YPİTK), ince tabaka kromatografi (İTK) tekniğinin daha iyi ve gelişmiş ayırma verimliliği ve algılama limitleri ile modern bir uyarlamasıdır. YPİTK ve İTK tekniklerinin özellikleri Tablo 2.6'da karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 2.6. İTK ve YPİTK tekniklerinin özellikleri (Shivatare, Nagore ve Nipanikar, 2013)

Parametre	İTK	YPİTK
Teknik	Manuel	Enstrümental
Verim	Daha Az	Yüksek (partikül boyutu küçük olması nedeniyle)
Katman	Laboratuvar Yapımı/ Önceden Kaplanmış	Önceden Kaplanmış
Ortalama Parçacık Boyutu	10-12 µm	5-6 µm
Tabaka Kalınlığı	250 µm	100 µm
Plaka Yüksekliği	30 µm	12 µm

Tablo 2.6. (Devam) İTK ve YPİTK tekniklerinin özellikleri (Shivatara, Nagore ve Nipanikar, 2013)

Parametre	İTK	YPİTK
Katı Destek	Silika Jel, Alümina, Kiesulguhr	Silika Jel-Normal Faz, C8 ve C18-Ters faz
Örnek Tespit	Manuel Tespit (Kapiler/Pipet)	Otomatik Numune Alma Cihazı (Şırınga)
Örnek hacim	1-5 µL	0,1-0,5 µL
Numune uygulama	Dairesel (2-4 mm Çap)	Dikdörtgen (6 mm U×1 mm G)
Ayrım	10-15 cm	3-5 cm
Ayrırma Zamanı	20-200 Dakika	3-20 Dakika
Plaka başına örnek paletler	≤10	≤36 (72)
Tespit Sınırları (Emilim)	1-5 pg	100-500 pg
Saptama sınırları (Floresan)	50-100 pg	5-10 pg
PC bağlantısı, Yöntem Depolama	Hayır	Evet
Validasyon, Nicel Analiz, Spektrum Analizi	Hayır	Evet
Analiz Süresi	Yavaş	Yürüme mesafesi ve analiz süresi büyük ölçüde azalır.
Dalga boyu aralığı	254 veya 366 nm, Görünür bölge	190 veya 800 nm, Monokromatik
Tarama	Sistem için mümkün değil	UV/görünür bölge/floresanın tarayıcı, kromatogramları kalitatif ve kantitatif olarak tarar ve bu tarayıcı gelişmiş bir densitometre türüdür.

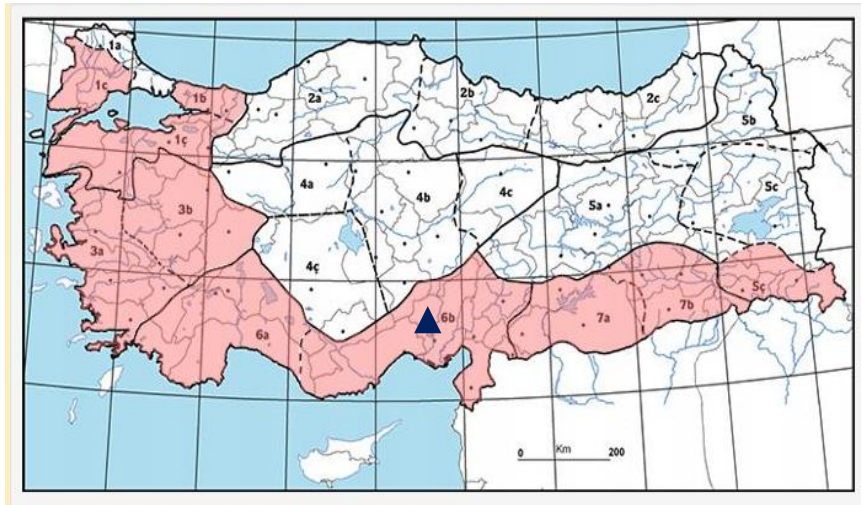
3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan *Lagoecia cuminoides* L. bitkisi meyvelenme döneminde Antalya, Aksu, Topallı-Kurşunlu arası, tarla açıklıklarında, 08/05/18 tarihinde toplanmıştır. Bitkinin tayini Dr. İ. Gökhan Deniz tarafından yapılmış olup (Kod: 6763 Akdeniz Üniversitesi Eğitim Fakültesi (AKDE) Herbaryumunda kayıtlıdır. Toplanan bitkisel materyal serin, havadar ortamda kurutulmuştur (Şekil 3.1). Bitkinin toplanma bölgesi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kurutulmuş *Lagoecia cuminoides* L. bitkisi



Şekil 3.2. *L. cuminoides* örneğinin toplanma bölgesi: (Δ) Antalya Bölgesi (6b) (<http-7>)

3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri Tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri

Kimyasal madde ve çözücü	Kimyasal Formülü	Kaynak
ABTS, 2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)	C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄	Sigma-Ald., Almanya
AChE, asetilkolinesteraz (<i>Electrophorus electricus</i> 'tan)	-	Sigma-Ald., Almanya
Alüminyum klorür	AlCl ₃	Merck, Almanya
Asetik asit	CH ₃ COOH	Sigma-Ald., Almanya
Aseton	C ₃ H ₆ O	Panrae, İspanya
ATCI, asetiltiyokolin iyodür	-	Sigma-Ald., İngiltere
BHT, butil hidroksi toluen, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	Sigma-Ald., Almanya
Boron triflorür	BF ₃	Merck, Almanya
BSA, bovine serum albümin (Sığır serum albumini)	-	Sigma-Ald., ABD
<i>Candida albicans</i>	-	ATCC® 10231™
Columbia Agar w/%5 Sheep Blood	-	BD™
Dietil eter	C ₄ H ₁₀ O	J.T. Baker, Hollanda
DMSO, dimetil sülfoksit	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Ald., ABD
DPPH, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma-Ald., ABD
DTNB, 5,5’-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit, Ellman reaktifi	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	Sigma-Ald., ABD
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	ATCC® 29212™
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC® 25922™
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Sigma-Ald., Almanya
Etil asetat	C ₄ H ₈ O ₂	Sigma-Ald., Almanya
FCR, Folin-Ciocalteu reaktifi	-	Sigma-Ald., İsviçre
Gallik asit	C ₇ H ₆ O ₅	Sigma-Ald., Çin
<i>n</i> -Hekzan	C ₆ H ₁₄	Merck, Almanya
Hidroklorik asit	HCl	Sigma-Ald., Almanya
Kalsiyum klorür	CaCl ₂	Fluka, Almanya
Kloroform	CHCl ₃	Sigma-Ald., Fransa
Kersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Sigma-Ald., Almanya
Magnezyum klorür heksahidrat	MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma-Ald., ABD

Tablo 3.1. (Devam) Kullanılan kimyasal madde ve çözücülerin bilgileri

Kimyasal madde ve çözücü	Kimyasal Formülü	Kaynak
Metanol	CH ₃ OH	Sigma-Ald., Polonya
0,5 McFarland standart	-	Thermofischer Scientific,
Mueller Hinton Agar	-	Merck Millipore
Mueller Hinton Broth	-	Merck Millipore
Potasyum persülfat	K ₂ S ₂ O ₈	Sigma-Ald., Almanya
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC® 27853™
Sodyum fosfat dibazik dihidrat	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	Sigma-Ald., ABD
Sodyum hidroksit	NaOH	Merck, Almanya
Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	Merck, Almanya
Sodyum klorür	NaCl	Riedel de Haen, Almanya
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	ATCC® 29213™
Susuz sodyum sülfat	Na ₂ SO ₄	Sigma-Ald., Almanya
TRİS (hidroksimetil) aminometan, 2-Amino-2- hidroksimetil-propan-1,3-diol	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Sigma-Ald., ABD
Troloks	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Sigma-Ald., Almanya
YPD Broth	-	Sigma

3.3. Cihazlar ve Apareyler

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihaz ve apareylerin bilgileri Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2. *Kullanılan cihaz ve apareylerin bilgileri*

Cihaz ve aparey adı	Cihaz ve aparey bilgileri
Bio-II-A/G Güvenlik Kabini	Telstar
Buzdolabı (-20 ve +4)	Bosch
Clevenger	İLDAMCAM, EP’ye uygun
Çoklu Plaka Okuyucu	Thermo Multiscan&Go
Etüv	WTB Binder
Forseps ve kavisli forseps	Iso Lab
Geri Çeviren Soğutucu	İldamCam
GK/ÅİD	Agilent 6890N (SEM Ltd., İstanbul, Türkiye)
GK/KS sistemi	Agilent 5975 (USA; SEM Ltd., İstanbul, Türkiye)
Hassas Terazı	Metler Toledo, NewClassic MS
İnkübatör	Incucell
Işık Mikroskobu	Zeiss
96-kuyucuklu eliza plakları	Iso Lab, Katalog no: 122.01.096
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 2,5 Litre Tezgahüstü Dondurularak Kurutma Sistemi.
Manyetik karıştırıcı	IKO KS260
Mikroplak okuyucu	Biotek Powerwave XS, ABD
Otoklavlanabilir Mikropipetler	0,5-10 µL/2-20 µL/20-100 µL/100-1000 µL, Iso Lab
Otoklav	Astell
Otomatik pipetör	8-12 kanallı Eppendorf Research plus
pH Metre	WTW grup, InoLab, pH 7,2
Rotavapor sistemi	Heidolph, Laborota 4010-Digital
SK-KS/KS sistemi	20A YPSK sistem, Shimadzu ve Uygulamalı Biyosistemler 3200 Q-Trap instrument, negatif iyon modda çalışan donanımlı ESI kaynağı, Absciex 3200 Q trap KS/KS dedektör.
Ultrasonik su banyosu	Elma, S100H
Vorteks	Heidolph
YPİTK daldırma aygıtı	CAMAG
YPİTK görüntüleyici	CAMAG Reprostar 3
YPİTK immersiyon sistemi	CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC2)
YPİTK otomatik örnek uygulayıcısı	CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS4)

3.4. Uçucu Yağ Eldesi

Kurutulmuş bitkisel materyal; kök ve sap kısmından ayrıldıktan sonra, *L. cuminoides* 'in meyveleri havanda dövülerek Avrupa Farmakopesine uygun Clevenger apareyinde hidrodistilasyonla (3 saat) uçucu yağı elde edilmiştir (Ph. Eur.) (Şekil 3.3). Elde edilen uçucu yağın nemi susuz sodyum sülfat (Na_2SO_4) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Uçucu yağın verimi hesaplanmıştır. Yağ örneği amber cam vialle aktarılarak buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Bitkisel materyalin (meyve) Clevenger apareyinde hidrodistilasyonu

3.5. Sabit Yağ Asitlerinin Eldesi ve Metillenmesi

Kurutulmuş bitkisel materyalin meyve kısmı, havanda dövülerek ekstraksiyon için hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Havanda dövülen bitkisel materyalin lipidlerini ekstre etmek amacıyla Folch metodu kullanılmıştır (Folch, Lees ve Sloane Stanley., 1957).



Şekil 3.4. *L. cuminoides* meyve kısımlarının ekstraksiyona hazırlanması

Bitkisel materyal, $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, *h/h*) çözücü karışımıyla 24 saat, oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde maserasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Bitkisel materyalin (meyve) $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, *h/h*) ile çalkalayıcıda maserasyonu

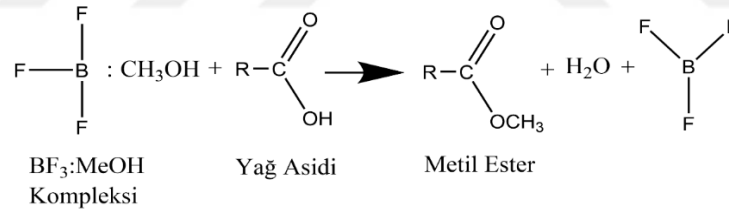
Bitkisel materyal $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1, *h/h*) çözücü karışımı ile tekrar masere edilmiştir (30 dakika×2). Elde edilen ekstreler birleştirilip pileli süzgeç kağıdından süzülmüştür. İşlem sonunda filtrattan çözücü rotavaporda uzaklaştırılmıştır (toplam hacmin yarısı kalana kadar). Kalan ekstrenin hacmi kadar üzerine saf kloroform ilave edilmiştir. Ekstreği lipidler dışındaki (protein, karbonhidrat gibi) kirliliklerden arındırmak için ayırma hunisinde %0,4'lük CaCl_2 çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır (Şekil 3.6). Yıkama sonunda kloroformlu ekstrenin içinde eser miktarda kalmış olan suyun uzaklaştırılması amacıyla ekstre, susuz sodyum sülfattan geçirilmiştir. Bu şekilde elde edilen ekstre, bağlı ve serbest haldeki yağ asitleri içeren total lipid fraksiyonudur. Elde edilen ekstreden kloroform rotavaporda uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Ekstre saflaştırma çalışması: %0,4'lük CaCl_2 çözeltisi ile yıkama işlemi

Daha sonra elde edilen kuru ekstre sabunlaştırma (saponifikasyon) işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla kuru ekstre üzerine KOH:H₂O:CH₃OH (1:1:8, h/h/h) karışımı eklenerek dibi yuvarlak balona aktarılmıştır ve geri çeviren soğutucu altında 2 saat kaynatılmıştır. Bağlı ve serbest haldeki yağ asitleri, KOH'un oluşturduğu bazik ortamda yağ asitlerinin tuzlarına dönüşür. Süre sonunda karışıma 1-2 mL *n*-hekzan eklenerek ayırma hunisine aktarılmıştır. Ayırma hunisinde saponifike olmayan kısım hekzanla uzaklaştırılmıştır. Ayırma hunisinde kalan sulu fazın üzerine %15'lik HCl pH 2-3 olana kadar eklenmiş ve yağ asitlerinin tuzlarından serbest yağ asitleri elde edilmiştir. Serbest yağ asitlerini saf elde etmek için, sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için ayırma hunisinde sulu kısım dietil eter ile 3 kez ekstre edilmiştir. Dietil eterli fraksiyonlar birleştirilmiş ve rotavaporda dietil eter uzaklaştırılmıştır. Kuru bakiye tartılarak serbest yağ asitlerinin verimi kuru bitki üzerinden % olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen yağ asitleri, Boron triflorür reaktifi ile metilleme işlemine tabi tutulmuştur (Godswill vd., 2014). İşlem sırasında gerçekleşen tepkimenin şeması Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Elde edilen serbest yağ asitleri metil esterleri amber cam vialde buzdolabında GK-KS/AİD analize kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.7. Yağ asitlerinin Boron triflorür reaktifi ile metillenme tepkimesi (<http://9>)

3.6. Ekstrelerin Elde Edilmesi

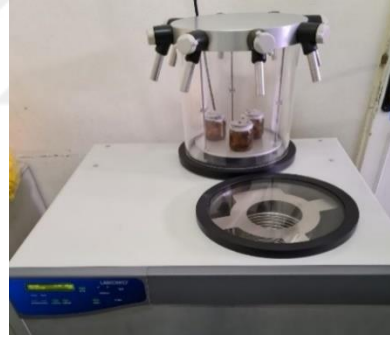
Kurutulmuş bitkisel materyal (meyve, yaprak, kök) uygun boyuta getirilerek %60'lık metanol ile çalkalayıcıda masere edilmiştir (24 saat×3) (Şekil 3.8). Süre sonunda ekstraler pileli filtre kağıdı kullanarak süzölmüştür ve organik çözücü (metanol) rotavapor ile uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.9). Çözücü uzaklaştırma işleminden sonra ekstrelerde kalan su ise liyofilizatörde uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.8. Bitkisel materyallerin (meyve, yaprak, kök) %60'lık metanol ile çalkalayıcıda maserasyonu



Şekil 3.9. Ekstrelerden rotavapor ile çözücü uzaklaştırma işlemi



Şekil 3.10. Ekstrelerin liyofilizasyonu

3.7. Uçucu Yağların, Sabit Yağ Asitlerinin ve Ekstrelerin Kromatografik Analizleri

3.7.1. Uçucu yağların ve sabit yağ asitlerinin GK/KS ve GK-AİD analizleri

Uçucu yağ ve sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonları GK/KS ve GK-AİD teknikleriyle aydınlatılmıştır (Şekil 3.11). Her iki analiz için de HP-Innowax FSC kolonu (60 m×0,25 µm, 0,25 µm film kalınlığı, Agilent, Walt&Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA) ve taşıyıcı gaz olarak helyum gazı kullanılmıştır. Fırın 60°C'de 10 dakika kaldıktan sonra 220°C'ye dakikada 4°C ile çıkıp, 220°C'de 10 dakika kalıp, 240°C'ye dakikada 1°C ile çıkmak üzere programlanmıştır. Split oranı 40:1 olarak seçilmiştir. Alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250°C'de tutulmuştur. Kütle spektrumu 70 eV, kütle

menzili 35-450 m/z seçilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında tutunma zamanları ve kütle spektrumları standartlara ve literatür bilgilerine paralel olarak değerlendirilmiştir. Wiley GC/MS Library (Wiley, New York, NY, USA), MassFinder software 4,0 (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg), Adams Library, NIST (National Institute of Standards and Technology) Library ve Başer Library of Essential Oil Constituents kaynak olarak kullanılmıştır. Madde miktarlarının belirlenmesinde alev iyonlaşma dedektöründen elde edilen piklerin yüzde alanları kullanılmıştır.



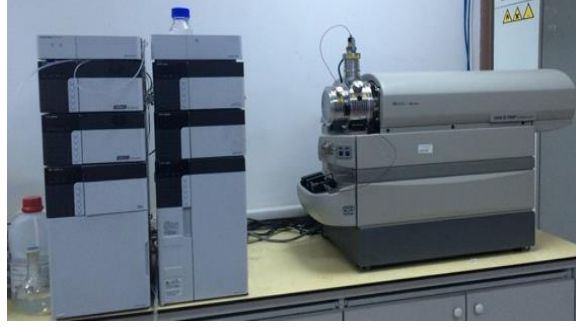
Şekil 3.11. GK-AİD/KS sistemi

3.7.2. Ekstrelerin SK-KS/KS analizi

Ekstrelerin kimyasal kompozisyonu SK-KS/KS tekniği ile incelenmiştir (Şekil 3.12). Bu amaçla ekstrelerin çözeltileri 10 mg/mL olarak hazırlanmış ve sisteme enjekte edilmiştir. Sıvı kromatografi analizi Tablo 3.3'te belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. SK-KS/KS analiz şartları

Sistem	Shimadzu 20A HPLC-ABSciex 3200 Q trap MS/MS
Metod	Negatif İyonlaşma Metodu
Kolon	GL Science Intersil ODS 4,6×250 5µm
Kolon Sıcaklığı	40°C
Hareketli Faz	(A) Su: Asetonitril: Formik asit (89:10:1, h/h/h) (B) Asetonitril: Su: Formik asit (89:10:1, h/h/h) B çözücüsünün konsantrasyonu %10'dan başlanarak 40 dk.'da %100 olacak şekilde gradienti ayarlanmıştır.
Akış Hızı	0,5 mL/dk



Şekil 3.12 SK-KS/KS sistemi

3.8. Ekstrelerin Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanarak spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Deneyde, 96-kuyucuklu mikroyağa 20 µL numune çözeltisi (1 mg/mL, %10 DMSO'lu metanol) üzerine, 1,56 mL saf su ve 300 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. 1-8 dakika beklendikten sonra 300 µL %20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilip, 2 saat 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) kullanarak derin kuyucuktaki karışımdan 300 µL 96-kuyucuklu mikroyağa aktarılıp 760 nm'de absorbans ölçümleri alınmıştır. Deneyde gallik asit kalibrasyon eğrisi farklı konsantrasyondaki çözeltileri kullanarak (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL) elde edilmiştir. Sonuçlar 3×3 tekrar üzerinden değerlendirilmiştir (Singleton, Orthofer ve Lamuela-Raventos, 1999; Koşar, Göger ve Başer 2008). Kalibrasyon eğrisi denklemi kullanarak ekstrelerdeki toplam fenol miktarı, g ekstrede mg gallik asite eşdeğer olarak (mgGAE/gekstre) hesaplanmıştır.

Reaktiflerin Hazırlanması:

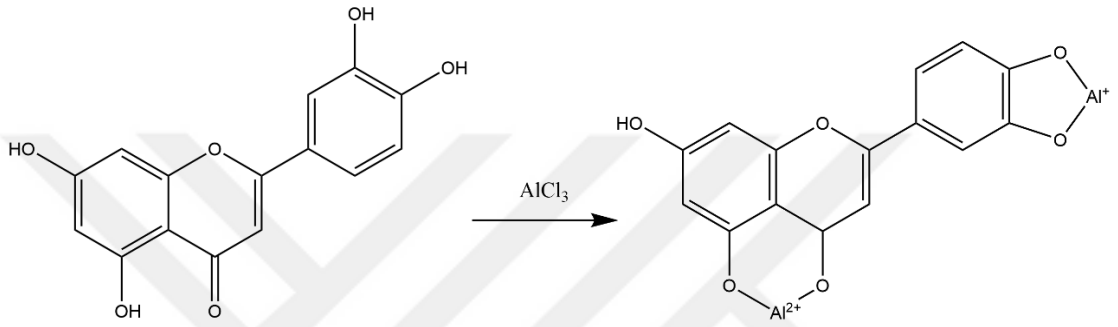
Sodyum karbonat çözeltisi (%20): 20 g Na₂CO₃ tartılıp 100 mL suda çözölmüştür.

Gallik asit çözeltileri (1-0,1 mg/mL): Maddenin 1 mg/mL'lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

3.9. Ekstrelerin Toplam Flavonoid Miktar Tayini

Ekstrelerdeki toplam flavonoid miktarı rutin ve kersetine eşdeğer miktarları üzerinden AlCl₃ reaktifi kullanılarak tayin edilmiştir. 96-kuyucuklu mikroyağa 80 µL numune (1 mg/mL, %10 DMSO'lu metanollü uçucu yağ/ekstre/standart flavonoid) üzerine sırasıyla 80 µL AlCl₃ çözeltisi ve 1,84 mL absöü etanol eklenmiştir. Kör deneyde 80 µL numune üzerine AlCl₃ yerine 10 µL asetik asit (%15) ve 1,84 mL absöü etanol ilave edilmiştir. Plaklar karanlıkta 25°C'de 40 dk bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuktaki

karışımdan 300 µL alınarak 96-kuyucuklu mikroyuğa aktarılıp plak okuyucuda absorbans değerlerinin 415 nm’de okuması yapılmıştır. Standart flavonoid olarak kullanılan rutin ve kersetin için kalibrasyon eğrisi çizilerek denklem ve R² değerleri elde edilmiştir. Deney 3×3 tekrar yapılarak sonuçlar hem rutine hem kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Koşar, Göger ve Başer, 2011). Deneyde yer alan tepkime mekanizması Şekil 3.13’te gösterilmiştir (Miliauskas, Venskutonis ve Beek, 2004; Koşar, Göger ve Başer, 2008).



Şekil 3.13. Flavonoid ve AlCl₃ reaktifi arasında gerçekleşen tepkime

Reaktiflerin Hazırlanması:

Aluminyum klorür (%2): 2,0 g susuz AlCl₃ tartılarak 100 mL suda çözülmüştür.

Asetik asit (%15): 15 mL asetik asit üzerine 85 mL ultra saf su eklenmiştir.

Rutin (1-0,1 mg/mL): Maddenin 1 mg/mL’lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL’lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

Kersetin (1-0,1 mg/mL): Maddenin 1 mg/mL’lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 mg/mL’lik konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

3.10. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.10.1. Antioksidan aktivitenin incelenmesi

3.10.1.1. Troluks’a eşdeğer antioksidan kapasitenin incelenmesi

Numunelerin ABTS^{•+} serbest radikal katyonunu süpürme aktivitesi Re vd. (1999) tarafından tanımlanmış prosedüre göre test edilmiştir. Standart antioksidan olarak Troluks (3; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,1 mg/mL), uçucu yağ ve ekstre numuneleri (10 mg/mL) %20 DMSO’lu metanol içerisinde hazırlanmıştır. Kontrol olarak ise numunelerin çözücüsü olan %20 DMSO’lu metanol kullanılmıştır. Deneyde, 10 µL numune 990 µL ABTS^{•+}

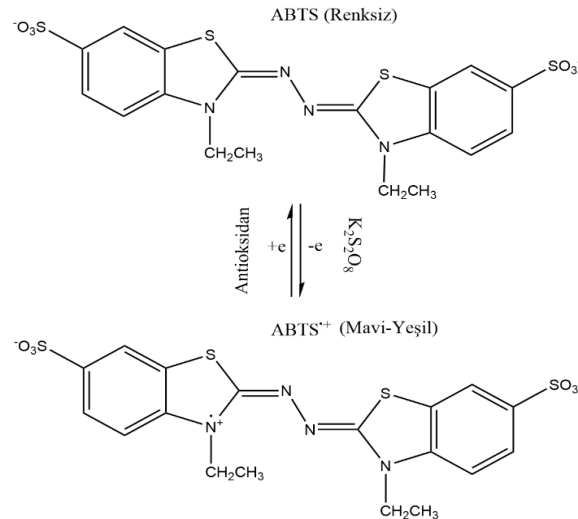
çözeltisi ile karıştırılıp 30 dakika karanlıkta inkübasyondan sonra karışımdan 300 µL alınarak 96-kuyucuklu mikrolak kuyucuklarına otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) yardımıyla aktarılmıştır. Absorbans değerleri 734 nm’de ölçülmüştür. Troloks’un belirli konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin verdiği absorbansa göre % inhibisyonu (%Inh.) aşağıdaki denkleme (3.1) göre hesaplanmıştır ve linear doğru denklemi elde edilmiştir. Bu doğru denklemi kullanılarak numunelerin Troloks’a eşdeğer olan antioksidan kapasiteleri tespit edilmiştir. Deney 3×3 tekrar yapılmıştır ve ortalama ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

$$\%Inh. = \left[\frac{Abs_{kontrol} - Abs_{numune}}{Abs_{kontrol}} \right] * 100 \quad (3.1)$$

Burada; $Abs_{kontrol}$ kontrolün absorbans değeri, Abs_{numune} numunenin absorbans değeridir.

Reaktifin hazırlanması:

ABTS reaktifi: 36 mg (7 mM) ABTS ve 6,6 mg (2,5 mM) $K_2S_2O_8$ ’den tartılıp 10 mL ultra saf suda çözeltisi hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 16 saat boyunca reaktifin aktif hale gelmesi için beklenmiştir. Potasyum persulfat ($K_2S_2O_8$) etkisi ile ABTS oksitlenmiş ve aktif $ABTS^{+•}$ serbest radikal katyonu oluşmuştur (Şekil 3.14).



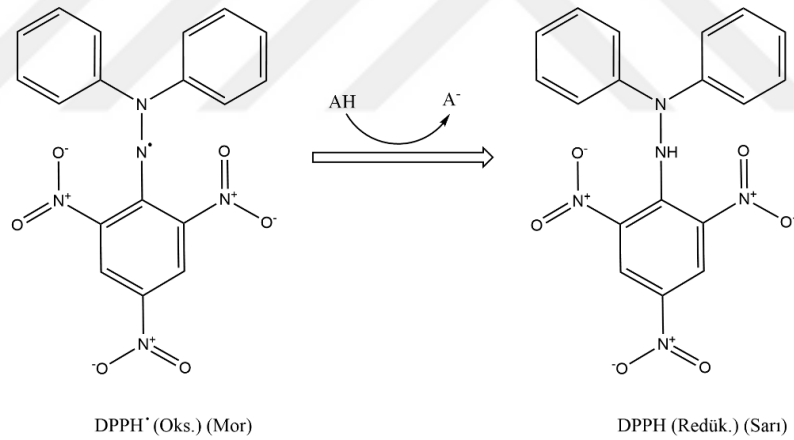
Şekil 3.14. Antioksidan ve $ABTS^{+•}$ katyon radikal arasındaki tepkime

Hazırlanan stok çözelti karanlık serin ortamda kapağı kapatılarak muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltilerden 1 mL alınarak spektrofotometrede 734 nm’de

ölçülen absorbansı 0,700-0,800 (0,758) arasında olana kadar 100 mL absölu etanol ile seyreltilmiştir.

3.10.1.2. DPPH[•] serbest radikalini süpürücü etkinin incelenmesi

Antioksidan aktivite değeriendirilmesi için kullanılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) serbest radikalini süpürücü etki deneyi; ilk kez 1958'de Blois tarafından uygulanmış olup, daha sonra araştırmacılar tarafından deneyin protokolünde modifikasyonlar yapılmıştır. Bu yöntem, elektron transferine dayalı olan antioksidan aktivite testlerinden biridir. DPPH[•], bir hidrojen atomu verebilen bileşiklerle reaksiyona giren kararlı bir serbest radikaldir. Bu yöntem antioksidan maddenin etkisi ile DPPH[•] serbest radikalının DPPH molekülüne indirgenmesine dayanır. Antioksidanın serbest radikal süpürücü aktivitesi 517 nm'de absorpsiyon değışimine göre değeriendirilir (Krishnaiah, Sarbatly ve Nithyanandam, 2011). Yöntemde yer alan tepkime şematik olarak Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Antioksidan ve DPPH[•] serbest radikalının arasındaki tepkime

Deneyde, teste tabi olacak uçucu yağ ve ekstre numunelerinin %20 DMSO'lu metanol içinde stok çözeltileri hazırlanmıştır (sırasıyla, 30 mg/mL ve 5 mg/mL). Numunelerin konsantrasyonları yarıya incek şekilde mikrodilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Standart olarak gallik asit çözeltilisi (1 mg/mL) kullanılmıştır. Deneyde, 96-kuyucuklu mikropiğin kuyucuğuna otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) yardımıyla 100 µL numune (uçucu yağ/ekstre/standart madde) çözeltilisi, kontrol olarak da numunelerin çözücüsü koyulmuştur. Her kuyucuğ 100 µL metanollü DPPH çözeltilisi (% 0,008) eklenmiş ve 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda

absorbans değerleri 517 nm’de ölçölmüştür. Reaksiyon sonunda absorbanstaki bir azalma numunenin serbest radikal süpürme aktivitesini göstermiştir. Sonuçlar 3×3 tekrar üzerinden hesaplanmıştır. Numunelerin DPPH’ serbest radikali süpürme etkilerini değerlendirmek için % inhibisyon (% Inh) değerleri denkleme (3.1) göre hesaplanmıştır. Daha sonra DPPH absorbansını yarıya indiren numunenin miktarına ait IC₅₀ değeri *SigmaPlot 12.0* programı kullanarak hesaplanmıştır ve sonuçlar mg/mL cinsinden belirlenmiştir.

Reaktiflerin hazırlanması:

DPPH çözeltisi (%0,008): 4 mg DPPH tartılmış ve 50 mL metanolde çözölerek amber renkli cam şişe içerisinde +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Gallik asit: 1 mg Gallik asit tartılmış ve 1 mL %20 DMSO’lu metanolde çözölümüştür.

3.10.1.3. YPİTK tekniği kullanılarak biyootografik yöntemle antioksidan aktivitenin incelenmesi

L. cuminoides bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi YPİTK tekniği kullanarak biyootografik yöntemle incelenmiştir (Rabel ve Sherma, 2017). Deneyde belirteç olarak DPPH reaktifi kullanılmıştır. Bu amaçla uçucu yağ ve ekstrelerin çözeltileri *n*-hekzan ve metanolde hazırlanmış olup (sırasıyla, 5 mg/mL ve 10 mg/mL), YPİTK plağı üzerine bant şeklinde uygulanmıştır. Kromatografik ayırım için silika jel 60 F₂₅₄ YPİTK plağı kullanılmıştır. Uçucu yağ ve ekstrelerdeki bileşiklerin kromatografik ayırımı için uygulanan şartlar ve kullanılan reaktifler hakkındaki bilgiler Tablo 3.4’te açıklanmıştır.

Deneyin birinci basamağında, uçucu yağ ve ekstrelerin ayırımını sağlayacak uygun hareketli fazlar seçilmiştir. Numunelerde bulunan bileşiklerin başarılı ayırımını gözlemlemek için uçucu yağlarda belirteç olarak, anisaldehit reaktifi ve UV ışığı; polar ekstrelerdeki ayrılan maddelerin belirlenmesi için, NPR-PEG reaktifleri ve UV ışık kullanılmıştır.

Deneyin ikinci basamağında, numunelerin plak üzerinde ayırımı sağlandıktan sonra antioksidan aktivitesi DPPH reaktifi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu uygulama sonunda plak yüzeyi mor renkli olurken, antioksidan aktif olan bileşiklere ait spotlar sarı renkli olmuştur. Aktif olarak tespit edilen spotlar işaretlenerek *R_f* değerleri saptanmıştır.

Deneyin üçüncü basamağında, numuneler plak üzerine şerit olarak uygulanarak bileşiklerin ayrımı aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Bir önceki deneyde tespit edilen *R_f* değerlerine göre aktif maddelerin şeritleri işaretlenmiş ve spatula ile kazınmıştır. Tüm aktif spotlar ayrı ayrı fraksiyon olarak eppendorf tüplerine toplanmış ve uygun çözücüyle re-ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar yoğunlaştırılıp GK-AİD/KS ve SK-KS/KS teknikleri ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstreleri için uygulanan YPİTK analiz şartları

İşlem	Reaktifler/Apareyler	Açıklama
Numune hazırlama	Uçucu yağ (5 mg/mL) hekzanda çözülmüştür. Polar ekstreler (10 mg/mL) metanolde çözülmüştür.	-
Plak	YPİTK Silika jel 60 F254, 10×10 cm	Merck
Hareketli faz	Uçucu yağ için hareketli faz A kullanılmıştır: n-Hekzan: Etil asetat (85:15. <i>h/h</i>) Polar ekstreler için hareketli faz B kullanılmıştır: Toluen: Etil asetat: Formik asit: Su (5:100:10:10, <i>h/h/h/h</i>)	-
Uygulama	5 µL bant olarak (bant genişliği 7 mm) 20 µL şerit olarak	CAMAG Automathic TLC Sampler 4 (Şekil 3.16)
Yürütme	70 mm	CAMAG ADC2 Automathic Developing Chamber (Şekil 3.17)
Kurutma	Hava, 1 dk	-
Belirteç	Uçucu yağ için anisaldehit reaktifi Polar ekstreler için UV ışığı (254, 366 nm) ve beyaz ışık NPR-PEG reaktifi	CAMAG Reprostar 3 (Şekil 3.18)
Daldırma Sistemi	Hız: 5. kademe Süre: 1 sn Tank: 20×10 cm	CAMAG Chromatogram Immersion Device III (Şekil 3.19)

Reaktiflerin hazırlanması:

Anisaldehit reaktifi: Anisaldehit (0,5 mL) glasiyel asetik asit ile (10 mL) karıştırılarak 85 mL metanol ve 5 mL derişik sülfürik asit ile hazırlanmıştır. Belirteç

uygulandıktan sonra plak 5 dk 100-105°C’de ısıtılmıştır. Oluşan renkler UV ve beyaz ışık altında incelenmiştir (Wagner ve Bladt, 1996).

NPR reaktifi: 1 g difenilborik asit-β-etilaminoester, 100 mL metanolde çözülmüştür. NPR belirteci uygulandıktan sonra plak 100-105°C’de ısıtılmıştır ve PEG reaktifi uygulanmıştır. Oluşan renkler UV (254, 366 nm) ve beyaz ışık altında incelenmiştir (Wagner ve Bladt, 1996).

PEG reaktifi: 5 g polietilen glikol-4000, 100 mL etanolde çözülmüştür. Belirteç uygulandıktan sonra plak 5 dk 100-105°C’de ısıtılmıştır. Oluşan renkler UV ve beyaz ışık altında incelenmiştir (Wagner ve Bladt, 1996).

DPPH reaktifi: 0,05 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, 100 mL metanolde çözülmüştür. Karanlıkta muhafaza edilmiştir. Plak üzerine reaktif uygulandıktan sonra, plak 15-30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda plak beyaz ışık altında incelenmiştir (http-10).



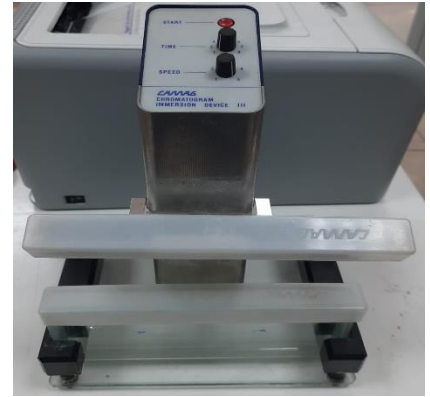
Şekil 3.16. CAMAG Automatic TLC Sampler 4



Şekil 3.17. CAMAG ADC2 Automatic Developing Chamber



Şekil 3.18. CAMAG Reprostar 3



Şekil 3.19. CAMAG Chromatogram Immersion Device III

3.10.2. Antidiyabetik aktivitenin değerlendirilmesi

α -Amilaz enzimi, karbonhidratların hidroliz sürecini katalize eden bir enzimdir. Ancak çeşitli doğal maddeler bu enzimin aktivitesini inhibe ederek polimer karbonhidratların parçalanmasını engeller. Böylece kandaki glukoz seviyesi artmamış olur. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının α -amilaz enzim inhibisyonunun (antidiyabetik etki) incelenmesi için Caraway-Somogyi iyodür/potasyum iyodür (I/KI) yöntemi kullanılmıştır (Yang vd., 2012). Deney için uçucu yağ ve ekstraların 1 mg/mL %10 DMSO'lu metanollü çözeltileri hazırlanmıştır. Pozitif kontrol için, standart inhibitör olan akarboz çözeltisi (1 mg/mL, tampon içinde) kullanılmıştır. Kontrol olarak %10 DMSO'lu metanol kullanılmıştır. Deneyde, 96-kuyucuklu mikropiçliğe otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) yardımıyla 25 μ L numune (uçucu yağ/ekstre/standart madde) çözeltisi ve 50 μ L α -amilaz (0,8 U/mL 20 mM fosfat buffer, pH=6,9) ilave edilmiştir. Karışım 10 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda, 50 μ L substrat (nişasta çözeltisi, %0,05) karışıma eklenmiştir. Karışım, 10 dakika boyunca 37°C'de ikinci bir inkübasyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon 25 μ L HCl (1 M) ilavesi ile durdurulmuştur. Son olarak kuyucuklara 100 μ L I/KI çözeltisi eklenmiştir. Absorbansları 630 nm'de mikropiçlik okuyucuyla okunmuştur.

Deney 3×3 tekrar yapılmıştır ve ortalama, standart sapmaları hesaplanmıştır. α -Amilaz aktivitesinin yüzde inhibisyonu (%Inh.) denkleme (3.1) göre hesaplanmıştır:

Reaktiflerin hazırlanması:

Tampon çözelti (pH 6,9): 0,185 g Na₂HPO₄ ve 0,150 g NaH₂PO₄ tartılıp 100 mL distile suda çözülmüştür. Çözeltinin pH değeri 6,9 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanmış tamponun üzerine 35 mg NaCl eklenmiştir.

Enzim (α -Amilaz): 1,23 mg domuz pankreasından α -amilaz (Type VI-B $\geq$ 10 unite/mg katı) tartılmıştır ve 20 mL tampon çözelti (pH 6,9) içinde çözülmüştür.

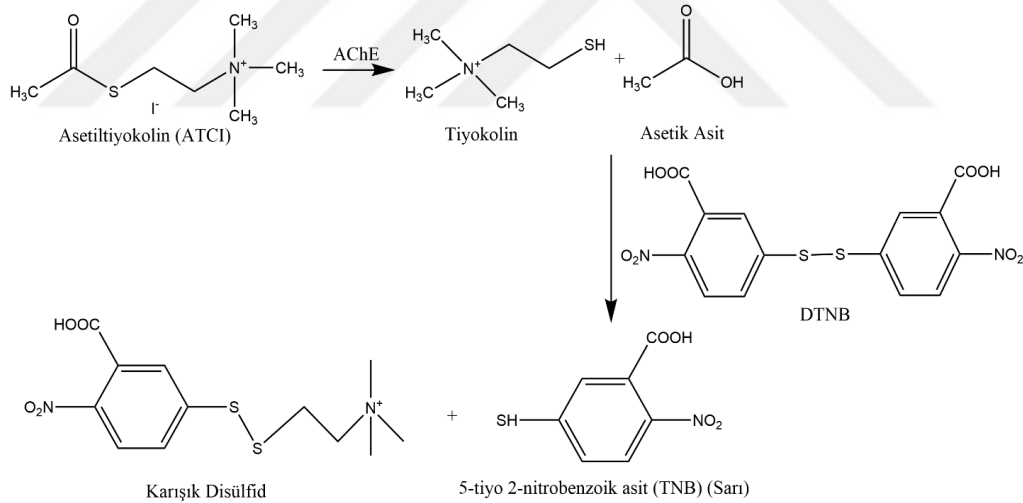
Substrat (Nişasta çözeltisi): Çözünür nişasta 0,02 g tartılarak 40 mL distile su içinde çözülmüştür ve 10 dk ısıtılmıştır. Hazırlanmış çözelti oda sıcaklığına gelene kadar soğutulmuştur.

Standart inhibitör (Akarboz çözeltisi): 1 mg akarboz tartılmış 1 mL ultra saf suda çözülmüştür.

Belirteç reaktif (İyot çözeltisi): 0,5 g iyot (I₂) ve 1,5 g potasyum iyodür (KI) tartılmış ve 50 mL distile suda çözülmüştür. Reaktif amber renkli cam şişe içinde muhafaza edilmiştir.

3.10.3. Antikolinesteraz aktivitenin değerlendirilmesi

Deney için uçucu yağ ve ekstrelerin 10 mg/mL % 20 DMSO'lu metanolün içinde çözeltileri hazırlanmıştır. Standart olarak galantamin çözeltisi (1 mg/mL) kullanılmıştır. Deneyde 96-kuyucuklu mikroyuvarla otomatik pipetör (8-kanallı, Eppendorf) yardımıyla 25 µL numune (uçucu yağ/ekstre/standart madde), 50 µL B tampon çözeltisi ve 25 µL AChE çözeltisi (Tampon çözelti A'da 0,22 U/mL) eklenerek 15 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 125 µL Ellman reaktifi DTNB (Tampon çözelti C'de 3,0 mM) ilave edilmiştir. Son olarak 25 µL substrat asetiltiyokolin iyodür (ATCI) (ultra saf su içinde 15 mM) eklenmiştir. Substratın eklenmesini takiben 15. dakikada 412 nm'de 96-kuyucuklu mikroyuvarla okuyucu ile absorbens değerleri kaydedilmiştir. AChE enzimi ile katalizlenen substrat ATCI'nın hidroliz reaksiyonu sonucunda tiyokolin ve asetik asit meydana gelmiştir. Tiyokolinlerin, Ellman reaktifi DTNB ile reaksiyonundan sarı 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşmuştur (Ellman vd., 1961). Deneyde gerçekleşen reaksiyonun şeması Şekil 3.20'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20. Ellman metodunda gerçekleşen renk reaksiyonu

Numuneden gelen rengi elimine etmek için “blank” testi yapılmıştır. Bu amaçla deneyin 0. dakikasında ve 15. dakikasında absorbens değerleri ölçülmüştür. 15. Dakikada ölçülen absorbens değerleri ile 0. dakikada ölçülen absorbens değerleri çıkarılarak numuneden gelen renk elimine edilmiş olur.

Deney 3×3 tekrar yapılmıştır ve kontrole göre numunelerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etme etkileri bulunmuştur. % İnhibisyon (%Inh.) değerleri, denkleme (3.1) göre hesaplanmıştır.

Reaktiflerin hazırlanması:

Enzim (AChE): 0,67 mg asetilkolinesteraz (500 U) 50 mL tampon A çözeltisi (pH:8,0) içinde çözülmüştür ve 1'er mL'lik alikvot olarak cryo-tüplere paylaştırılmıştır. Her biri için 10 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış olur. Alikvotlar daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda (-80°C) bekletilmiştir. Stok çözeltiden 1 mL alınarak üzerine 44,5 mL A tamponu eklenmiştir. Böylece 0,22 U/mL konsantrasyonda enzim çözeltisi elde edilmiştir.

Tampon A çözeltisi: 1,514 g TRİS tartılıp 250 mL ultra saf suda çözülmüştür. pH değeri derişik HCl ile 8,0'e ayarlanmıştır.

Tampon B çözeltisi: 25 mg BSA tartılıp 25 mL Tampon A çözeltisi içerisinde çözülmüştür.

Tampon C çözeltisi: 0,29 g NaCl ve 0,2 g MgCl₂•6H₂O tartılarak 50 mL Tampon A çözeltisi içerisinde çözülmüştür.

DTNB: 60 mg madde tartılmıştır ve 50 mL Tampon C çözeltisi içerisinde çözülerek 3 mM'lık çözeltisi hazırlanmıştır.

ATCI: 43 mg substrat tartılmıştır ve 10 mL ultra saf su içerisinde çözülerek 15 mM'lık çözeltisi hazırlanmıştır.

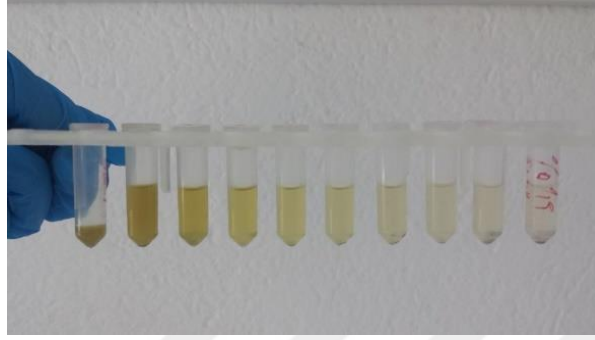
Galantamin: Maddenin 1 mg/mL çözeltisi metanolde hazırlanmıştır.

3.10.4. Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi

3.10.4.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) saptanması

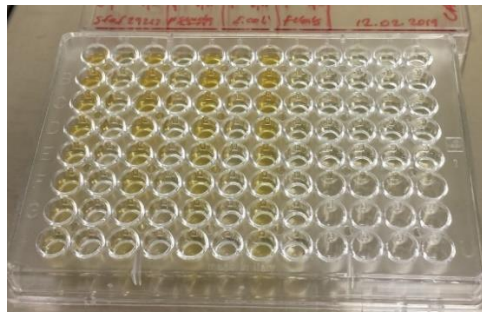
Uçucu yağ ve ekstrelerin mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği minimum inhibisyon değerlerinin (MİK) belirlenebilmesi için CLSI 2016 (Clinical&Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen yöntem uygulanmıştır. -20°C'de koleksiyonda bulunan her bir mikroorganizmanın aktivasyonları Colombia Sheep Blood Agar'a ekimler yapılarak gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda elde edilen kolonilerden Müller Hinton Agar'a alt kültür ekimleri yapılmıştır ve bu ekimler 24 saat, 37°C'de normal atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir. Elde edilen 24 saatlik kolonilerden steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland (1×10⁸ hücre/mL) turbiditeye ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Besiyeri olarak Müller Hinton Broth kullanılmıştır. Bakterilerin ekstre ve uçucu yağlara duyarlı oldukları konsantrasyonları belirlemek amacıyla steril 96-kuyucuklu U tabanlı mikropalakların her bir kuyucuğuna 0,5 McFarland'a ayarlanmış bakteri ve maya süspansiyonlarından 50 µL

(5×10^5 hücre/mL) eklenmiştir. Uçucu yağların DMSO içinde, ekstrelerin %60 metanol içinde stok solüsyonları hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonlarından Müller Hinton Broth aracılığı ile ekstreler için 0,375 mg/mL ile 24 mg/mL, uçucu yağlar için ise 0,031 mg/mL ile 1,975 mg/mL aralığında seri dilüsyon dozları hazırlanmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. *L. cuminoides* ekstrelerinin seri dilüsyon dozları

Her bir uçucu yağ ve ekstrenin stok solüsyonundan hazırlanan dozların 150 μ L'si patojen bakteri/maya içeren her bir kuyucuğa 4 tekerrürlü olarak eklenmiş ve son hacmin 200 μ L olması sağlanmıştır. Her deney setinde, her bir patojen için 3 kuyucuk, mikroorganizma büyüme kontrolü ve 3 kuyucuk, besiyeri sterilite kontrolü olarak bırakılmıştır. Ekstrelerin hazırlandığı DMSO ve %60'lık metanol çözeltilerinin en yüksek uygulama dozundaki konsantrasyonları çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Hazırlanan mikrolakalar 37°C'de 24 saat normal atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir. Bakteriyal ve fungal büyüme U tabanlı kuyuların dip kısmında oluşan pellet aracılığı ile tespit edilmiş, aynı zamanda mikrolakalar 600 nm bantta Thermo Multiscan&Go Mikrolaka okuyucuda spektrofotometrik olarak okunup 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. *L. cuminoides* ekstrelerinin seri dilüsyon dozlarının mikroorganizmalar üzerine uygulanması

Elde edilen absorbands değerlerinin ortalamaları ve ortalamanın standart hataları hesaplanıp deney grupları kontrol grupları ile karşılaştırılarak grafikler çizilmiştir. 600 nm’de ölçülen absorbands değerleri temel alınarak uygulanan uçucu yağ ve ekstre solüsyonlarının % inhibisyon (%Inh.) değerleri denkleme (3.2) göre hesaplanmıştır.

$$\% Inh. = \frac{[(Kontrol_{OD} - Besiyeri_{OD}) - (Örnek_{OD} - Besiyeri_{OD})]}{Kontrol_{OD} - Besiyeri_{OD}} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada; $Kontrol_{OD}$ kontrolün bulunduğu kuyucuktaki absorbands değeri, $Besiyeri_{OD}$ besiyerinin bulunduğu kuyucuktaki absorbands değeri, $Örnek_{OD}$ örneğin bulunduğu kuyucuktaki absorbands değeridir.

3.10.4.2. Minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) saptanması

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi sonucunda pellet oluşumunun gözlenmediği kuyucuklardan 10 µL alınarak Müller Hinton Agar plaklarına alt kültürler yapılmıştır. Bu test de CLSI, 2016’nın önerdiği yönteme göre yapılmış ve ekim yapılan petri kapları 37°C’lik normal atmosfer inkübatörlerinde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda üreme görülmeyen petrilerdeki uçucu yağ ve ekstrele ait dozlarının bakterisit etki gösterdiği kabul edilmiştir.

3.10.4.3. Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS paket programı ve Mann Whitney-U testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Uçucu Yağların Verimi, Özellikleri ve Kimyasal Kompozisyonları

L. cuminoides bitkisinin meyve kısımlarının Clevenger apareyinde hidrodistilasyonu sonucunda sarı renkli ve keskin aromatik kokulu uçucu yağları elde edilmiştir (Şekil.4.1). LCUY-1 ve LCUY-2 örneklerinin uçucu yağ verimleri %1,68 (a/a) ve %1,46 (a/a) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. *L. cuminoides* bitkisinden Clevenger apareyinde uçucu yağın elde edilmesi

L. cuminoides bitkisinin meyve uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu gaz kromatografisi tekniği ile tayin edilmiştir. Bileşenlerin kalitatif analizi için GK/KS, kantitatif analizi için GK-AİD sonuçları kullanılmıştır. Tablo 4.1’de bileşikler HP-Inowax kolondan çıkış sırasına göre listelenmiştir. Meyve kısımlarından elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonları sırasıyla %99,8 ve %99,8’i temsil eden 28 ve 27 bileşik tanımlanmıştır. Uçucu yağların kromatografik profilleri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

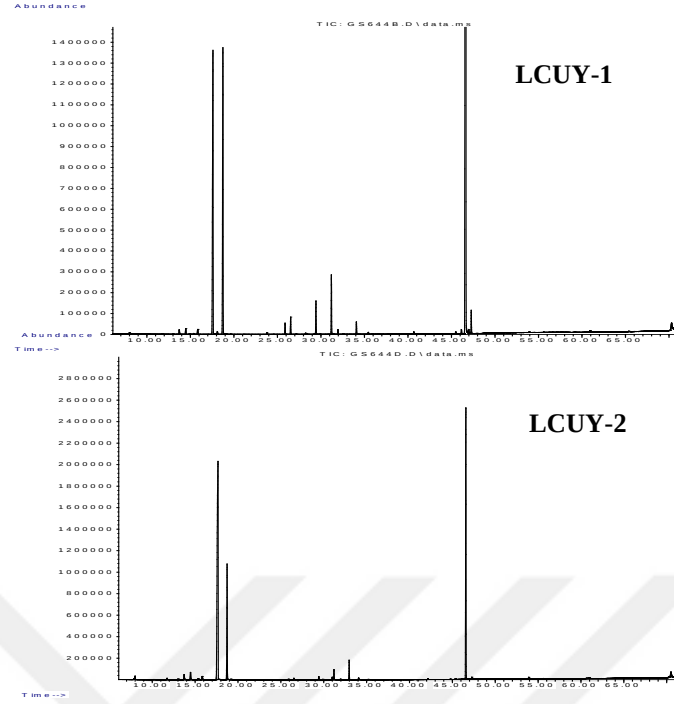
Tablo 4.1. *L. cuminoides* uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu

No.	RTİ	Bileşik	%	
			LCUY-1	LCUY-2
1.	1032	α -Pinen	-	e
2.	1035	α -Tuyen	-	0,3
3.	1132	Sabinen	e	e
4.	1159	δ -3-Karen	-	e

Tablo 4.1. (Devam) *L. cuminoides* uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu

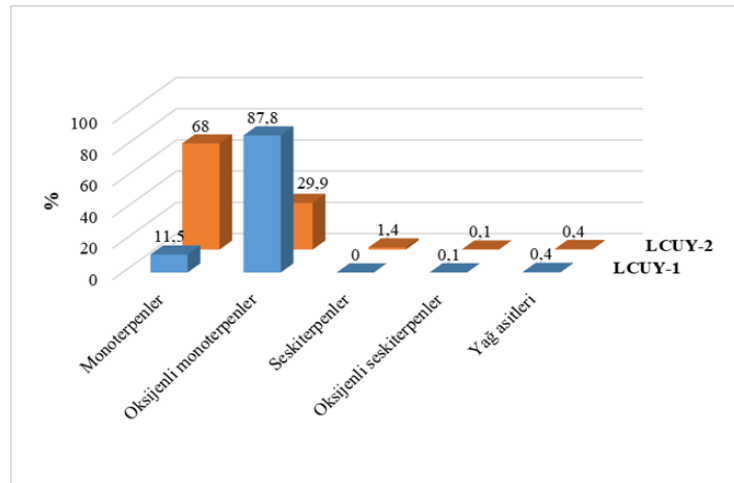
No.	RTİ	Bileşik	%	
			LCUY-1	LCUY-2
5.	1174	Mirsen	0,1	0,6
6.	1188	α -Terpinen	0,1	0,6
7.	1203	Limonen	e	e
8.	1218	β -Felandren	0,1	0,3
9.	1255	γ -Terpinen	6,4	56,8
10.	1266	3-Oktanon	e	-
11.	1280	<i>p</i> -Simen	4,8	9,4
12.	1290	Terpinolen	-	e
13.	1393	3-Oktanol	e	-
14.	1452	1-Okten-3-ol	0,1	-
15.	1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0,3	-
16.	1553	Linalol	e	e
17.	1556	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	0,5	0,2
18.	1571	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	e	e
19.	1590	Bornil asetat	-	e
20.	1611	Terpinen-4-ol	0,8	0,7
21.	1612	β -Karyofilen	-	0,2
22.	1638	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	0,1	e
23.	1668	(<i>Z</i>)- β -Farnesen	-	1,2
24.	1706	α -Terpineol	0,2	0,1
25.	1719	Borneol	e	-
26.	1758	<i>cis</i> -Piperitol	e	-
27.	1798	Metil salisilat	e	-
28.	1865	İzopiperitenon	e	-
29.	1949	Piperitenon	e	-
30.	2144	Spatulenol	-	0,1
31.	2161	Hekzahidro-farnesilaseton	e	e
32.	2181	İzotimol (=2-İzopropil-4-metil fenol)	e	e
33.	2198	Timol	85,7	28,8
34.	2221	İzokarvakrol (=4-İzopropil-2-metil fenol)	e	e
35.	2239	Karvakrol	0,2	0,1
36.	2931	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit)	0,4	0,4
Toplam			99,8	99,8

*LCUY-1 ve 2: *L. cuminoides* uçucu yağları (meyve); RTİ: Relatif Tutunma İndisi; e: %0,1'in altındaki bileşikler



Şekil 4.2. *L. cuminoides* meyve uçucu yağlarının gaz kromatografik profilleri. LCUY-1 ve LCUY-2: *L. cuminoides* uçucu yağları (meyve)

Uçucu yağların içinde tespit edilen bileşikler, monotерpenler, seskiterpenler ve yağ asitleri olarak üç ana grup altında toplanmıştır. İki uçucu yağın içerisindeki majör grupların % dağılımı ve miktarları Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. *L. cuminoides* meyve uçucu yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı

4.2. Sabit Yağ Asitlerinin Verim ve Kimyasal Kompozisyonları

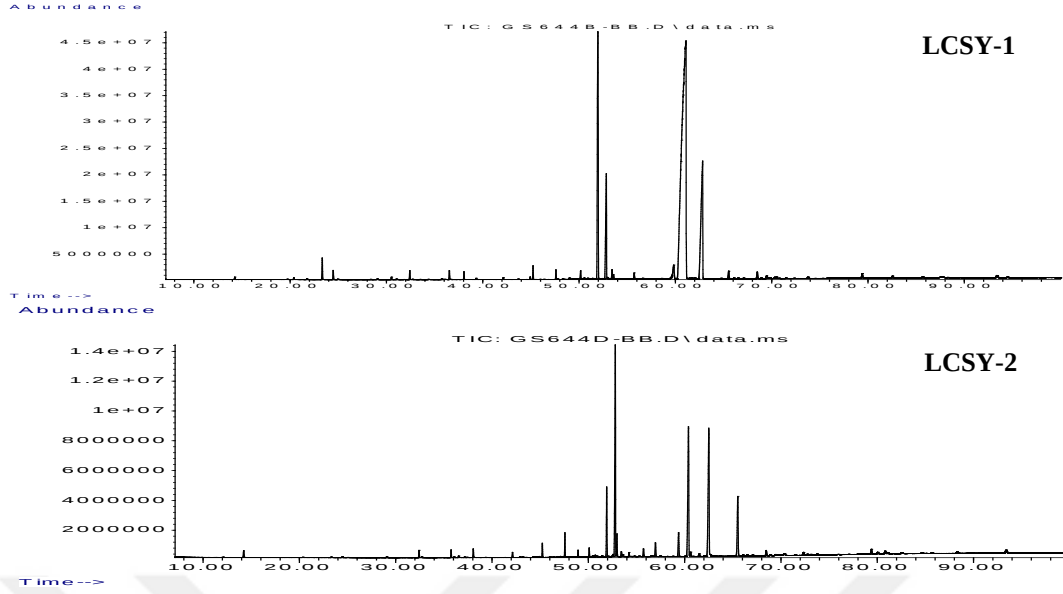
L. cuminoides bitkisinin meyve kısımlarından Folch metoduyla sabit yağ asitleri elde edilmiştir. LCSY-1 ve LCSY-2 örneklerinden sabit yağ elde edildikten sonra sırasıyla sabit yağ verimleri % 1,31 (a/a) ve % 0,23 (a/a) olarak hesaplanmıştır.

L. cuminoides bitkisinin meyvelerinden elde edilen sabit yağ asitleri metil esterlerinin kimyasal kompozisyonu GK/KS ve GK-AİD teknikleriyle araştırılmıştır. Tablo 4.2’de bileşiklerin HP-Inowax kolondan çıkış sırasına göre listesi verilmiştir. Meyve kısımlarından elde edilen yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonları sırasıyla %100 ve %98,1’ini oluşturan 15 ve 10 bileşik tespit edilmiştir. Yağ asitlerinin kromatografik profilleri Şekil 4.4’te gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *L. cuminoides* sabit yağ asitlerinin kompozisyonu

No.	RTİ	Bileşik	%	
			LCSY-1	LCSY-2
1.	1810	Metil dodekanoat (=Metil laurat)	e	-
2.	1903	Metil tridekanoat	0,1	-
3.	2018	Metil tetradekanoat (=Metil miristat)	0,3	2,1
4.	2095	Metil pentadekanoat	0,3	0,9
5.	2223	Metil hekzadekanoat (=Metil palmitat)	5,7	28,5
6.	2245	Metil (Z)-7-hekzadekanoat	0,4	-
7.	2251	Metil (Z)-9-hekzadekanoat (=Metil palmitoleat)	0,1	-
8.	2323	Metil heptadekanoat (=Metil margarar)	0,2	0,9
9.	2436	Metil oktadekanoat (=Metil stearat)	1,3	3,4
10.	2468	Metil (Z)-9-oktadekanoat (=Metil oleat)	76,5	24
11.	2509	(Z,Z)-9,12-Metil oktadekadienoat (=Metil linoleat)	14,1	25,8
12.	2572	(Z,Z,Z)-9,12,15-Metil oktadekatrienoat (=Metil linolenat)	0,4	10,7
13.	2634	Metil eikosanoat (=Metil araşidat)	0,3	0,9
14.	2658	cis-11-Metil eikosanoat	0,1	-
15.	2841	Metil dokosanoat (=Metil behenat)	0,2	0,9
Toplam			100	98,1

*LCSY-1 ve 2: *L. cuminoides* sabit yağları (meyve); RTİ: Relatif Tutunma İndisi; e: %0,1’in altındaki bileşikler



Şekil 4.4. *L. cuminoides* sabit yağ asitlerinin gaz kromatografik profilleri. LCSY-1 ve LCSY-2: *L. cuminoides* sabit yağları.

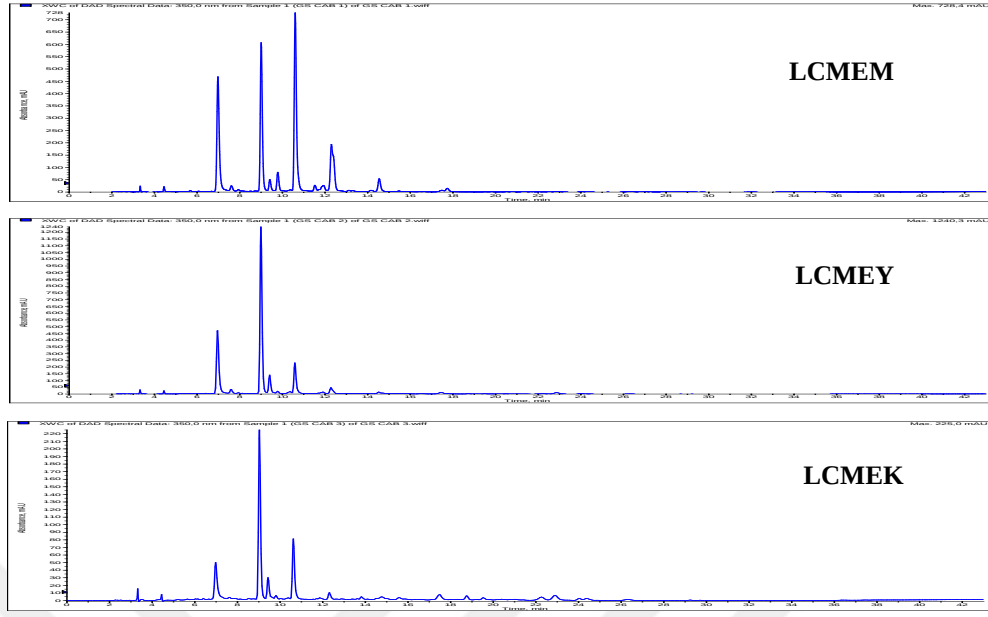
4.3. Ekstrelerin Verim, Özellikleri ve Kimyasal Kompozisyonları

L. cuminoides bitkisinin meyve, yaprak ve kök kısımları %60'lık metanol ile masere edilerek ekstreleri elde edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin rengi kahverengi, kokuları keskin aromatiktir. Meyve ekstresi kırılgan ve kolay ufalanabilirken, yaprak ve kök ekstreleri ise yapışkan ve reçinemsiz durumda idi (Şekil 4.5). Ekstrelerin verimleri bitkisel materyal üzerinden meyve, yaprak ve kök kısımları için sırasıyla %15,84 (a/a), %11,48 (a/a) ve %8,13 (a/a) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. *L. cuminoides* bitkisinin farklı kısımlarından elde edilen ekstreleri

Ekstrelerin kimyasal kompozisyonu SK-KS/KS tekniği ile incelenmiştir. Bu amaçla ekstrelerin çözeltileri metanolde 10 mg/mL olarak hazırlanmış ve sisteme enjekte edilmiştir. Ekstrelerin kromatografik profilleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

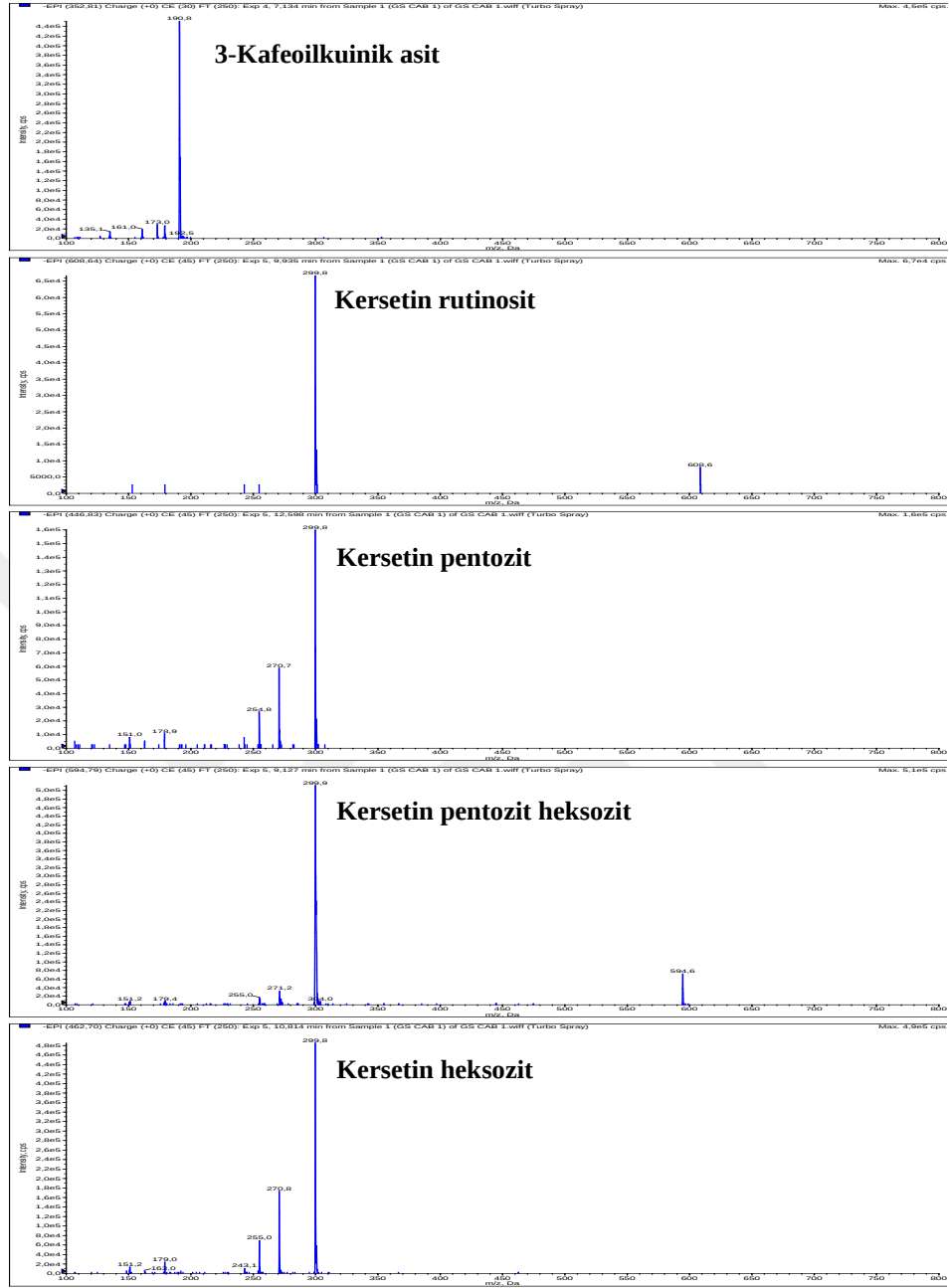


Şekil 4.6. *L. cuminoides* ekstrlerinin kromatografik profilleri. LCMEM: *L. cuminoides* meyve metanollü ekstresi; LCMEY: *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstresi; LCMEK: *L. cuminoides* kök metanollü ekstresi.

Ekstrelerde tespit edilen bileşiklerin teşhisleri kütle spektrum bilgileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Fenolik bileşiklerin ekstrlerdeki dağılımı Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Ekstrelerde tespit edilen başlıca bileşikler; 3-kafeoilkuinik asit, kersetin rutinosit, kersetin pentozit, kersetin pentozit heksozit, kersetin heksozit olarak teşhis edilmiştir.

Tablo 4.3. *L. cuminoides* ekstrlerinde tespit edilen bileşiklerin ekstrlerdeki dağılımı

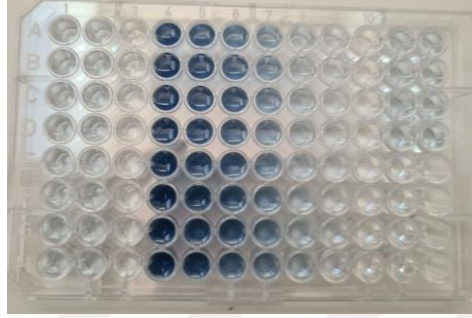
No.	Bileşik	LCMEM	LCMEY	LCMEK
1.	3-Kafeoilkuinik asit	+	+	+
2.	Kersetin rutinosit	+	-	-
3.	Kersetin pentozit	+	-	-
4.	Kersetin pentozit heksozit	+	+	+
5.	Kersetin heksozit	+	+	+



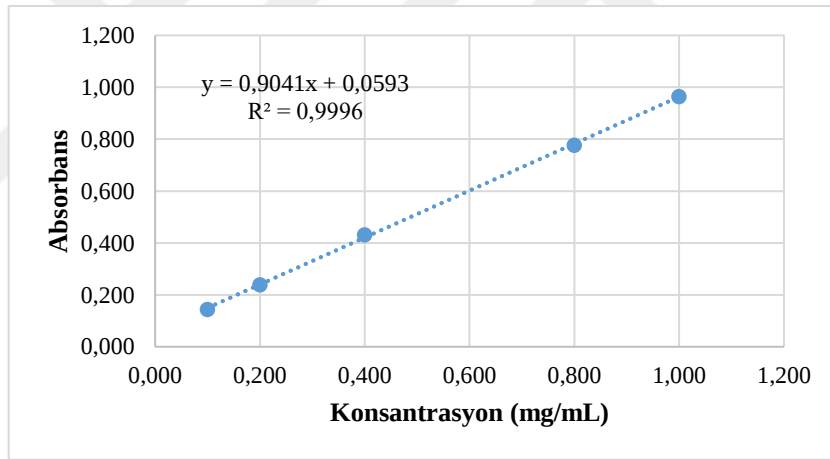
Şekil 4.7. *L. cuminoides* ekstrlerinde tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları

4.4. Ekstrelerin Toplam Fenol Miktarları

L. cuminoides bitkisinin meyve, yaprak ve köklerinden elde edilen ekstrelerde toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu reaktifiyle spektrofotometrik metod ile ölçülmüştür (Şekil 4.8). Şekil 4.9’da yer alan kalibrasyon eğrisi gallik asit çözeltisi kullanılarak elde edilmiştir. Gallik asite eşdeğer olarak hesaplanan sonuçlar Tablo 4.4’te yer almaktadır.



Şekil. 4.8. *L. cuminoides* ekstrelerinin toplam fenol miktar tayini sonucunda meydana gelen renk değişimi



Şekil. 4.9. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

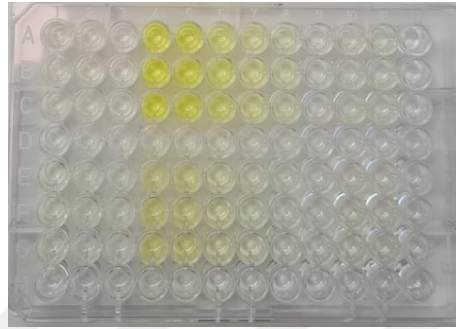
Tablo 4.4. *L. cuminoides* ekstrelerine ait toplam fenol miktarları

Numune	Toplam Fenol Miktarı (Ort.±S.S., mgGAE/gekstre)
LCMEM	140±11
LCMEY	133±9
LCMEK	36±4

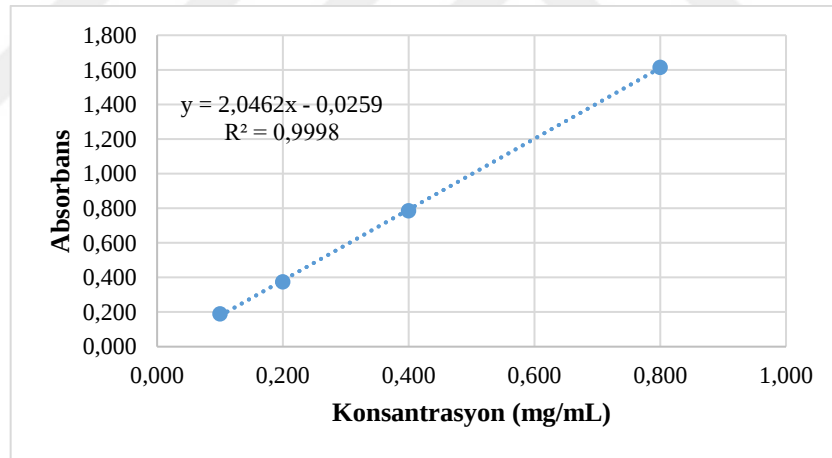
* LCMEM: *L. cuminoides* meyve metanollü ekstre; LCMEY: *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstre; LCMEK: *L. cuminoides* kök metanollü ekstre; Ort.: Ortalama değer; S.S.: Standart sapma; mgGAE/gekstre: 1 g ekstradaki gallik asite eşdeğer fenol miktarı

4.5. Ekstrelerin Toplam Flavonoid Miktarları

L. cuminoides bitkisinin meyve, yaprak ve köklerinden elde edilen ekstrelerdeki toplam flavonoid miktarları $AlCl_3$ ile oluşturduğu kompleksin renginin spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Kersetin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.11’de verilmiştir. Ekstrelerdeki toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak elde edilen kalibrasyon eğrisindeki denkleme göre hesaplanmıştır (Tablo 4. 5).



Şekil. 4.10. *L. cuminoides* ekstrelerinin toplam flavonoid miktar tayini sonucunda meydana gelen renk değişimi



Şekil. 4.11. Kersetin kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.5. *L. cuminoides* ekstrelerine ait toplam flavonoid miktarları

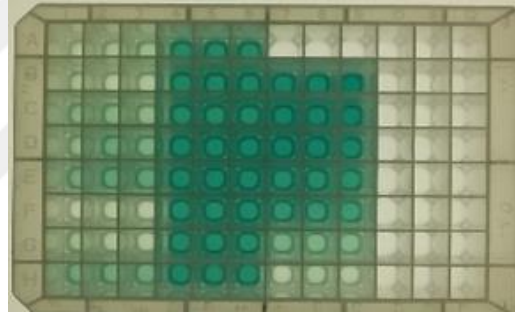
Numune	Toplam Flavonoid Miktarı, (Ort.±S.S., mgKE/gekstre)
LCMEM	101±7
LCMEY	95±5
LCMEK	46±1

* **LCMEM:** *L. cuminoides* meyve metanollü ekstre; **LCMEY:** *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstre; **LCMEK:** *L. cuminoides* kök metanollü ekstre; **Ort.:** Ortalama değer; **S.S.:** Standart sapma; **mgKE/g_{ekstre}:** 1 g ekstredeki kersetine eşdeğer flavonoid miktarı

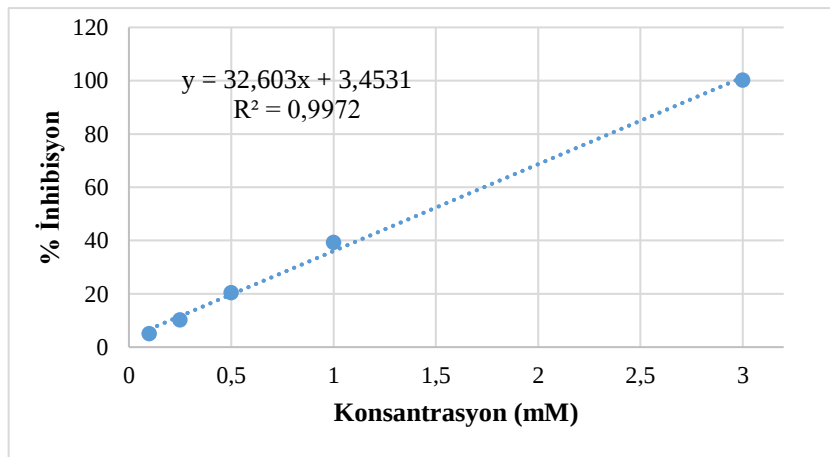
4.6. Biyolojik Aktivite Etkileri

4.6.1. ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstraktlarının antioksidan etkileri ABTS^{•+} radikalini süpürmelerine bakılarak TEAC deneyi ile değerlendirilmiştir. Numunelerin antioksidan etkileri Troloks'un (standart inhibitör madde) ABTS^{•+} radikalini süpürme etkisi ile karşılaştırılıp spektrofotometrik olarak saptanmıştır ve meydana gelen renk değişimi Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Deney mikrotitre plak tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri ile numunelerin % inhibisyonları denkleme (3.1) göre hesaplanmıştır. Troloks'un azalan konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizilerek eğri denklemi elde edilmiştir (Şekil 4.13). Test edilen numunelerin % inhibisyonları, eğri denkleminde yerine yazılarak Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstraktlarının etkisi ile ABTS reaktifinin renk değişimi



Şekil 4.13. Troloks kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi

Numunelerin Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

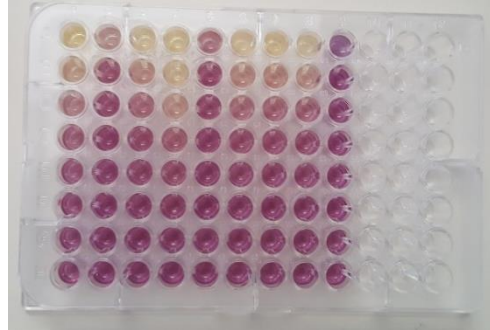
Tablo 4.6. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının TEAC değerleri

Numune	TEAC, mM (Ort.±S.S.)
LCUY-1	1,234±0,045
LCUY-2	1,645±0,056
LCMEM	0,574±0,044
LCMEY	0,584±0,020
LCMEK	0,120±0,012

* **LCUY-1 ve 2:** *L. cuminoides* meyve uçucu yağları; **LCMEM:** *L. cuminoides* meyve metanollü ekstresi; **LCMEY:** *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstresi; **LCMEK:** *L. cuminoides* kök metanollü ekstresi; **TEAC:** Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite; **Ort.:** Ortalama değer; **S.S.:** Standart sapma.

4.6.2. DPPH[•] radikalini süpürme etkisi

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstralarının antioksidan aktivitesini tespit etmek için elektron transferine dayalı DPPH deneyi kullanılmıştır ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Test edilen numuneler mikrodilüsyon tekniği uygulanarak deneye tabi tutulmuştur. Şekil 4.14'te *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının DPPH reaktifi üzerindeki etkisi sonucu gözlemlenen renk değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.14. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının etkisi ile DPPH reaktifinin renk değişimi

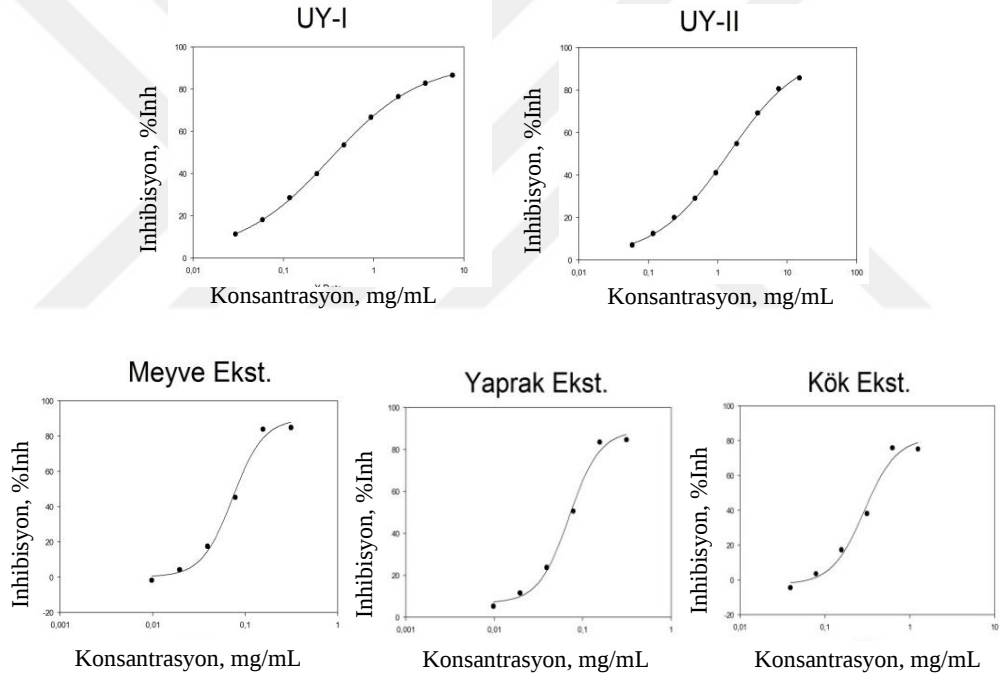
Uçucu yağ ve ekstraların denkleme (3.1) göre % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Test numunelerinin konsantrasyon verileri ve %Inh. değerleri kullanılarak *SigmaPlot* programında IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının DPPH testinde IC₅₀ değerleri

Numune	IC ₅₀ , mg/mL (Ort.±S.S.)
LCUY-1	0,511±0,03
LCUY-2	1,331±0,065
LCMEM	0,061±0,01
LCMEY	0,063±0,006
LCMEK	0,289±0,002
GA	0,002±0,0001

* LCUY-1ve 2: *L. cuminoides* meyve uçucu yağları; LCMEM: *L. cuminoides* meyve metanollü ekstresi; LCMEY: *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstresi; LCMEK: *L. cuminoides* kök metanollü ekstresi; GA: Gallik asit standart inhibitörü; Ort.: Ortalama değer; S.S.: Standart sapma.

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstralarının IC₅₀ değerleri hesaplamasında kullanılan eğriler Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının IC₅₀ değerleri

4.6.3. Biyootografik antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

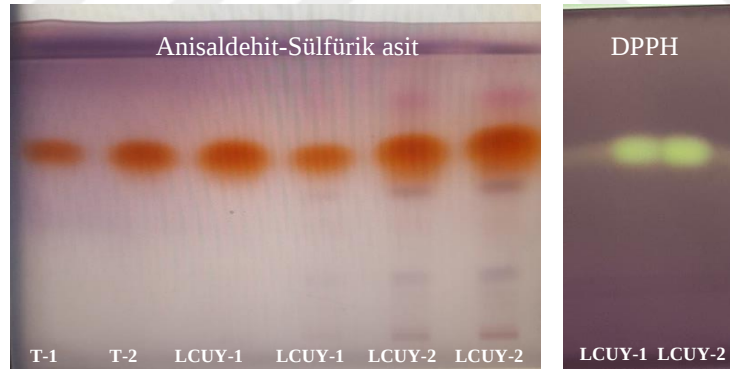
YPİTK Analizi: Araştırma kapsamında *L. cuminoides* bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstraların biyootografik olarak antioksidan aktivitesinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda uçucu yağ ve ekstraların farklı hareketli fazlardaki ayrımları incelenerek başarılı ayırımı sağlayan uygun hareketli fazlar seçilmiştir. Deneyde uçucu yağ ve ekstralar için aşağıdaki hareketli fazlar arasında seçim yapılmıştır (Tablo 4.8):

Tablo 4.8. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstreleri için test edilen hareketli fazlar

Uçucu yağlar için test edilen hareketli fazlar	Ekstreler için test edilen hareketli fazlar
Toluen: Etil asetat (95:5, <i>h/h</i>)	Formik asit: Su: Etil asetat (10:5:85, <i>h/h/h</i>)
Hekzan: Etil asetat (85:15, <i>h/h</i>)	Etil asetat: Asetik asit: Formik asit: Su (100:11:11:27, <i>h/h/h/h</i>)
Diklorometan	Toluen: Etil asetat: Formik asit (70:30:1, <i>h/h/h</i>)
Hekzan: Dietil eter (80:20, <i>h/h</i>)	Toluen: Etil asetat: Formik asit: Su (5:100:10:10, <i>h/h/h/h</i>)

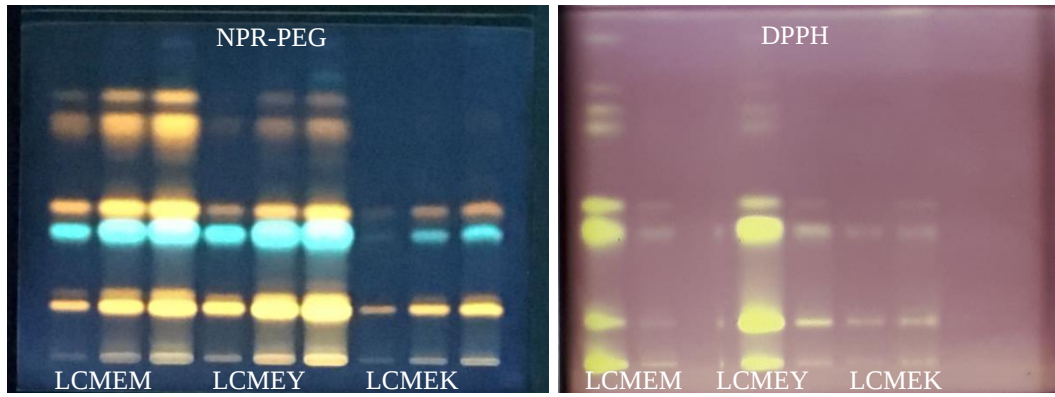
Polar ekstrelerdeki bileşiklerin ayrımını sağlayan mobil faz olarak toluen: etil asetat: formik asit: su (5:100:10:10, *h/h/h/h*) karışımı seçilmiştir. Uçucu yağ bileşiklerinin ayrımı için hekzan: etil asetat (85:15, *h/h*) karışımı uygun bulunmuştur.

Uçucu yağ bileşiklerinin ayrımı seçilen hareketli faz ile sağlanarak, bileşikleri belirlemek amacıyla plak anisaldehit reaktifine daldırılmış 5 dk 100-105°C’de ısıtılmıştır ve gözlemlenen renk değişimi beyaz ışık altında incelenmiş ve kaydedilmiştir. Aynı uygulama bir kez daha tekrarlanmış ve plak DPPH reaktifine daldırılmıştır. 30 dk karanlıktaki inkübasyondan sonra DPPH reaktifi ile antioksidan aktif maddelerin verdiği sarı spotların pozisyonları işaretlenmiştir (Şekil 4.16).



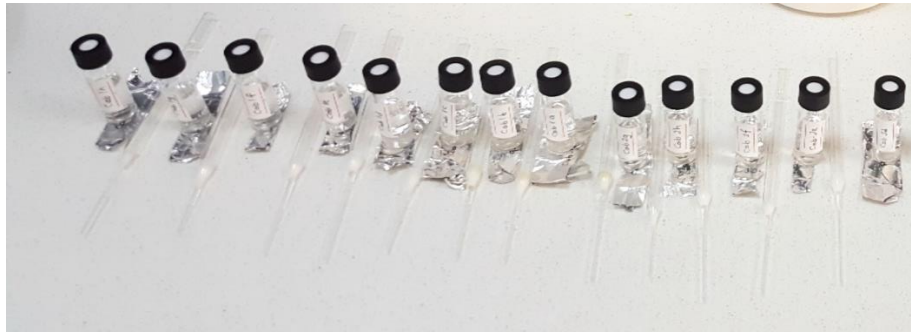
Şekil 4.16. *L. cuminoides* uçucu yağlarının (LCUY-1 ve LCUY-2) bileşenlerinin YPİTK tekniği ile ayrımı. T-1, T-2: Timol standardı.

Sulu-metanollü ekstrelerin plak üzerinde ayrılmış bileşiklerini belirlemek için plak, NPR belirtecine daldırılmış, 5 dk 100-105°C’de ısıtılmıştır ve ardından PEG çözeltisine daldırılmıştır. Sonuçları UV 254 ve 366 nm altında incelenmiştir. Aynı uygulama tekrarlanmış ve plak DPPH reaktifine daldırılmıştır. 30 dk karanlıktaki inkübasyondan sonra DPPH reaktifi ile antioksidan aktif maddelerin verdiği sarı spotların pozisyonları işaretlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *L. cuminoides* ekstralarının bileşenlerinin YPİTK tekniği ile ayrımı

Preparatif çalışma için numuneler plak üzerine şerit olarak uygulanarak kromatografik ayırım bir kez daha gerçekleştirilmiştir. R_f değerleri kullanılarak antioksidan aktif bileşiklerin bantları işaretlenerek spatula ile kazınmıştır. Kazınan fraksiyonlar uygun çözücüyle re-ekstre edilmiştir. Bu amaçla, plak üzerinden kazınan fraksiyonlar pastör pipetlere (uçları pamuk ile doldurulmuş) aktarılmış ve metanol ile elüe edilmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen elüatlar yoğunlaştırılıp GK-AİD/KS ve SK-KS/KS teknikleri ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.18. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının semipreparatif fraksiyonlaması

L. cuminoides meyve uçucu yağından preparatif YPİTK ile izole edilen maddenin teşhisi, GK/KS tekniği ile yapılmıştır. Kütle spektrum, RTİ ve standart madde ile kıyaslanarak, maddenin timol olduğu tespit edilmiştir.

Ekstrelerde DPPH reaktifine karşı aktivite gösteren spotlar işaretlenmiştir (spotların rengi sarı olmuştur). Spotların SK-KS analizinde kütle spektrum bilgilerine göre 3-kafeoilkuinik asit, kersetin rutinozit, kersetin pentozit, kersetin pentozit heksozit ve kersetin heksozit tanımlanmıştır.

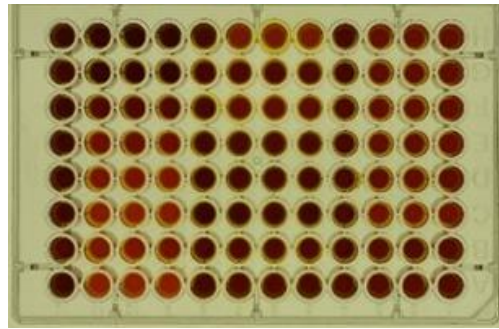
4.6.4. Antidiyabetik aktivite değerleri

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin karbonhidrat metabolizması üzerinde etkili olan α -amilaz enzimini inhibe etme potansiyeli mikrotitre tekniği ile değerlendirilmiştir. şekil 4.19’da *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstreleri ile geręekleřen reaksiyonun sonunda meydana gelen renk değişimi gōsterilmiřtir. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon değerleri Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri

Numune	% Inh. (Ort. $\pm$ S.S.)
LCUY-1	9,014 $\pm$ 0,569
LCUY-2	15,498 $\pm$ 0,697
LCMEM	9,752 $\pm$ 0,414
LCMEY	12,068 $\pm$ 0,710
LCMEK	10,346 $\pm$ 0,731
Akarboz	90,636 $\pm$ 1,029

* **LCUY-1 ve 2:** *L. cuminoides* meyve uçucu yağları; **LCMEM:** *L. cuminoides* meyve metanollü ekstre; **LCMEY:** *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstre; **LCMEK:** *L. cuminoides* kök metanollü ekstre; **Akarboz:** Standart inhibitör **%Inh.;** **Ort.:** Ortalama değer; **S.S.:** Standart sapma.



şekil 4.19. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin α -amilaz enzim inhibisyonu sonucunda meydana gelen renk değişimi

4.6.5. Antikolinesteraz aktivite değerleri

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin antiasetilkolinesteraz etkisi Ellman metodu ile spektrofotometrik olarak saptanmıştır (şekil 4.20). Numunelerin AChE enzimini inhibe etme etkileri, yüzde inhibisyon değerleri ile gōsterilmiřtir ve Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının AChE enzimi yüzde inhibisyon değerleri

Numune	% Inh. (Ort.±S.S.)
LCUY-1	39,340±11,311
LCUY-2	36,469±8,473
LCMEM	9,517±6,840
LCMEY	15,759±3,624
LCMEK	10,849±5,922
Galantamin	90±0,001

* **LCUY-1 ve 2:** *L. cuminoides* meyve uçucu yağları; **LCMEM:** *L. cuminoides* meyve metanollü ekstre; **LCMEY:** *L. cuminoides* yaprak metanollü ekstre; **LCMEK:** *L. cuminoides* kök metanollü ekstre; **Galantamin:** Standart inhibitör **%Inh.;** **Ort.:** Ortalama değer; **S.S.:** Standart sapma.



Şekil 4.20. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstralarının AChE enzim inhibisyon deneyi sonucunda meydana gelen renk değişimi

4.6.6. Antimikrobiyal aktivite değerleri

4.6.6.1. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK)

LCUY-1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerine yapılan uygulama dozlarının hiçbirinde yeşil pigmentasyona ve bulanıklığa rastlanmamıştır. Kontrol ve çözücü kontrolde kısmi yeşil pigmentasyona rastlanmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine, 300-18,75 µg'lık uygulama dozlarının hiçbirinde bakteriyel pellete ve bulanıklığa rastlanmamıştır. *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan hiçbir dozda pellete rastlanmamıştır. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan 0,0375 mg'lık dozda besiyerinde bulanıklık gözlenmiştir. Bulgular Thermoscan&go çoklu plaka okuyucudan elde edilen verilerle doğrulanmıştır (Tablo 4.11).

LCUY-2: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerine yapılan uygulama dozlarının hiçbirinde büyüme inhibisyonu gözlenmemiştir. En yüksek dozun içerdiği %1,7'lik DMSO uygulamasının da bakteriyel büyüme inhibisyonuna neden olmadığı görülmüştür. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerinde yapılan 395 µg ve 195,5 µg

uygulama dozlarında bakteriyel pellet gözlenmemiştir. En yüksek dozun içerdiği %1,7 DMSO'nun, tek başına uygulanmasının büyüme inhibisyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. *Candida albicans* ATCC 10231 üzerinde 395 µg'lık uygulamada iğne ucu büyüklüğünde pellete rastlanmıştır, düşük dozlara doğru gidildikçe pelletin büyüklüğünde artış tespit edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine 395 µg ve 195,5 µg'lık dozlarının uygulamasında bakteriyel pellete rastlanmamıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan dozlardan 395 µg'lık dozda bakteriyel pellete rastlanmazken 195,5 µg'lık doz uygulamasında besiyerinde mikrobiyal aktivasyondan kaynaklanan bulanıklık gözlenmiştir. Bulgular Thermoscan&go çoklu plaka okuyucudan elde edilen verilerle doğrulanmıştır (Tablo 4.11).

LCMEM: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 uygulama yapılan dozların tümünde bakteriyel büyümeden kaynaklanan yoğun bulanıklık gözlenmiştir. En yüksek dozun içerdiği konsantrasyonda (%6,06) etanol uygulamasının büyüme inhibisyonuna neden olmadığı ve *Pseudomonas aeruginosa* türünde intrinsik direncin göstergesi olan biyofilm tabakası ve glikokaliks yapısı oluşumunun, uygulamanın yapıldığı kuyucuklarda doz bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre; yapılan ekstre uygulamalarının kontrole göre bu bakteri türünde büyümeyi %93 oranında desteklediği tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine 4,8 mg'lık uygulamada bakteriyel pellete ve bulanıklığa rastlanmamıştır. 2,4 mg'lık dozda bakteriyel pellete rastlanmazken, besiyerinde bulanıklık gözlenmiştir. 1,2 mg'lık doz uygulamasından itibaren pellet oluşumuna rastlanmıştır. Çözücü kontrol etanol uygulamasının büyüme inhibisyonu gerçekleştirmediği gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan dozlarda bakteriyel pellete rastlanmamıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan dozların hiçbirinde bakteriyel pellete rastlanmazken besiyerinde mikrobiyal aktivasyondan kaynaklanan bulanıklık gözlenmiştir. Bulgular Thermoscan&go çoklu plaka okuyucudan elde edilen verilerle doğrulanmıştır (Tablo 4.11).

LCMEY: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 uygulama yapılan dozların tümünde bakteriyel büyümeden kaynaklanan yoğun bulanıklık gözlenmiştir. En yüksek dozun içerdiği konsantrasyonda etanol uygulamasının büyüme inhibisyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine 4,8 mg'lık uygulamada bakteriyel pellete ve bulanıklığa rastlanmamıştır. 2,4 mg ve 1,2 mg'lık dozlarda iğne ucu büyüklüğünde bakteriyel pellete rastlanmıştır. 0,6 mg'lık dozda

gözlenen pellet büyüklüğünün kontrol grubu ve çözücü kontrol grubuna eşdeğer büyüklükte olduğu gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda pellete rastlanmazken, diğer uygulama dozlarında kontrol grubu ile eşit büyüklükte bakteriyel pellete rastlanmıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda bakteriyel pellete rastlanmamıştır. Bulgular Thermoscan&go çoklu plaka okuyucudan elde edilen verilerle doğrulanmıştır (Tablo 4.11).

LCMEK: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 uygulama yapılan dozların tümünde yüksek dozdan düşük doza doğru, azalan yoğunlukta yeşil pigmentasyona rastlanmıştır. Yeşil rengin *Pseudomonas* türlerinde gözlenen piyosiyanın pigment üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. En yüksek dozun içerdiği konsantrasyonda etanol uygulamasının büyüme inhibisyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. Kontrol ve etanol uygulamasının yapıldığı kuyucuklarda pigmentasyona rastlanmamıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine 4,8-0,6 mg'lık uygulama dozlarında bakteriyel pellete ve bulanıklığa rastlanmamıştır. 0,6 mg ve 0,075 mg'lık dozlarda iğne ucu büyüklüğünde bakteriyel pellete ve bulanıklığa rastlanmıştır. 0,6 mg'lık dozda gözlenen pellet büyüklüğünün kontrol grubu ve çözücü kontrol grubuna eşdeğer büyüklükte olduğu gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda pellete rastlanmazken, diğer uygulama dozlarında, doz azaldıkça pellet büyüklüğünde artış gözlenmiştir. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda en büyük bakteriyel pellete rastlanmıştır, uygulama dozları azaldıkça bakteriyel pellette küçülme gözlenmiştir. Bulgular Thermoscan&go çoklu plaka okuyucudan elde edilen verilerle doğrulanmıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin patojen mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon dozları

Mikroorganizma	LCUY-1	LCUY-2	LCMEM	LCMEY	LCMEK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,15 mg	İG	İG	İG	İG
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	75 µg	197,5 µg	2,4 mg	4,8 mg	4,8mg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18,75 µg	197,5µg	İG	4,8 mg	4,8 mg
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	18,75 µg	395 µg	4,8 mg	4,8 mg	İG

İG: İnhibisyon gözlenmemiştir.

4.6.6.2. Minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesi (MBK)

LKUY-1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, uygulama yapılan dozların MBK'ya aktarımında sadece 0,075 mg'lık uygulama dozunda petride bakteri kolonisine rastlanmıştır. Uygulamalarda yeşil pigmentasyona rastlanmamıştır. Kontrol ve çözücü kontrolde kısmi yeşil pigmentasyona rastlanmıştır. 0,15 mg'lık dozda besiyerinde bulanıklık gözlenmiştir (Tablo 4.12). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine 0,375 mg'lık uygulama dozunda 20'nin üzerinde bakteri kolonisi gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan hiçbir dozda, petride üremeye rastlanmamıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan 0,0375 mg'lık dozda 20'nin üzerinde koloni sayılmıştır.

LCUY-2: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, uygulama yapılan tüm dozlardan MBK'ya yapılan aktarımların tümünde aktif *Pseudomonas* kolonilerine rastlanmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 395 µg'lık doz uygulamasında bakteri kolonisine rastlanmazken, 197,5 µg'lık doz uygulamasında aktif kolonilere rastlanmıştır. *Candida albicans* ATCC 10231 üzerine 395 µg doz uygulamasında MİK'te iğne ucu büyüklüğünde pellete rastlanmasına rağmen, MBK testinde petride büyüme kolonisine rastlanmamıştır, buradaki maya hücrelerinin canlı olmadığı kanıtlanmıştır. *E. faecalis* ATCC 29212, düşük doz uygulamasından yüksek doz uygulamasına gidildikçe aktif koloni sayısında azalma tespit edilmiştir. Bakteriyel pelletin gözlenmediği 395 µg'lık doz uygulamasında 9 koloniye rastlanmıştır. *E. coli* ATCC 25922 üzerine 395 µg ve 195,5 µg'lık dozlarının MBK'ya aktarımında petrilerde bakteri kolonisine rastlanmamıştır (Tablo 4.12). %1,7'lik DMSO uygulamasının MBK aktarımında kontrol grubuna özdeş mikroorganizma kolonisi gelişimi gözlenmiştir.

LCMEM: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, uygulama yapılan tüm dozlardan MBK'ya yapılan aktarımların tümünde aktif bakteri kolonilerine rastlanmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 4,8 mg'lık doz uygulamasında bakteri kolonisine rastlanmamıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 ve *E. coli* ATCC 25922 üzerine yapılan tüm uygulamaların MBK aktarımında kontrol grubuna özdeş mikroorganizma kolonisi gelişimi gözlenmiştir. En yüksek dozun içerdiği %1,05'lik C₂H₅OH konsantrasyonunun bakteri suşlarının hiçbirinde büyüme inhibisyonuna neden olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.12).

LCMEY: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, uygulama yapılan dozların tümünde yoğun bakteriyel büyüme kolonilerine rastlanmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerine 4,8 mg'lık MBK uygulamasında bakteri kolonisine

rastlanmamıştır. *E. coli* ATCC 25922 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda pellete rastlanmazken, MBK uygulamasında 20'nin üzerinde bakteri kolonisine rastlanmıştır. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine uygulanan 4,8 mg'lık dozda bakteriyel pellete rastlanmadığı halde MBK'ya aktarımda 20'nin üzerinde koloniye rastlanmıştır (Tablo 4.12).

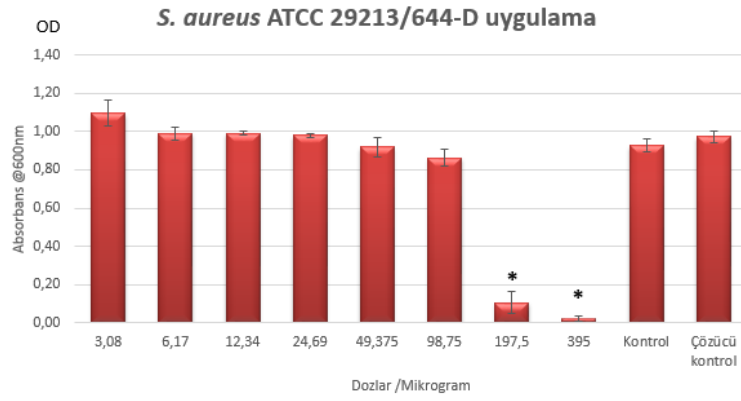
LCMEK: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, MBK'ya aktarılan uygulama dozların tümünde üreme gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sadece 4,8 mg'lık dozda üreme gözlenmemiştir. *E. coli* ATCC 25922 üzerine yapılan tüm uygulama dozlarında üreme gözlenmiştir. *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine yapılan tüm uygulama dozlarında üreme gözlenmiştir.

Ekstre ve uçucu yağ solüsyonlarının patojen mikroorganizmalar üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için, 96-kuyucuklu mikropalaklarda çıplak gözle inceleme yapıldığı gibi, Thermoscan &go mikropalaka okuyucuda 24 saat sonunda 600 nm'de verdikleri absorbans değerleri de ölçülmüştür. Absorbans ve % inhibisyon grafikleri aşağıda görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.22).

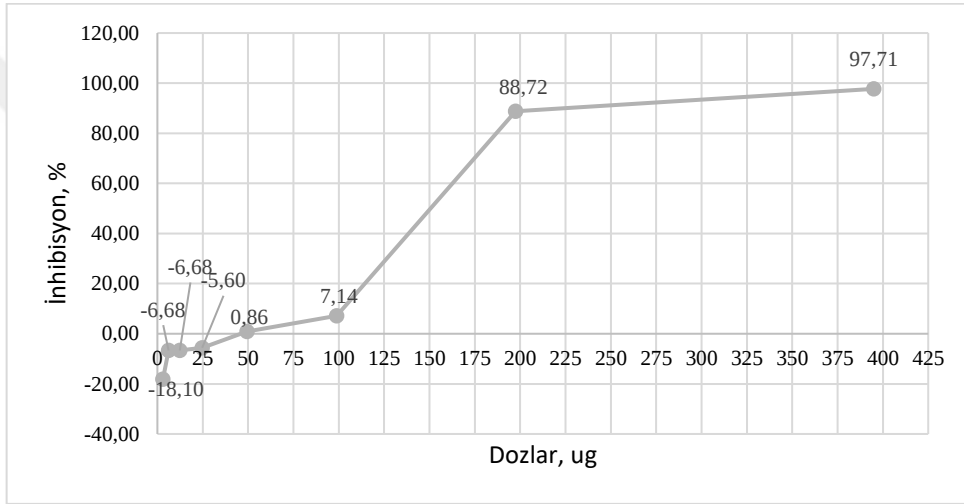
Tablo 4.12. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin patojen mikroorganizmalara karşı minimum bakterisidal konsantrasyon dozları

Mikroorganizma	LCUY-1	LCUY-2	LCMEM	LCMEY	LCMEK
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,15 mg	BKG	BKG	BKG	BKG
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	75 µg	395 µg	4,8 mg	4,8 mg	4,8 mg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18,75 µg	197,5 µg	197,5 µg	BKG	BKG
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	18,75 µg	395 µg	BKG	BKG	BKG

BKG: Bakterisidal konsantrasyon gözlenmemiştir.



Şekil. 4.21. *S. aureus* ATCC 29213 üzerine LCUY-2 uygulamasının absorbans değerleri



Şekil. 4.22. *S. aureus* ATCC 29213 üzerine LCUY-2 uygulamasının doza bağlı % inhibisyon değerleri

5. TARTIŞMA

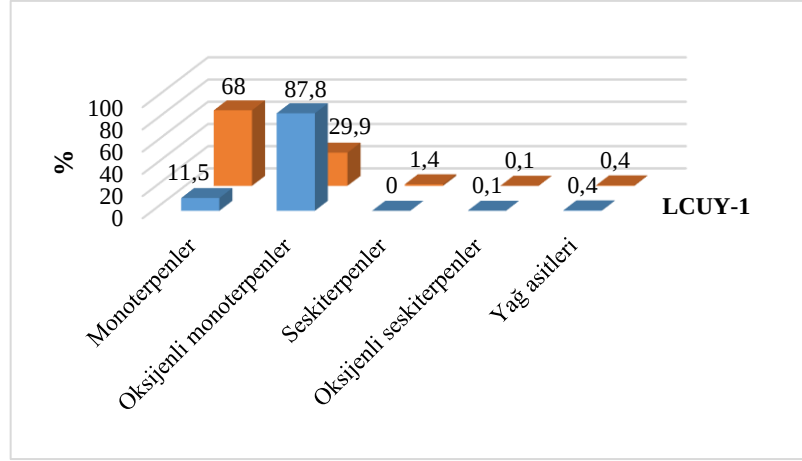
5.1. Uçucu Yağın Değerlendirilmesi

Türkiye’de Antalya, Kurşunlu lokasyonundan toplanan *L. cuminoides* bitkisinin uçucu yağ verim değerleri (%1,7 ve %1,5), Baser ve Tümen (1994) Balıkesir, Manisa, Kırklareli bölgelerinden toplanan *L. cuminoides* bitkisinin yağ verim değerlerinden (%0,9, %1,1, %0,9) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bitkisel materyal toplama tarihlerine bakıldığında; tezde çalışılan örneklerin Mayıs ayında, diğer çalışmadaki bitkilerin ise Temmuz ve Ağustos aylarında toplandığı belirtilmiştir. Uçucu yağ verimlerindeki farklılığın sebebi hem bitki gelişme döneminin hem de bitkinin toplandığı lokasyonun farklı olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Uçucu yağ kimyasal kompozisyonlarının karşılaştırılması sonucunda; tez kapsamında araştırılan bitkinin uçucu yağ bileşeninin (28 bileşik), diğer çalışmadaki uçucu yağ bileşeninden (14 bileşik) daha komplike olduğu görülmektedir.

Uçucu yağ bileşiklerine bakıldığında; timol yüzdesi sırasıyla %85,7 ve %28,8 olarak bulunmuşken, Baser ve Tümen (1994) çalışmasında ise %72,8, %89,2, %94,8 olarak rapor edilmiştir. γ -Terpinen yüzdesi sırasıyla %6,4 ve %56,8 olarak bulunmuşken, diğer çalışmada ise bu bileşik sırasıyla %15,8, %3,87, %0,40 oranında tespit edilmiştir. *p*-Simen yüzdesi sırasıyla %4,8 ve %9,4 olarak bulunmuşken, diğer çalışmada ise bu bileşik sırasıyla %5,4, %2,1 %0,3 olarak saptanmıştır.

Tez kapsamında uçucu yağların içinde tespit edilen bileşikler; oksijenli ve oksijensiz mono- ve seskiterpenler ve de yağ asitleri olarak beş ana grup altında toplanmıştır. İki uçucu yağın içerisindeki majör grupların % dağılımı ve miktarları Şekil 5.1’de gösterilmiştir.

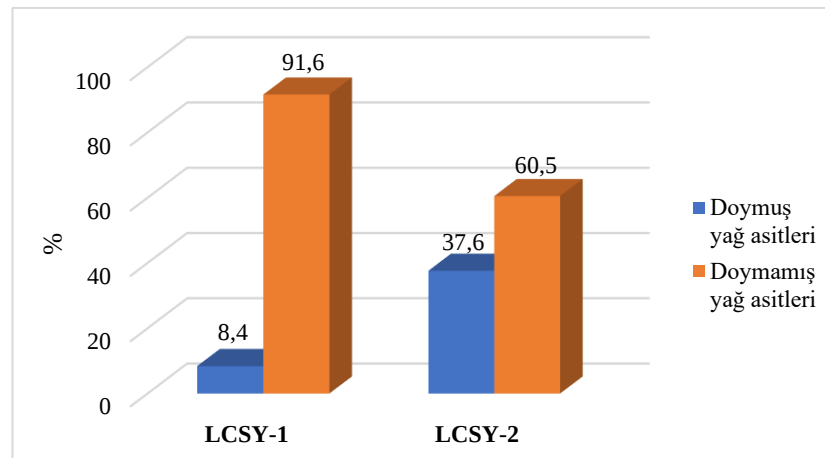


Şekil 5.1. *L. cuminoides* meyve uçucu yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı

5.2. Sabit Yağ Asitlerinin Değerlendirilmesi

Apiaceae familyasına ait bitkilerin meyvelerinde uçucu yağın yanı sıra sabit yağ da bulunmaktadır. Tohum sabit yağının, bileşiminde bir dizi olağandışı yağ asidi ürettiği bilinmektedir. Bu doğrultuda *L. cuminoides* meyvelerinin sabit yağ bileşimi açısından araştırılması önem taşımaktadır. Literatür taraması sonucunda bu türün sabit yağı ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tez kapsamında *L. cuminoides* meyvelerinden Folch metoduyla elde edilen sabit yağ asitleri transesterifikasyona tabi tutularak metil esterleri elde edilmiştir. Sabit yağların içinde tespit edilen bileşikler doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki ana grup altında toplanmıştır. İki sabit yağın içerisindeki majör grupların % dağılımı ve miktarları Şekil 5.2’de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. *L. cuminoides* meyve sabit yağlarında tespit edilen bileşiklerin sınıf dağılımı

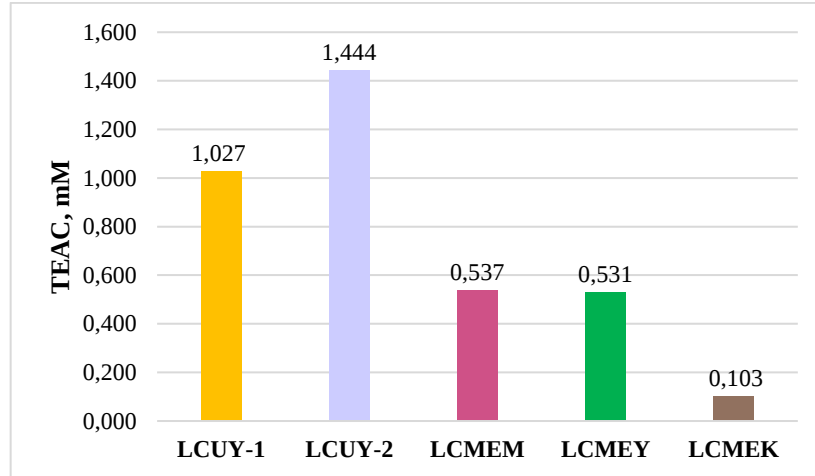
Şekil 5.2’de görüldüğü gibi kimyasal kompozisyonlarının doymamış yağ asitlerince zengin olduğu görülmüştür. Tablo 4.2’de belirtildiği gibi LCSY-1 yağının %76,5’ini oleik asit oluşturmuştur. LCSY-2’de ise doymamış yağ asitleri; linoleik (%25,8), oleik (%24,0) ve linolenik (%10,7) ile temsil edilmiştir. Doymuş yağ asitleri her iki yağda hekzadekanoik asit (%5,7 ve %28,5) ile temsil edilmiştir. Literatür taramasında Apiaceae familyası bitkilerinin tohumlarında petroselinik asit sıkça rapor edilmiştir. Ancak araştırma konusu olan *L. cuminoides* sabit yağında bu bileşik saptanmamıştır.

5.3. Ekstrelerin Değerlendirilmesi

L. cuminoides’ten elde edilen polar ekstrelerde, sıvı kromatografisi analizi sonucunda 3-kafeoilkuinik asit ve kersetin glikozitlerinin majör bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Bahmanzadegan vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada, metanollü ekstrede predominant fenolik bileşikler olarak klorojenik asit, rosmarinik asit, hesperidin, hesperetin ve vanilin saptanmıştır. Ekstrelerin farklı kompozisyona sahip olmasının sebebi, farklı yetiştirme yeri olduğu düşünülmektedir. Diğer etken faktörlerin (bitkinin toplanma zamanı, ekstretenin elde edilme yöntemi gibi) Bahmanzadegan vd. (2019)’nın çalışmasında yer almadığından dolayı tam kıyaslama yapmak mümkün olmamaktadır.

5.4. Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Tez kapsamında *L. cuminoides* bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstreleri antioksidan aktivite testlere tabi tutulmuştur. ABTS^{•+} radikallerini en güçlü süpürücü etkinin meyve uçucu yağlarında (LCUY-1 ve LCUY-2) olduğu tespit edilmiştir. Troloks’a eşdeğer antioksidan kapasiteleri sırasıyla 1,027 mM ve 1,444 mM olarak saptanmıştır (Şekil 5.3). Uçucu yağın ana bileşiği olan timolün bu aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.3. *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin Trolox'a eşdeğer antioksidan kapasiteleri

Bitkiden elde edilen uçucu yağ ve ekstreler üzerinde antioksidan aktivite açısından değerlendirme yapılırken bir diğer yöntem olan DPPH testi uygulanmıştır ve gallik aside en yakın IC_{50} değeri, metanollü meyve ve yaprak ekstrelerinde (LCMEM ve LCMEY) sırasıyla 0,061 mg/mL ve 0,063 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bahmanzadegan vd. (2019) tarafından, İran'da yetişen *L. cuminoides*'in metanollü ekstresinin IC_{50} değeri 1,597 mg/mL olarak bildirilmiştir. Sonuçlarda görülen belirgin farkın sebebi; ekstrenin, bitkinin farklı kısımlarından elde edilmiş olması ve dolayısıyla farklı kimyasal içeriğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin gösterdiği güçlü antioksidan potansiyelden sorumlu olan bileşikleri tespit etmek amacıyla biyootografik aktivite çalışması yapılmıştır. Preparatif YPİTK çalışmasında, uçucu yağ ve ekstrelerin içeriğini oluşturan bileşiklerin ayrımı sağlanarak DPPH reaktifi ile antioksidan aktiviteden sorumlu olan bileşikler tespit edilmiştir. Bu işlem sonunda uçucu yağın içinden, aktif olan bileşik preparatif olarak elde edilmiş ve GK-KS/AİD analizi sonucunda timol olduğu tespit edilmiştir. Timolün güçlü bir antioksidan ajan olduğu çeşitli model sistemlerde denenmiştir ve rapor edilmiştir. Yanishlieva vd. (1999) timolün sabit yağların oksidasyonunu güçlü bir şekilde geciktirdiğini belirtmişlerdir. Yıldız vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, timol ve karvakrolün lipit peroksidasyonuna karşı antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Ekstrelerde antioksidan aktiviteden sorumlu bileşiklerin tespiti için preparatif YPİTK çalışması gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, aktif bileşiklerin 3-kafeoilkuinik asit ve kersetin glikozitleri olduğu tespit edilmiştir. Biyootografik aktivite

çalışması bu bitki üzerinde ilk kez gerçekleştirilmiştir. 3-Kafeoilkuinik asit ve türevlerinin antioksidan aktiviteleri birçok çalışmada belirtilmiştir. Hung vd. (2006) tarafından bu grup bileşiklerinin LDL oksidasyonunu ve DPPH radikalini güçlü şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. Danino vd. (2009) yaptığı çalışmada 1,3-dikafeoilkuinik asitin DPPH ve ABTS deneylerinde güçlü inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir. Kersetin ve türevlerinin reaktif oksijen türlerine karşı aktivitesi Xu vd. (2019) tarafından rapor edilmiştir.

Tez kapsamında *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstreleri antidiyabetik aktivite açısından ilk kez değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçlarına göre test edilen numunelerin arasında meyve uçucu yağında (LCUY-2) en yüksek inhibisyon değeri saptanmıştır (%Inh. 15,5). Standart α -amilaz inhibitörü olan akarbozun aktivitesi % 90,6 olarak saptanmıştır. Genel olarak uçucu yağ ve ekstrelerin antidiyabetik açıdan zayıf anti- α -amilaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kaynaklarda timol içeren nanopolimerlerin antidiyabetik etkisi *in vivo* ortamda Karimi vd. (2019) tarafından rapor edilmiştir.

Tez kapsamında *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstreleri anti-asetilkolinesteraz etkisi ilk kez değerlendirilmiştir. Test edilen numunelerin arasında en yüksek AChE enzimini inhibe etme etkisi (%Inh. 32,0 ve 28,3) meyve uçucu yağlarında bulunmuştur (LCUY-1 ve LCUY-2). Genel olarak, numunelerin orta derecede anti-asetilkolinesteraz etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Tez kapsamında *L. cuminoides* uçucu yağ ve ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri ilk kez değerlendirilmiştir. Zayıf antimikrobiyal etkide oldukları görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen *Lagoecia cuminoides* L. bitkisinin üzerinde kapsamlı fitokimyasal ve biyolojik aktivite araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Antalya bölgesinden toplanan *L. cuminoides* bitkisinin meyvesinden uçucu yağ ve sabit yağı, bitkinin farklı kısımlarından ekstreleri elde edilerek kimyasal kompozisyonları ve biyolojik potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Uçucu yağ ve sabit yağ asitlerinin kompozisyonları GK-AİD/KS tekniği ile aydınlatılmış olup, meyve kısmında timol, γ -terpinen ve *p*-simen ana uçucu bileşikler olarak tespit edilmiştir. Sabit yağ asitlerinin analizi sonucunda oleik, linoleik, linolenik ve hekzadekanoik asitler ana bileşikler olarak saptanmıştır.

Bitkinin meyve, yaprak ve kökünden elde edilen ekstrelerin kimyasal kompozisyonları SK-KS/KS yöntemi ile incelenmiştir. Ekstrelerde majör bileşikler olarak 3-kafeoilkuinik asit ve kersetin glikozitleri tespit edilmiştir.

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin antioksidan aktivitesi; Troloks’a eşdeğer antioksidan kapasite testi ve DPPH radikalini süpürücü etki deneyi ile değerlendirilmiştir. Meyve uçucu yağlarının güçlü ABTS^{•+} katyon radikali süpürücü etkisinin, ekstrelerin ise güçlü DPPH[•] serbest radikali süpürücü etkisinin olduğu saptanmıştır.

Uçucu yağ ve ekstrelerin ortaya koymuş olduğu antioksidan etkiden sorumlu bileşiklerin tespiti için YPİTK-biyootografi tekniği uygulanmıştır. Semi-preparatif-YPİTK yöntemiyle izole edilen biyoaktif bileşiklerin analizi GK-KS/AİD ve SK-KS/KS teknikleri ile gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağda timol, ekstrelerde ise 3-kafeoilkuinik asit ve kersetin glikozitleri aktiviteden sorumlu bileşikler olarak tespit edilmiştir.

Uçucu yağ ve ekstrelerin antidiyabetik etkileri α -amilaz enzimi inhibe etme potansiyeline göre değerlendirilmiştir. En yüksek inhibisyon değeri uçucu yağ için tespit edilmiş olup test edilen numunelerin tümü zayıf antidiyabetik etki göstermişlerdir.

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin nöroprotektif özellikleri AChE enzimini inhibe etme etkisine göre değerlendirilmiştir. Meyve uçucu yağlarının orta derecede anti-AChE aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ekstreler ise zayıf etki göstermişlerdir.

L. cuminoides uçucu yağ ve ekstrelerinin zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Araştırma kapsamında *L. cuminoides* bitkisinin uçucu bileşenleri ile sabit yağ asitlerinin kimyasal kompozisyonları, ekstrelerin kimyasal kompozisyonları, bunun yanı

sıra uçucu yağ ve ekstralarının serbest radikal süpürme, antidiyabetik, anti-AChE ve antimikrobik etkileri ilk kez rapor edilmiştir.



KAYNAKÇA

- Abdulmanea, K., Prokudina, E. A., Lanková, P., Vaníčková, L., Koblovská, R., Zelený, V., Lapčík, O., (2012). Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 237–243.
- Adewusi, E. A., Steenkamp, V., (2011). *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(10), 829–835.
- Agarwal, P., Gupta, R., (2016). Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. *Research&Reviews: Journal of Medical and Health Sciences*, 5(4), 1–8.
- Al-Rifai, A., Aqel, A., Al-Warhi, T., Wabaidur, S. M., Al-Othman, Z. A., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y., (2017). Antibacterial, antioxidant activity of ethanolic plant extracts of some convolvulus species and their dart-tof-ms profiling. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-9.
- Alagawany, M., (2015). Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health-a review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 73–84.
- Amiri, M. S., Joharchi, M. R., (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(6), 621–635.
- Arituluk, Z. C., Ezer, N., (2012). Halk arasında diyabete karşı kullanılan bitkiler (Türkiye)-II. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 179–208.
- Bahmanzadegan, A., Rowshan, V., Zareiyan, F., Hatami, A. (2019). *Lagoecia cuminoides* L., its antioxidant activity and polyphenolic constituents from Iran. *Natural Product Research*, 33(16), 2376–2378.
- Baser, K. H. C., Tümen, G., (1994). Composition of the essential oil of *Lagoecia cuminoides* L. from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 6(5), 545–546.
- Baser, K. H. C., (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106–3119.
- Baytop, T., (1999). *Türkiye’de bitkiler ile tedavi-geçmişte ve bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bi, X., Lim, J., Henry, C. J., (2017). Spices in the management of diabetes mellitus. *Food Chemistry*, 217, 281–293.

- Blanco, A., Blanco, G., (2017). Antioxidants. A. Blanco&G. Blanco (Ed.), *Medical Biochemistry*. içinde London: Academic Press.
- Blois, M. S., (1958). Antioxidant determinations by the use of table free radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.
- Broom, G. M., Shaw, I. C., Rucklidge, J. J., (2019). The ketogenic diet as a potential treatment and prevention strategy for Alzheimer's disease. *Nutrition*, 60, 118–121.
- Bulut, G., Tuzlaci, E., (2008). Folk medicinal plants of Bayramiç (Çanakkale-Turkey). *Journal of Pharmacy of Istanbul University*, 40(1), 87–99.
- Bulut, G. (2015). Bayramiç (Çanakkale-Türkiye) tıbbi bitkileri üzerinde etnobotanik çalışmaları. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19(3), 268–282.
- Danino, O., Gottlieb, H. E., Grossman, S.&Bergman, M., (2009). Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food Research International*, 42(9), 1273-1280.
- Davis, P. H., (1965) *Flora of Turkey and the east Aegean islands*, Edinburgh University Press, Edinburg.
- Di Giorgio, C., Delmas, F., Tueni, M., Cheble, E., Khalil, T., Balansard, G., (2008). Alternative and complementary antileishmanial treatments: Assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14(2), 157–162.
- Dinda, B., Dinda, M., Kulsi, G., Chakraborty, A., Dinda, S., (2019). Therapeutic potentials of plant iridoids in Alzheimer's and Parkinson's diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 169, 185–199.
- Eckert, G. P., (2010). Traditional used plants against cognitive decline and Alzheimer disease. *Frontiers in Pharmacology*, 1, 1–10.
- Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., Eloff, J. N., (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 17(1), 133.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V.,&Featherstone, R. M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.

- Evergetis, E., Haroutounian, S. A., (2015). The Umbelliferae (Apiaceae) of Dioscorides annotated in *codex Neapolitanus Graecus* #1. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 549–566.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1664–1670.
- Fish, P. V., Steadman, D., Bayle, E. D., Whiting, P., (2019). New approaches for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(2), 125–133.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Gajbhiye, R. L., Ganapathy, A., Parasuraman, J., (2018). A review of α -glucosidase and α -amylase inhibitors for type 2 diabetes isolated from some important Indian medicinal plants. *Annals Of Clinical Pharmacology And Therapeutics*, 1(1), 1–10.
- Godswill, N., Frank, N. G., Edson, M. J., Emmanuel, Y., Martin, B. J., Hermine, N., Kingsley, T., (2014). GC-FID method development and validation parameters for analysis of palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) fatty acids composition. *Research in Plant Sciences*, 2(3), 53–66.
- Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., Amri, M., (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 154–158.
- Hajizadeh-Sharafabad, F., Varshosaz, P., Jafari-Vayghan, H., Alizadeh, M., Maleki, V., (2020). Chamomile (*Matricaria rutita* L.) and diabetes mellitus, current knowledge and the way forward: A systematic review. *Complementary Therapies in Medicine*, 48.
- Heywood, V., Brummitt, R., Culham, A., (2007). *Flowering Plant Families of the World*. , Ed. V. Heywood, R. Brummitt, & A. Culham,. Ontario: A Firefly Book.
- Hung, T. M., Na, M., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D., Song, K. S., Bae, K., (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 188–192.
- Kamte, S. L. N., Ranjbarian, F., Cianfaglione, K., Sut, S., Dall'Acqua, S., Bruno, M.,

- Petrelli, R., (2018). Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 154–165.
- Karagöz, A., Artun, F. T., Özcan, G., Melikoğlu, G., Anil, S., Kültür, Ş., Sütülpinar, N., (2015). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of some plant methanol extracts. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(6), 1184–1189.
- Karimi, E., Abbası, S., Aidy, A. L. I., Ghaneialvar, H., Mohammadpour, S., Akhavan, M. M., & Abbası, N., (2019). Anti-diabetic effect of a novel nano polymer of thymol in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(5), 81-89.
- Koşar, M., Göger, F., Başer, K. H. C., (2008). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(7), 2369-2374.
- Koşar, M. Göger, F. Başer, K. H. C., (2011). *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chemistry*, 129, 374-379.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217–233.
- Long, J. M., Holtzman, D. M., (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179(2), 312–339.
- Manandhar, S., Luitel, S., Dahal, R. K., (2019). *In vitro* antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019, 1-5.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402–414.
- Masondo, N. A., Stafford, G. I., Aremu, A. O., Makunga, N. P., (2019). Acetylcholinesterase inhibitors from southern African plants: An overview of ethnobotanical, pharmacological potential and phytochemical research including and beyond Alzheimer's disease treatment. *South African Journal of Botany*, 120, 39–64.
- Mbese, Z., Aderibigbe, B. A., (2018). Biological efficacy of carvacrol analogues. *Recent*

- Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 13(3), 207–216.
- Memariani, Z., Moeini, R., Hamed, S. S., Gorji, N., Mozaffarpur, S. A., (2018). Medicinal plants with antithrombotic property in Persian medicine: a mechanistic review. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 45(1), 158–179.
- Miliauskasa, G., Venskutonis, P. R., Beek, T. A., (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., Bakri, M. M., (2018). Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 361–366.
- Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Tae, H. Al, Azimullah, S., Ojha, S. K., (2017). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: Prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 1–34.
- Nakatsu, T., Lupo, A. T., Chinn, J. W., Kang, R. K. L., (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 571–631.
- Önenç, S. S., Aç, Z., (2005). Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46(1), 50–55.
- Patel, C., Satyanand, T., Nirmala, H., Jaya, Y., Sachchidanand, P., Satya, P. S., Pratap, S., (2013). Antioxidant Activity of herbal plants: a recent review. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 1(8), 1–8.
- Payan, F., (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 12; 1696(2), 171-80.
- Peña-Bautista, C., Vento, M., Baquero, M., Cháfer-Pericás, C., (2019). Lipid peroxidation in neurodegeneration. *Clinica Chimica Acta*, 497, 178–188.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Predoi, G., (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Rabel, F., Sherma, J., (2017). Review of the State of the Art of Preparative Thin Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*,

40:4, 165-176.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Saleem, F., Sarkar, D., Ankolekar, C., Shetty, K., (2017). Phenolic bioactives and associated antioxidant and anti-hyperglycemic functions of select species of Apiaceae family targeting for type 2 diabetes relevant nutraceuticals. *Industrial Crops and Products*, 107, 518–525.
- Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Merah, O., (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products*, 109, 661–671.
- Shivatare, R. S., Nagore, D. H., Nipanikar, S. U., (2013). HPTLC an important tool in standardization of herbal medical product: A review. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 2(6), 1086–1096.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., Dhaka, N., (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods In Enzymology*, 299, 152-178.
- Tabb, K. M., Perez-Flores, N., Wang, Y., Huang, H., (2017). The burden of suicidal ideation among persons with type II diabetes: A scoping review. *Journal of Psychosomatic Research*, 103, 113–118.
- Talesa, V. N., (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(16), 1961–1969.
- Tamokou, J. de D., Mbaveng, A. T., Kuete, V., (2017). Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables. in V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* içinde (ss. 207–237). Elsevier Inc.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., (2010). Natural Products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(4), 315–331.
- Wagner, H., & Bladt, S., (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*.

- Springer Science&Business Media, Germany, 2nd Edition, 2001.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Li, H. Bin., (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 20–31.
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L., (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.
- Yang, X. W., Huang, M. Z., Jin, Y. S., Sun, L. N., Song, Y., Chen, H. S., (2012). Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia*, 83, 1169–1175.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G., (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66.
- Yildiz, S., Turan, S., Kiralan, M., & Ramadan, M. F., (2021). Antioxidant properties of thymol, carvacrol, and thymoquinone and its efficiencies on the stabilization of refined and stripped corn oils. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(1), 621-632.
- Zengin, G., Mahomoodally, M. F., Paksoy, M. Y., Picot-Allain, C., Glamocilja, J., Sokovic, M., Custodio, L., (2019). Phytochemical characterization and bioactivities of five Apiaceae species: Natural sources for novel ingredients. *Industrial Crops and Products*, 135, 107–121.

http-1

<https://www.studyandscore.com/studymaterial-detail/apiaceae-umbelliferae-general-characters-distribution-important-plants-economic-importance-floral> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-2

<https://kocaelibitkileri.com/lagoecia-cuminoides/> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-3

<http://flora.org.il/en/plants/LAGCUM/> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-4

http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/media/38d2a913-0378-48c1-9950-79e7ce463a01 (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-5

<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2747356> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-6

http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=4075 (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-7

<https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-8

<https://www.longdom.org/proceedings/chemical-composition-antioxidant-and-in-vitro-alphaamylase-inhibitory-assays-of-aqueous-extracts-decoction-and-infusion--35987.html> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-9

<https://www.iso.org/standard/43172.html> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

http-10

<https://www.camag.com/applications/application-Notes> (Erişim Tarihi: 02/07/2021)

TEZ İLE İLGİLİ YAYINLAR



XXIII. BİTKİSEL İLAÇ HAMMADDELERİ TOPLANTISI

BİHAT 2018
9-12 NİSAN 2018
PROGRAM ve BİLDİRİ ÖZETLERİ

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Editör
Prof. Dr. Didem DELİORMAN ORHAN

***Lagoecia cuminoides* L. Bitkisinin Antioksidan ve Antidiabetik Aktivite Açısından Değerlendirilmesi**

Ceyda Afşin Berdanoğlu¹, Süleyman Yur², Temel Özek^{1,2}, Safnaz Elmasulu³, Ahu Çınar⁴, Gökhan Deniz⁵, Gülmira Özek¹

¹Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir-Türkiye

²Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM), Eskişehir-Türkiye

³Akdeniz Üniversitesi Korkuteli Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Korkuteli-Antalya-Türkiye

⁴Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gıda Teknolojisi ve Tıbbi Aromatik Bitkiler Bölümü, Aksu-Antalya-Türkiye

⁵Akdeniz Üniversitesi Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Kampus, Antalya-Türkiye

Bu çalışma kapsamında *L. cuminoides* bitkisi Antalya bölgesinde toplanıp, kök, yaprak ve çiçek durumu kısımları %80 sulu metanol ile maserasyona tabi tutulmuştur. Çiçek durumu kısımları hidrodistilasyona tabi tutularak uçucu yağları elde edilmiştir. Uçucu yağların kimyasal kompozisyonları GC/FID ve GC/MS teknikleriyle araştırılmıştır. Ekstre ve uçucu yağların serbest radikal süpürücü etkileri, model serbest radikallere (DPPH• ve ABTS•+) karşı değerlendirilmiştir (1,2). Ayrıca, uçucu yağ ve ekstraların antidiyabetik etkilerini değerlendirmek amacıyla α -amilaz enzim inhibisyonu testi uygulanmıştır (3).

Uçucu yağın ana maddeleri timol (%85.7- 28.8), g-terpinen (%56.8-8.4) ve *p*-simen (%9.4-4.8) olarak saptanmıştır. Teste tabi tutulan numunelerin arasında, meyve ve yaprak ekstraları DPPH radikaline karşı en yüksek inhibisyon değerini gösterirken (IC_{50} 0.06 mg/mL), Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite değeri ise en yüksek olarak çiçek durumu kısımlarının uçucu yağında saptanmıştır (TEAC 2.59 mM).

Numunelerin pankreatik α -amilaz'ı inhibe etme etkilerinin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, *L. cuminoides* bitkisinin biyolojik potansiyeli araştırma konusu olarak ilk kez ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *L. cuminoides* bitkisinin antioksidan etkili fitokimyasalların potansiyel kaynağı olduğu saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Williams, W.B., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT - Food Sci. Technol., 1995, 28(1), 25-30.
2. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Rad. Biol. Medicine, 1999, 28(9-10), 1231-1237.
3. Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., *Sideritis galatica* Bomm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's's and diabetes mellitus, J. Function. Foods, 2014, 11, 538-547.



Eczacılık Fakültesi

2. Ulusal Marmara ECZACILIK KONGRESİ



14-16
KASIM 2018

Kadıköy Belediyesi
Kozyatağı Kültür Merkezi

etkinlik.marmara.edu.tr/umek-2



eczacı



***Lagoecia cuminoides* L. uçucu yağ ve ekstresinin HP-TLC tekniği ile antioksidan aktivitelerinin araştırılması**

Ceyda AFSİN BERDANOĞLU^{1*}, Gülmira ÖZEK¹, Temel ÖZEK^{1,2}, Safnaz ELMASULU³, Ahu ÇINAR⁴, Gökhan DENİZ⁵

¹Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognози Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye.

²Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM), 26470 Eskişehir Türkiye.

³Akdeniz Üniversitesi, Korkuteli Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı 07800 Korkuteli, Antalya, Türkiye.

⁴Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gıda Teknolojisi ve Tıbbi Aromatik Bitkiler Bölümü 07110 Aksu, Antalya, Türkiye.

⁵Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı Kampus 07058 Antalya, Türkiye.

*ceydaafsinb@gmail.com

Lagoecia cuminoides L. bitkisi Apiaceae familyasına ait Akdeniz bölgesinde yetişmekte olan *Lagoecia* cinsinin tek temsilcisidir [1]. *L. cuminoides* halk arasında “pülüşkün” adıyla bilinmektedir [2].

Bu çalışma kapsamında *L. cuminoides* bitkisi Antalya bölgesinden toplanıp, kök, yaprak ve meyve kısımları % 60 sulu metanol ile ayrı ayrı maserasyona tabi tutulmuştur. Meyveleri hidrodistilasyona tabi tutularak uçucu yağı (%1.685,1.4591 verim ile) elde edilmiştir.

Elde edilen uçucu yağ ve ekstratlar farklı hareketli fazlarda TLC uygulanarak bileşiklerin ayrımı için uygun mobil faz seçimi yapılmıştır. Ekstre için mobil faz olarak toluen: etil asetat: formik asit: su (5:100:10:10), uçucu yağ için ise hekzan: etil asetat (85:15) seçilmiştir. Seçilen hareketli fazlarla HP-TLC tekniği ile kromatografik ayırım gerçekleştirilmiştir [3].

L. cuminoides ekstre ve uçucu yağın üzerinde biyootografi tekniği uygulanarak DPPH* radikalini süpürme etkisi araştırılmıştır. *L. cuminoides* antioksidan aktivitesinin fenolik bileşiklerden kaynaklandığı görülmüştür. Çalışma kapsamında *L. cuminoides*’ in antioksidan etkileri ilk kez HP-TLC tekniği ile incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lagoecia cuminoides* L.; uçucu yağ; ekstre; TLC; HP-TLC; antioksidan etki.

Kaynaklar

[1] Hedge, IC, Lamond, JM. *Lagoecia cuminoides*, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Cilt 4. Edinburg University Press. 1984.

[2] <http://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/liste.php>

[3] CAMAG Application Note, HP-TLC screening method for antioxidant properties of substances in various matrices using DPPH, https://www.camag.com/en/tlc_hp/tlc/camag_laboratory/methods.cfm



12th International
SYMPOSIUM ON
PHARMACEUTICAL
SCIENCES
JUNE 16-19, 2018 ANKARA, TURKEY



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This to certify that

Ceyda Afşin Berdanoglu

has attended the 12th International Symposium
on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), held from
June 26th to 29th, 2018, in Ankara, Turkey

A stylized signature in black ink.

Symposium Chair
Prof. Dr. Gülbün ÖZÇELİK KAY