

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EKİM 2017

Yüksek Lisans-Biyoloji Bölümü

ZEYNEP ÖZBAY

Rosmarinus Officinalis'ın BİYOLOJİK
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYNEP ÖZBAY
EKİM 2017

***Rosmarinus Officinalis*'in Biyolojik Aktivitesinin
Araştırılması**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Zeynep ÖZBAY

EKİM 2017



© 2017 [Zeynep ÖZBAY]

T.C.

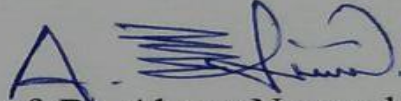
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: *Rosmarinus Officinalis*'in Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması

Öğrencinin, Adı Soyadı: Zeynep ÖZBAY

Tez Savunma Tarihi: 03/10/2017

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Tez Danışmanı

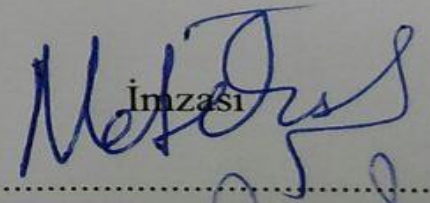
Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

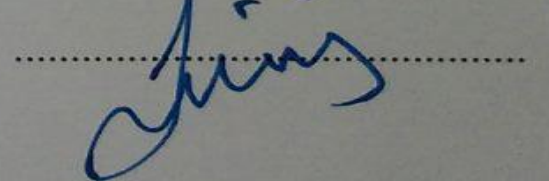
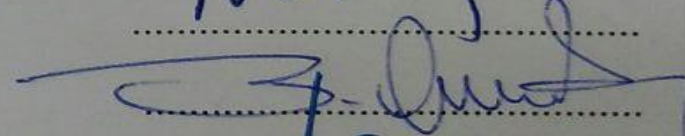
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Yrd. Doç. Dr. Sibel BAYIL OĞUZKAN



İmzası



İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Zeynep ÖZBAY

ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITY RESEARCHES OF *Rosmarinus Officinalis*

ÖZBAY, Zeynep

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

September 2017

65 pages

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), a medicinal and aromatic plant, is an antioxidant plant of the Lamiaceae. In this study, rosemary were collected from Gaziantep province (Southeastern of Turkey) and dried in the shade under appropriate conditions. The extracts of hexane, dichloromethane, methanol and extract were obtained from rosemary under appropriate conditions. Extracts from different solvents were evaluated for their oxidative status, DNA protective activity, antimicrobial properties, total flavonoid (TAS, TOS) and antipyretic activity (DPPH) were used to determine the oxidant status of rosemary. PBR322 plasmid DNA and UV-C method were used for DNA-protecting activity. In order to measure antimicrobial activity, microdilution method was preferred according to the CLS guideline

As a result of this research, it was obvious that the herb extract had a maximal free radical scavenger effect at a concentration of 0.02 µg / ml and it was found to be around 75%. This has a protective effect against hydrogen peroxide and UV_C. The antimicrobial effect was not detected in our extracts obtained from rosemary. High phenolic and flavonoid components are found to be in the extract of rosemary. As a result of this study, rosemary plant has active compounds in antioxidant, phenolic, flavonoid contents and DNA protecting properties.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, antimicrobial activity, biological activity, DPPH, pBR322, H₂O₂, UV-C, DNA

ÖZET

Rosmarinus Officinalis'in BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZBAY, Zeynep

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticileri: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Ekim 2017

65 sayfa

Tıbbi ve aromatik bitkilerden biri olan biberiye, Lamiaceae familyasındaki antioksidan özelliğe sahip bir bitkidir. Bu çalışmada, biberiye (*Rosmarinus officinalis*L.) bitkisi Gaziantep ilinde yetişen türlerinden toplanıp uygun koşullarda gölgede kurutulmuştur. Biberiye bitkisinin uygun koşullarda hekzan, diklorometan, metanol ve su özütleri elde edilmiştir. Farklı çözücülerden elde edilen ekstraktlarda oksidan durumları, DNA koruyucu aktivite, antimikrobiyal özelliği, toplam flavonoid miktarları, toplam fenolik madde miktarları gibi bazı biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Biberiye bitkisinin oksidan durumlarını belirlemek amacı ile Rel Assay Diagnostics kitleri (TAS, TOS) ve antiradikalik aktivite tayini için de DPPH yöntemi kullanılmıştır. DNA koruyucu aktivite için pBR322 plazmid DNA'sı ve UV-C yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivitesinin ölçülmesi için CLS klavuzuna uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi tercih edilmiştir.

Bu araştırma sonucunda; Hekzan özütünün 0.02 µg/ml konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin % 75 civarlarında olduğu açıkça görülmüştür. Biberiye bitkisi DNA'yı Hidrojen peroksit ve UV_C'ye karşı koruyucu etki göstermiştir. Biberiye bitkisinden elde edilen özütlerimizde antimikrobiyal etki saptanmamıştır. Ayrıca en yüksek fenolik ve flavonoid bileşenlerinin biberiye bitkisinin su özütünde olduğu görülmektedir. Bu çalışma sonucunda biberiye bitkisinin antioksidan, fenolik, flavonoid içerikleri ve DNA 'ya karşı koruyucu özellikte aktif bileşiklere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Rosmarinus officinalis*, antimikrobiyal aktivite, biyolojik aktivite, DPPH,pBR322, H₂O₂, UV-C, DNA

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince her konuda desteğine ve yardımına ihtiyaç duyduğum Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden birinci tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN 'a

Laboratuar çalışmalarında ve tez yazımında yardımlarımı esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr Sibel BAYIL OĞUZKAN 'a ve Sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ 'a

Ayrıca deneysel çalışmalarına bilgi ve tecrübeleriyle destek veren, yol gösterici olan Bekir Sıddık KURT, Doç. Dr. Işık DİDEM KARAGÖZ, Yüksek Biyolog Neşe ERDOĞAN 'a

Ve değerli aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. BÖLÜM 1.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Tıbbi Bitkiler Tarihi.....	2
1.3. Tıbbi Aromatik Bitkiler	4
1.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> türünün Botanik Bilgileri	5
1.4.1. <i>Lamiaceae</i> familyası	5
1.4.2. <i>Rosmarinus</i> L. cinsi	7
1.4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L	8
1.5. Bitkisel Sekonder metabolitler	11
1.5.1. Fenolik Bileşikler	13
1.6. Reaktif Oksijen Türleri, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	16
1.6.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Endojenik Kaynakları.....	17
1.6.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Ekzojen Kaynakları.....	18
1.7. Antioksidanlar	19
1.7.1. Biyolojik Sistemlerdeki Antioksidan Enzimler	21

1.7.2. Enzimatik Olmayan Oksijen İndirgeyici Ajanlar	22
1.8. DNA Koruyucu Aktivite.....	22
1.9. Antibakteriyal Aktivite	23
BÖLÜM 2	25
LİTERATÜR ÖZETLER.....	25
BÖLÜM 3	28
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> 'in Toplanması ve Teşhisi	28
3.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> Özütlerinin Eldesi	28
3.2.1. Materyal	28
3.2.2. Bitki Özütlerinin Hazırlanması.....	29
3.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Parametreler ve Metodlar	29
3.3.1. DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi Yöntemi Kullanılarak Antioksidan Aktivite Belirlenmesi.....	29
3.3.1.1. Materyal	29
3.3.1.2. DPPH Çözeltisi Hazırlama	30
3.3.1.3. Protokol	30
3.3.1.4. Prensibi.....	30
3.3.2. Total Antioksidan Aktivitesinin ABTS Yöntemi ile Belirlenmesi.....	31
3.3.2.1. Materyal	31
3.3.2.2. Protokol	31
3.3.2.3. Prensibi.....	32
3.3.3. Total Oksidan Seviye (TOS) ile Antioksidan Aktivite	32
3.3.3.1. Materyal	32
3.3.3.2. Standart çalışma solüsyonunun hazırlanması (Standard 1)....	33
3.3.3.3. Protokolü	33
3.3.3.4. Prensibi	34

3.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> Bitki Özütlerrinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.4.1. Antimikrobiyal Test Organizmaları.....	34
3.4.2. Kullanılan Bakteri Suşları	34
3.4.3. Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi Protokolü ve Materyali.....	36
3.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> 'in Toplam Fenolik Tayini	37
3.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini	37
3.5.1.1. Materyal	37
3.5.1.2. Protokol	37
3.5.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini	33
3.5.2.1. Materyal	33
3.5.2.2. Protokol	33
3.6. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplanması	39
3.7. <i>Rosmarinus officinalis</i> Bitki Özütlerrinin DNA Koruyucu Aktivitesinin Belirlenmesi	39
3.7.1. Materyal	39
3.7.2. Protokol	39
3.8. <i>Rosmarinus officinalis</i> ve Kontrol özütlerrinin hazırlanması	40
BÖLÜM 4	42
4. BULGULAR	42
4.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> DPPH, TAS VE TOS Aktivite Bulguları	42
4.1.1. DPPH Grafikleri	42
4.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> TAS ve TOS değlerleri	47
4.2.1.TOS değlerleri	47
4.2.2.TAS değlerleri	48
4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> Antimikrobiyal Aktivite Değlerleri	51
4.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> Flavonoid Grafiğı ve Değlerleri	51
4.4.1. Flavonoid Değlerleri ve Grafiğı	52

4.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> Fenolik Grafiği ve Değeleri	54
4.6. Biberiye Özütlerrinin DNA Koruyucu Aktivite Bulguları	56
5. BÖLÜM	56
TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	61



TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Lamiaceae familyasının vejetatif ve çiçeksel özellikleri	7
Tablo 1.2: <i>Rosmarinus officinalis</i> teşhis edici karakterleri.....	10
Tablo 1.3: Oksidanlar ve formülleri	17
Tablo 1.4: Enzimatik olmayan antioksidanlar ve etkiledikleri oksidan madde	22
Tablo 3.1: Bakteriler ve kodları	34
Tablo 4.1: <i>Rosmarinus officinalis</i> özütlerine ait TOS değerleri	47
Tablo 4.2: TOS referans değerleri.....	48
Tablo 4.3: <i>Rosmarinus officinalis</i> özütlerine ait TAS değerleri	49
Tablo 4.4: TAS referans değerleri.....	50
Tablo 4.5: TAS-TOS-OSİ- IC ₅₀ değerleri.....	51
Tablo 4.6: 50 mg bitki özütlerinin flavanoid absorbans değerleri	52
Tablo 4.7: 50 mg bitki özütlerinin fenolik absorbans değerleri.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	10
Şekil 1.2: Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	14
Şekil 1.3: Flavanoidler A:flavanoidler B:isoflavanoidler C:neoflavanoidler	14
Şekil 1.4. Benzozik ve sinnamik asit türevlerinin moleküler yapısı.....	15
Şekil 4.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> -hekzan özütü DPPH grafiği	43
Şekil 4.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> -diklorometan özütü DPPH grafiği.....	44
Şekil 4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> -metanol özütü DPPH grafiği.....	45
Şekil 4.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> -su özütü DPPH grafiği	46
Şekil 4.5. TAS-TOS-OSİ- IC ₅₀ değerleri.....	51
Şekil 4.6. Flavanoid Grafiği	53
Şekil 4.7. Fenolik Grafiği	55
Şekil 4.8. DNA Koruyucu Aktivite.....	56

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

%	Yüzde
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit)
BHA	Bütillenmiş hidroksianizol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
C°	Santigrat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EMB	Eozin Metilen Blue
FRAP	Antioksidan Gücü Yöntemi
mg	miligram
MHA	Müeller Hinton Agar
ml	Mililitre
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nm	nanometre
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
RNA	Ribonükleik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
SSSS	Stok stabilize standart çözeltisi
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TBHQ	Tert-Butil-Drokinon
TEAC	Trolox-eşdeğer antioksidan kapasitesi

TOS	Total Oksidan Seviyesi
UV	Ultraviyole
μ l	mikrolitre



1. BÖLÜM

1.1. Giriş

Bitkiler senelerdir insan sağlığı ve yaşam kalitesini artırmak için kullanılmaktadır. Türkiye sahip olduğu bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden birisidir. Ülkemizde çok sayıda kültür bitkisinin yetişmesine uygun iklim koşulu ve toprak yapısı bulunmaktadır. Ülkemizde yaklaşık 174 familyaya ait 1251 cins ve 12000 tür ve alttür bitki, kayıtlarda olmakla birlikte bundan daha geniş bir bitki örtüsü dağılımı göstermektedir. Yaklaşık 500 kadarı tıbbi olarak kullanılabilen bu bitkilerin 200 tanesi hem tıbbi hem de aromatik amaçlı kullanılmakta ve ihraç edilmektedir (Erik ve Tarıkahya, 2004).

Lamiaceae familyasında önemli aromatik ve tıbbi bitkisi olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Tükçede akpüren, kuşdili ve hasalbal farklı isimlerle de ifade edilmektedir (Begum ve ark., 2013). Biberiye çalı görünüşte, soluk mavi renkli ve her dem yeşil kalmasını başaran, 50-100 cm yüksekliğindeki bir bitkidir (Baytop, 1984). Biberiye' nin yetiştirme sahası Akdeniz ikliminin hâkim olduğu yabani yerlerdir (Ceylan, 1987). Dünya'da geniş kullanım alanına sahip olan biberiye süs bitkisi, aromatik ve tıbbi bir bitki olarak bilinmektedir. Çok büyük bir miktarı doğadan toplanan biberiyenin ülkemizde ve İspanya ile Fransa' da büyük bir yetiştirme sahası bulunmaktadır. Odun dışı orman ürünleri kategorisinde yer alan biberiye, Türkiye'nin batı kıyı şeridi ve güney kesiminde yetiştirilmektedir. 2013 yılı üretim miktarı 172 ton iken 2014 yılında, bu oran 758 tona yükselmiştir. (Kırııcı, 2015). Amerika ve Avrupa'da antioksidan olarak kullanıma sunulan biberiye (Bozin ve ark., 2007) ülkemizde tek ticari bitki olmasından ötürü yetiştiriciliği yapılagelen bir bitkidir.

Biberiyenin sekonder metabolitlerinin etkilerinin ölçümü üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda; antimikrobiyal, insektisit (Jordan ve ark., 2013), antioksidan (Hussain ve ark. 2010) ve antikanser (Bai ve ark., 2010), etkileri olduğu belirtilmiştir.

Biberiye üzerine yapılan birçok çalışmada bileşenleri ve uçucu yağ miktarlarının çok büyük farklılıklar gösterdiği görülmektedir (Gülbaba ve ark., 2002). Bileşenlerinin ve uçucu yağ miktarının göstermiş olduğu bu farklılıklar; depo süresi, agronomik koşullar, bitkinin bulunduğu gelişim dönemi ve bitkinin yaşı ile hasat edilen organ gibi birçok faktörden etkilendiği bilinmektedir (Gurbuz ve ark., 2015).

İnsan sağlığı açısından sentetik antioksidanların toksik etkileri olabileceği gerçeğinden sonra bitkisel antioksidanlara olan talep artmıştır (Malayoğlu, 2010). Kalite faktörlerinin araştırılması bakımından bilinen antioksidan içeriği ile yeni antioksidan bitkilerin içeriği hakkında yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Antioksidan içeriğinin belirlenmesi için biberiye bitkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Gurbuz, 2015). Fakat yeterli koşullar sağlanamadığı için bitkiden standart bir antioksidan elde edilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, biberiye bitkisinin su, diklormetan, hekzan, metanol özütleri hazırlanarak DPPH yöntemi ile serbest radikal giderici aktivitesi, Rel Assay kitleri kullanılarak total antioksidan kapasiteleri, total oksidan kapasiteleri, pbr322 Plazmid DNA'sı kullanarak DNA koruyucu etkileri, fenolik ve flavanoid bileşenleri, CLS klavuzuna uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile Antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır.

Elde edilen bilgiler ile biberiyenin biyolojik aktivitesi belirlenmiş ve biberiyenin DNA üzerinde koruyucu etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Yine biberiye bitkisinin UV ışınına ve H₂O₂'nin DNA üzerine hasar verici etkilerine karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak biberiye bitkisinin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu ortaya konulmuş, aynı zamanda antimikrobiyal etkisi saptanmamıştır.

1.2. Tıbbî Bitkiler Tarihi

Tarihin en eski çağlarından bu yana, dünyanın neredeyse her yerinde insanlar bitkiler hakkındaki bu ilginin, hangi bitkilerin tıbbi ve zehirli, hangi ağaçların inşaat ya da silahlar için uygun olduğunu ya da besin değeri taşıyan bitkileri sınıflandırarak kullanımlarını kolaylaştırmıştır. Erken çağlarda insanlar zihinlerini kullanmaktan çok içgüdüsel davranmaktaydılar. Nasılki bir hayvan günümüzde kendisi için kullanışlı otlar seçiyorsa, insanlar ilk etapta bitkileri zararlı-

zararsız, zehirli-zehirsiz diye gruplandırmıştır. Dün olduğu gibi bugün de bu saha çalışmalarına dayalı olarak daha modern ve daha sistematik bulgulara ulaşarak bitki sınıflandırılması yapılarak bitkilerden azami derecede fayda sağlama amacı güdülmektedir.

Eski devirlerde tedavide günahlardan temizlenme hastalık ise ilâhi bir ceza olara kabul edilmekteydi. Mümkün olduğu kadar tedavide şifalı ilâç bulmaya çalışılırdı. Mısır, Roma, Çin, Hindistan ve Yunan gibi eski kültür merkezlerinde yazılmış Tıbbi bitkiler üzerine Orta Avrupa'da eserler bulunmaktadır. Arpa ve buğday kültürü üzerine M.Ö. V. asırda araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Mezar duvarları ve mabetlerdeki resimlerden M.Ö. IV. asırda Mısır'da tıbbi ve faydalı bitkilerin kültürü yapıldığı görülmektedir. Bugün eski bir medeniyeti olan Sümerlerin de soğan, susam ve arpa ile hurma yetiştirdikleri bilinmektedir. Çin kültüründe yine aynı şekilde buna benzer gelişmenin olduğu görülmektedir. M.Ö. 2700 yılında Çin imparatoru Chen-Nung'un buğday, soğan ve pirinç ekiminde her yıl merasim yaptığı bilinmektedir (Karamanoğlu, 1973: 3).

İnsanlar uygarlık ilerledikçe bitkilerle faydalanma dışında manevi yönüyle de ilgilenmişlerdir. Bir kısım bitkiler bazı kavimler tarafından mukaddes olarak kabul edilmiş ve Allah' a tapar gibi tapmışlardır. Yavaş yavaş yeşil bitki ve çiçek sevgisinin de arttığı görülmektedir. Örneğin, süs amacı olarak Mısır abidelerinin sütunlarında çiçek veya çiçek demeti örneklerine rastlanmaktadır. Bitkilerin sayısı çoğalınca insanlar bitkileri adlandırarak birbirinden ayırmışlardır. Örnek olarak, tıbbi bitkiler kullanıldığı hastalık, faydalanma şekli yönünden sınıflandırılmıştır. Tarımsal amaçlar için kullanılan bitkiler ise faydalanma şekli ve adına göre sistematikte yerini almıştır. (Karamanoğlu, 1973: 3-4).

Tıbbi bitkiler konusunda en eski ve en önemli belge M.Ö. 1550'li yıllarda yazılmış Papyrus Ebers'dir. Güzelce yazılmış ve iyi muhafaza edilmiş Papyrus ruleleri 20m den daha az olmayıp, üzerinde mineral bitki ve hayvanlar âleminden elde edilen 700 Drog ile 811 reçete bulunmaktadır. Burada hastalığın çeşidi, gerekli olan ilâç miktarı, hazırlanması, tıpkı günümüzdeki gibi açık ve doğru bir şekilde yazılmıştır. Eser, Mısır tıbbı hakkında geniş bilgi veren önemli bir belgedir (Karamanoğlu, 1973: 5).

Saf Botanik üzerine yazılmış en eski eser, Aristonun öğrencisi Theophrastus (M.Ö. 372-285) tarafından yazılmıştır. Botaniğin babası olarak tanınan bu ünlü Yunanlı filozofun, bu alanda en önemli eseri: 5 ciltlik "Historia plantarum" (Bitkiler tarihi)dir. Theophrastus 500 kadar bitkiyi incelemiş ve onları çiçek yapılarına hayat formlarına göre:

1. Ağaç

2. Ağaççık

3. Yarım ağaççık

4. Otlar, yıllık, iki yıllık, çok yıllık olarak gruplara ayırmıştır.

(Karamanoğlu, 1973: 6).

Eserinde, tedavi maddeleri üzerinde kendi bilgisine ek olarak, seyyah ve satıcılardan öğrendiklerini de toplu olarak yazmıştır. İlk botanik kitabı olarak tanınan bu eser, sonraki yazarlar tarafından da daima başvurulanan bir kaynak olmuştur. Fakat hastalıkların bitkilerle olan tedavi kısmı, kitabın diğer bölümleri arasında, en az yer almaktadır.

1.3. Tıbbi Aromatik Bitkiler

Tıbbi aromatik bitkiler insan hayatında önemli rol oynamaktadır ve sayısız çeşitleri bulunmaktadır. Tıbbi bitkiler dünyanın her yerinde resmi tıp sistemlerinde ve çeşitli geleneksel tıp sistemlerinde kullanılan bitkilerdir. Diğer bir deyişle tıbbi bitkiler insanların hastalıklarını önlemek, sağlığı düzenlemek ve tedavi aracı olarak kullandıkları bitkilerdir. Tıbbi bitkilerin tam bir tanımı yapmak mümkün değildir çünkü tıbbi bitkiler insan sağlığının yanı sıra bununla bağlantılı olan beslenme, vücut bakımı, tütsü ve ruhsal iyileşme gibi alanlarla da kullanılmaktadır. Aromatik bitkiler ise, aroması, kokusu ve tadı için kullanılan bitkilerdir. Bu bitkilerin birçoğu aromaterapide olduğu gibi diğer çeşitli tıp alanlarında da özel olarak tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

Bunun dışında parfüm yapımı için kullanılan *Petroselinum sativum*, *Anethum graveolens* gibi türleri de bulunmaktadır (Maiti ve Geetha, 2005).

Bu bilgiler doğrultusunda tıbbi ve aromatik bitkilerin tanımı yapılırsa, tıbbi ve aromatik bitkiler (Heywood, 1997):

- Hasta insan veya memelilerin fizyolojilerine etki eden bileşen ya da bileşenler ve aromatik esansiyel yağlar içeren bitkilerdir.
- Hastalıkların ve belirtilerinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Genel olarak insan sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahiptir.
- İçerdiği uçucu ve esansiyel yağlar parfüm yapımında, kozmetikte, tatlandırma ve insan kullanımının başka alanlarında da kullanılmaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısı tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda yaklaşık 13.000 tür olduğunu savunanlar da, 70.000 tür olduğunu savunanlar da bulunmaktadır. Ancak 70.000 tıbbi bitkinin içerisine algler, funguslar ve mikroorganizmalar da katılmış durumdadır ve bunlar bitkiler alemi üyeleri değildir. Yapılan çalışmalar mantık çerçevesi ve biyoloji konsepti çerçevesinde incelendiğinde ortalama 20.000 bitkinin tıbbi özellikli ve 1500 bitkinin de aromatik özellikli olduğu düşünülmektedir (Timiryazev, 2014)

1.4. *Rosmarinus officinalis* türünün Botanik Bilgileri

1.4.1. *Lamiaceae* familyası

Lamiaceae familyası dünyada birkaç bölge hariç dünyanın her yerinde bulunan kozmopolit bir familyadır. Kutuplardan Himayalar'a, Asya'nın güneyinden Hawai'ye kadar her tür habitat ve yükseklikte bulunmaktadır. Dikotiledonlar içerisinde evrimsel olarak en gelişmiş familyalarından biridir. Yaklaşık 250 cins ve 6500 adet tür içermektedir (Dönmez vd., 2011; Bağdat vd., 2014).

Ülkemizde en çok bulunan *Lamiaceae* familyası mensubu *Poaceae*, *Astericeae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae* ve *Fabaceae*'dir. Bu familyanın içerdiği 245 tür ülkemiz için endemiktir. Familya uzun boylu kereste yapılan ağaçlardan, adaçayı gibi tıbbi ve aromatik bitkilere kadar çok çeşitli bitkileri içermektedir (Dönmez vd., 2011; Bağdat vd., 2014).

Bu familya bitkileri otsu veya çalı formunda olup daha çok Akdeniz havzasında yayılış göstermektedir. Gövde 4 köşelidir. Yapraklar çoğunlukla basit, bazen parçalı, dekusat dizilişlidir. Çiçekler her nodusta verticillaster durumunda, zigomorf ve bilabialdır. Uçucu yağ taşıyan Labiatae tipi (sapı tek, başı 8 hücreli ve pul şeklinde) salgı tüyleri vardır. Çiçekler hermafrodit, kaliks 5 loblu, kalıcı, bazen bilabiattır. Korolla bilabiat, üst dudak bazen eksiktir. Stamen 4 tane, çoğu zaman didinamdır, bazen 2 stamen bulunur. Ovaryum 2 karpelli, 4 gözlü ve üst durumludur, her gözde 1 ovül bulunur, stilus ginobaziktir. Meyva 4 nukstan meydana gelen bir şizokarptır. Eczacılık ve parfümeride yararlanılan bitkileri içermesi nedeniyle önemli bir familyadır (Işık, 2010: 45).

Lamiaceae familyasında nane, adaçayı, oğulotu, kekik, fesleğen, lavanta gibi ekonomik önemi yüksek birçok tür bulunmaktadır. Bunun gibi familya mensubu birçok türden tarım ve sanayi alanlarında yararlanılmaktadır. Tıp ve eczacılıkta, bitkisel boyacılıkta, kozmetik sanayide, organik tarımda, gıda sanayide kullanılan birçok türü de bulunmaktadır (Bağdat vd., 2014).

Lamiaceae familyasının vejetatif karakterleri ve çiçek özellikleri aşağıda Tablo 1,1'de verilmiştir (Raja, 2012).

Tablo 1.1: *Lamiaceae* familyasının vejetatif ve çiçek özellikleri

Vejetatif Karakterler	
Habitat	Genellikle aromatik baharatlar ve çalılar, birkaç ağaç
Kök	Kazık kök
Gövde	Otsu, genellikle erekt (dik), karemsi ve tüylü
Yaprak	Basit, karşılıklı ve dekussat, stipulat, birkaç türde spiral şekilli, uçucu yağ salgılayan bezler var.
Çiçek Karakterleri	
İnfloresans	Vertisillaster
Çiçek	Biseksüel, düzensiz, zigomorfik, hipnogous
Kaliks	Beş adet, gamosepalli, bilabiat
Androecium	Dört adet, Epipetalus, genellikle iki set halinde, konat ağsı
Gynoecium	Bilokular, aksil plansentasyon, her lokulus da bir ovil, ginobazik, iki loblu stigma
Meyve	Şizokarpik karkerulus
Tohumlar	Non-endospermik

1.4.2. *Rosmarinus* L. Cinsi

Rosmarinus L. Cinsi bilimsel sınıflandırılması şu şekildedir (plant.usda.gov, 2002):

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Takım: *Lamiaceae / Labitae*

Cins: *Rosmarinus L.*

Güçlü aromatik özelliğe sahip her daim yeşil çalılardan oluşan cinsten yapraklar linear ve dar bir şekilde oblong, sapsız, deriye benzer ve döner kenarlıdır. Verticillaster olan inflorescens durumu birkaç çiçeğe sahiptir ve rasem benzeridir. Brakte bulunmaz. Kaliks kampanulat, bilabiat, üst dudak düz alt dudak iki lobludur. Korolla dışa doğru (exserted), üst dudak bifid (iki eşit parçalı), oldukça konkav ve çok uzun olmayacak şekilde 3 fidli. Stamenler 2 adet, uzun eke sahip, paralel, filamentler kenarda küçük diş şeklinde ve anterler monoteşik (monotheous). Olgunlaşmış bir şekilde sahip olan stamenler dallanmamış ve yukarı doğru kıvrık. Meyve nutlet, düz ve oval şekilli olabilir (Davis, 1982:75).

1.4.3. Rosmarinus officinalis L

Rosmarinus officinalis türünün bilimsel sınıflandırılması şu şekildedir (plant. usda.gov, 2002):

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Asteridae

Takım: *Lamiaceae / Labitae*

Cins: *Rosmarinus* L.

Tür: *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis, biberiye, Lamiaceae familyasına aittir ve Akdeniz bölgesine kökenlidir. Latince “ros” ve “marinus”, İngilizce “dew of the sea” anlamına gelen *Rosmarinus* deniz damlacığı, çiyi anlamına gelmektedir. 2001 yılında Uluslararası Baharat Birliği tarafından yılın baharatı seçilen biberiye, içerdiği sekonder metabolitler, yağlar ve besin değerleri ile oldukça önemli bir bitkidir (Begum vd., 2013).

Rosmarinus officinalis odunsu çok yıllık baharattır. Her daim yeşildir ve iğne benzeri yaprakları ile beyaz, pembe, mor ve mavi çiçekleri bulunur. Biberiyenin diğer teşhis edici özellikleri aşağıda Tablo 1.2.’de verilmiştir (Davis vd., 2013; Begum, 1982) .

Yurdumuzda doğal olarak yetişen biberiye (kuşdili, hasalban, akpüren) (*Rosmarinus officinalis* L.) önemli tıbbi ve aromatik bitki türümüzdür. Baytop (1984), biberiyeyi 50-100 cm yükseklikte, çalı görünüşünde, kışın yaprağını dökmeyen, çiçekleri soluk mavi renkli, çok yıllık bitki olarak tarif etmiştir. Genellikle maki florası içerisinde bulunan bu türümüz, Güney ve Kuzey-Batı Anadolu ve adalarda genel yayılışını yapmaktadır (Anonim, 1987). Mersin ve Adana yöresinde maki florası içerisinde, orman içi boşluklarda, tarla ve üzüm bağları kenarlarında, özellikle de koruma altındaki ağaçlandırma sahaları içerisinde yayılış göstermektedir.

Eski Yunan ve Romalılar tarafından çok iyi bilinen biberiye, hem mutfakta hem de tıbbi tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Hafızayı artırıcı etkisi olduğuna inanılarak “bağlılık” sembolü olarak kabul edilmiş ve düğün törenlerinde gelin tacına takılmıştır. Terapi etkisi antik çağlardan beri bilinmekte ve hasta odalarında yakılmak suretiyle havanın arındırılmasında kullanılmıştır (Işık, 2010: 47). Baytop (1984), biberiyenin, kabıza karşı, hazım sistemi uyarıcısı, safra arttırıcı ve idrar söktürücü olarak, haricen cerahatli yaraların tedavisinde, uçucu yağının ise romatizma ağrılarını dindirici olarak kullanıldığını belirtmiştir. Biberiye yaprağı tüm veya ufalanmış halde çorbalarda, güveçlerde, sosis, et, balık ve tavuk yemeklerinde tat verici olarak, uçucu yağı gıda maddelerinde, parfümeride ve

kozmetikte (sabun, krem, deodorant, saç tonikleri, şampuanlar vs.) kullanılmaktadır. Bitki ve ekstraktları antibakteriyel ve antioksidan etkiye sahip olup et ve yağların kalitesinin bozulmadan saklanması sağlamaktadır (Selin, 2010: 47).

Tablo 1.2: *Rosmarinus officinalis* teşhis edici karakterleri

Dallar	Yükselen ya da erect (dik), 50 cm
Yapraklar	10-25x1-2(-4) mm, koyu yeşil, alt kısmı tüylü ve üst kısmı beyaz tomentoz
Pedünkül ve Pedisel	Beyaz stellat ve tomentoz
Kaliks	3,5-4 mm, beyaz tomentoz
Korolla	Açık mavi, 8-12 mm
Meyve	Nutler, kahverengi



Şekil 1.1: *Rosmarinus officinalis* (Anonim, 2016)

Biberiye antioksidan özelliği çok yüksek bitkilerden biri olarak kabul edilmektedir. İçerdikleri esansiyel yağlar çok aktiftir. Flavonlar, diterpenler, steroidler ve triterpenler dahil birçok bileşenin izole edildiği biberiyenin antioksidan aktivitesi doğrudan içerdiği iki fenolik diterpen olan karnosik asit ve karnosolden gelmektedir (Genena vd., 2008).

İçerdiği aktif yağlar, borneol, bornil asetat, kamfen, sineol, pinene ve kamfor olan biberiye aynı zamanda antioksidan özellikleri ile merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve genitouriner sistemin de dahil olduğu birçok sorunun önlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Biberiyenin ayrıca 20'ye yakın varyetesi bulunmaktadır. Dik biberiye, sürünen biberiye, çam kokulu biberiye, arp biberiye, madaline tepesi biberiye, pembe biberiye, beyaz biberiye, altın yağmur biberiye bunlardan bazılarıdır (Begum vd., 2013).

Ülkemizde biberiye, Güneydoğu Anadolu bölgesinde Gaziantep yöresinde, Mersin Çiftlik köyü ve civarında, Adana'nın Tarsus ilçesi ve çevresinde, İskenderun'da Çamlıtepe'de 8850 hektarlık bir alanda yayılış göstermektedir. Genelde maki florasının içinde, ormanların iç boşluklarında, dağların kuru ve güneşli sırtlarında yabani olarak yetişmektedir. Ancak park ve bahçeler için süs ve kültür olarak da yetiştirilmektedir (Haksel, 2007).

1.5.Bitkisel Sekonder metabolitler

Bitki kimyasalları genel olarak primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler (karbonhidrat, yağlar ve proteinler gibi) doğada oldukça yaygındır ve yüksek bitkilerin tohum ve vejetatif dokularında fazlaca bulunmaktadır. Ayrıca hücre metabolizmasındaki temel görevlerinden dolayı, bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler (Oskay ve Oskay, 2008).

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilmektedir. Günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bu sekonder metabolitler, bitkinin yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan ilişkili olan primer metabolitler kadar önemli olan kimyasal maddelerdir. Bitkilerden sentezlenen sekonder metabolitlerin bitki yaşamında bazı rolleri vardır. Bunlar, hastalıklara karşı direnç sağlama, herbivorlardan korunma, kendileriyle rekabette olan diğer bitki türlerinden allelokimyasal ilişkiler şeklinde kaçınma ve UV ışığı gibi abiyotik stresten korunma olarak özetlenebilir (Aydın ve Mammadov, 2017).

Ayrıca bitkilerdeki sekonder metabolitler, hücre düzeyinde bitki büyüme düzenleyicileri, gen ekspresyon düzenleyicileri ve transdüksiyon mekanizmalarında

görevlidirler ve tozlanma için böcek gibi organizmaları çekerek simbiyotik ilişkilerde görev alırlar (Oskay ve Oskay, 2008).

Pek çok yüksek bitki, ekonomik açıdan önem taşıyan alkaloid, terpen, fenolik bileşikler, nadir amino grup asitler, bitki aminleri ve glikosidler gibi organik kimyasalları bünyesinde biriktirir ve ticari uygulamalara ham madde oluşturur. Doğal bitki ürünleri yani fitokimyasallar çok sayıda endüstride doğrudan veya dolaylı olarak kullanılır. Bu ürünler özellikle yağlar, resinler, taninler, saponinler, doğal plastikler, yapışkanlar, balmumu ve boyalar, ilaçların kaynağı şeklindedir (Oskay ve Oskay, 2008).

Sekonder metabolitlerin çoğu olumsuz çevre koşullarında ve stres koşullarında ortaya çıkmaktadır. Bu durum olumsuz gibi görünse de sekonder metabolit üretimini teşvik ettiğinden bilim insanları ve insanlık için pozitif etki olarak algılanmaktadır (Oluk, 2006).

Tıbbi ve aromatik bitkiler kokulu, uçucu, hidrofobik, hidrofilik ve yüksek konsantrasyonlu esansiyel yağlar içerirler. Bunlar, bitkilerin yapraklarından, dallarından, tohumlarından, çiçeklerinden, kabuklarından, odunlarından veya meyve köklerinden elde edilebilmektedir. Esansiyel yağlar, düşük kaynama sıcaklığına sahip fenilpropenler ve terpenlerden oluşan karmaşık ikincil metabolitlerdir. Esansiyel yağ içeren en önemli bitki familyaları *Asretaceae*, *Lamiaceae*, *Labiatae* ve *Apiaceae*'dir. Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen bu esansiyel yağ ve ekstraktların aktiviteleri ve kullanım amaçları aşağıda verilmiştir (Solomou vd., 2016):

- Aktiviteleri
 - Antioksidan aktivitesi
 - Antimikrobiyal aktivitesi
 - Antikoksidiyal aktivitesi
- Kullanımları
 - Beslenme takviyesi: antioksidanlar ve büyüme faktörleri gibi

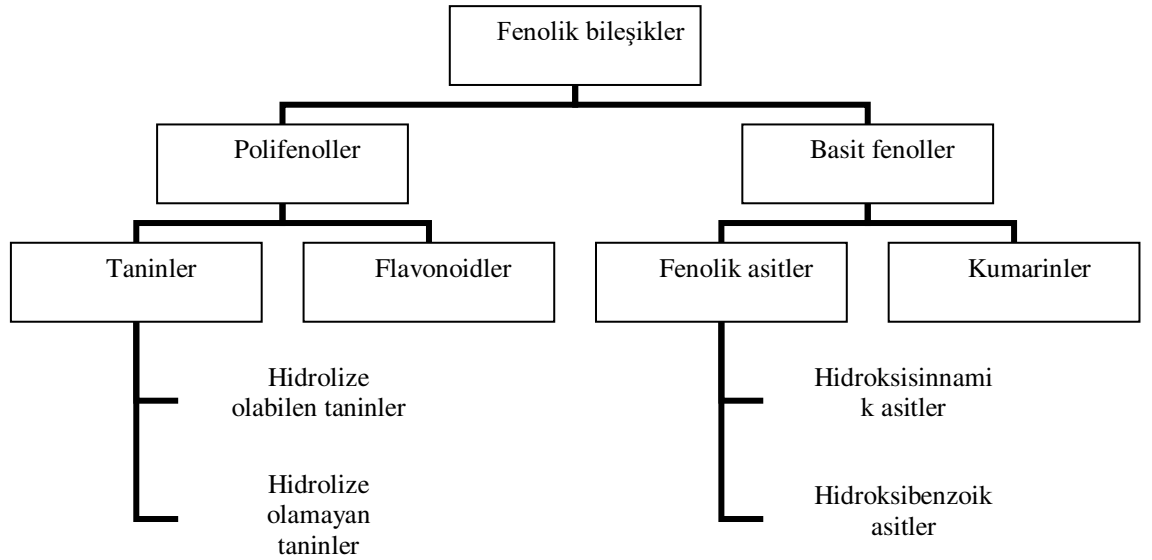
- Besin endüstrisi: Tatlar, lezzetler ve katkı maddeleri gibi
- Kozmetik endüstrisi: Parfümler ve cilt ürünleri gibi
- Farmasötik endüstri: ilaçlar gibi

Lamiaceae familyasında yapılan çalışmalarda şimdiye kadar terpenler, fenolik bileşikler, alkaloidler, iridoidler ve ursolik asit bulunmuştur (Agostini 2009). Çalışmamızda kullanılan sekonder metabolitlerden olan fenolik bileşikler, flavanoidler ve fenolik asitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

1.5.1. Fenolik ve Flavonoid Bileşikler

Bitki fenolikleri ya da polifenoller doğrudan fenilpropanoidler sağlayan shikimate ya da fenilpropanoid olarak adlandırılan metabolik yoldan veya basit fenoller üretebilen poliketit asetat/malonat yolundan biyolojik olarak sentezlenen doğal sekonder bileşiklerdir. Bu şekillerde ortaya çıkan sekonder monomerik ve polimerik fenolik bileşenler bitkilerde çok geniş fizyolojik rollere sahiptir. Yüksek bitkilerin birkaç bin kadar bilinen fenolik bileşikleri vardır. Bitki fenolik bileşikleri bitkilerin kendisi için çevre stresi, besin yetersizliği, düşük sıcaklık, patojen enfeksiyonu, yüksek ışık ve herbivorlar gibi etkenler için savunma mekanizmasıdır (Lattanzio, 2013).

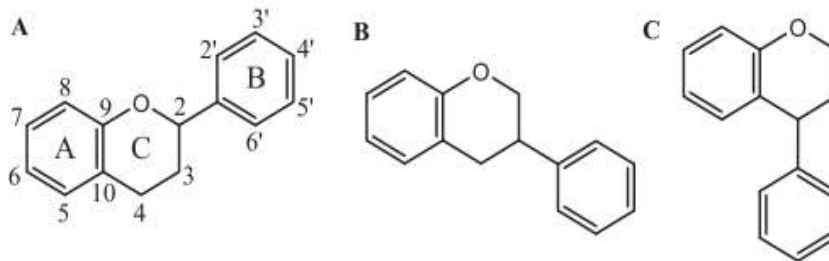
Bitki fenoller basit fenoller ve polifenoller olarak sınıflandırılabilir. Bunların sınıflandırılması aşağıda Şekil 1.1’de verilmiştir (Goleniowski vd., 2013).



Şekil 1.2:Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bilim insanları fenolik bileşenlerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştırmaya başlamıştır. Yaptıkları çalışmalarda fenolik bileşenlerin antioksidan etkilere sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Antioksidan bileşikler kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar dahil birçok hastalığın önlenmesinde çok önemlidir. Fenolik bileşikler doğrudan insan vücudunda üretilmediği için bu bileşenleri içeren besinlerin tüketimi ile vücuda alınmaktadır (Materska ve Perucka, 2005).

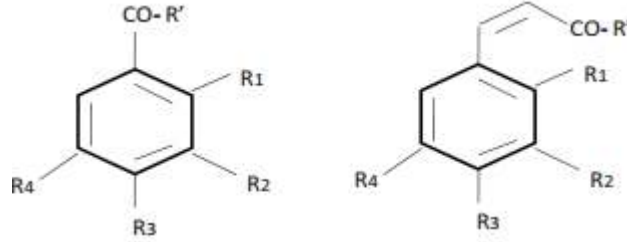
Fenolik bileşenler fenolik asitler ve flavanoidler olarak ele alınmaktadır. Flavanoidler fenolik bileşenlerin en önemli grubudur ve C6-C3-C6 omurgasından oluşmaktadırlar. Kendi içlerinde flavonoidler, isoflavanoidler ve neoflavanoidler olmak üzere 3'e ayrılmaktadırlar (Şekil 1.2) (Vihakas, 2014).



Şekil 1.3: Flavanoidler, A: flavanoidler, B: isoflavanoidler, C: neoflavanoidler

Diğer önemli grup olan genolik asitler ise C6-C1 omurgasından oluşurlar ve yaygın olarak gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, vanilik asit ve

sprinjik asit ile temsil edilirler. Fenolik asitler, şekerler veya organik asitlerle konjüge edilmiş ve lignin, tanen gibi kompleks yapıların birleşiminden oluşan çözünebilir bileşenlerdir (Lattanzio, 2013). Fenolik asitler, moleküler yapılarına göre benzoik ve sinnamik asit türevleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 1.3) (Castellana vd., 2012).



Şekil 1.4: Benzoik ve Sinnamik asit türevlerinin moleküler yapısı

Bitkilerin yaprak, kök, dal, çiçek gibi kısımlarından elde fenolik bileşikler çok çeşitlidir ve bu bileşiklere sahip olan bitkilerin neredeyse her birinin kendine özgü fenolik bileşeni bulunmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *Rosmarinus officinalis* türü üzerinde daha önce yapılan araştırmalara göre, bitkiden elde edilen fenolik bileşiklerin bir kısmını şu şekilde sıralamak mümkündür (Bai vd., 2010):

- 6''-O-(E)-feruloilhomoplantajinin
- 6''-O-(E)-feruloilnepitrin
- 6''-O-(E)-p-kumaroilnepitrin
- 6-metoksiluteolin
- 7-glukopiranozid
- Luteolin 3'-O-beta-D-glukoronid
- Luteolin 3'-O-(3''-O-asetil)-beta-D-glukoronid
- Kamferol
- Lüteolin
- Genkwanin

- Ladanein
- 1-O-(4-hidrobenzoil)-beta-D-glukopiranoz
- Rosmarinik asit
- Karnosik asit
- Karnosol

1.6. Reaktif Oksijen Türleri, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri, normal hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak moleküler oksijenden üretilmektedir. Reaktif oksijen türleri ikiye ayrılmaktadır: Serbest radikaller ve radikal olmayanlar (non-radikal). Bir ya da daha fazla eşlenmemiş molekül içeren ve moleküle reaktivite veren moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. İki serbest radikalın eşlenmemiş elektronlarını paylaşması ile de non-radikal formlar oluşturulur. Düşük konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türleri fizyolojik hücre proseslerinde kullanılır ancak yüksek konsantrasyonlarda olduğu zaman yağlar, proteinler ve DNA gibi hücre bileşenlerinde modifikasyonlara neden olurlar (Birben vd., 2012). Vücut normal fonksiyonlarını gerçekleştirirken oksijenin yaklaşık yüzde ikisi reaktif oksijene çevrilirken, enfeksiyon, egzersiz, kirleticilere maruz kalma, iyonize radyasyon gibi durumlara maruz kalındığında reaktif oksijen türleri artmaktadır (Kunwar ve Priyadarsini, 2011).

Oksijen bi-radikal doğasından dolayı, kısmen indirgenmiş olan reaktif türlerinden kolayca eşlenmemiş elektron kabul etmektedir. Ve böylece Reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. En bilinen reaktif oksijen türleri süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (HO), peroksil (ROO), alkoksi (RO) ve nitrik oksit (NO) (Singh vd., 2004).

Oksidatif stres, vucutta bulunan antioksidan ve oksidasyon dengesinin bozulduğu, oksidasyonun antioksidan miktarını aştığı durum olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres lipid peroksidasyonu ve oksidatif DNA hasarına yol açmasının

yanında hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde ve fizyolojik adaptasyon fenomeninde rol oynamaktadır (Yoshikawa ve Naito, 2002).

1.6.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Endojenik Kaynakları

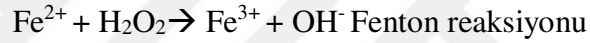
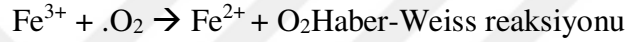
En önemli üç reaktif oksijen türü süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksittir. Endojen kaynaklı oksidanlar, formülleri ve reaksiyon denklemleri aşağıda Tablo 1.3’de özetlenmiştir (Birben vd., 2012)

Tablo 1.3: Oksidanlar ve formülleri

Oksidan	Formülü	Reaksiyon denklemi
Süperoksit anyonu	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$2O_2 + H^+ \rightarrow O_2^{\cdot-} + H_2O_2$ $Hipoksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow ksantin + H_2O_2$ $Ksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow ürik asit + H_2O_2$
Hidroksil radikali	$*OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + *OH$
Hipoklorik asit	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroksil radikali	ROO^*	$R^* + Cl^- \rightarrow ROO^*$
Hidroperoksil radikali	HOO^*	$O_2 + H_2O \rightarrow HOO^* + OH^-$

Süperoksit anyonu, moleküler oksijene ekstradan bir elektron eklenmesi ile oluşur. Bu süreç NADPH oksidaz veya ksantin oksidaz tarafından ya da mitokondriyal elektron transport sistemi aracılığıyla gerçekleştirilir. Süperoksit anyonu oluşturmanın en önemli kısmı mitokondride adenosin trifosfat oluşumudur.

Normalde elektronlar suyun oksijenini indirgemek için mitokondriyal elektron transport sistemini kullanırlar ancak bu elektronlar yaklaşık yüzde 1 ila 3'ü sistemden sızar ve süperoksit üretir. Süperoksit anyonu süperoksit dismutaz ile hidrojen peroksidaza dönüştürülür. Hidrojen peroksit plazma membranından kolayca difüze olabilmektedir. Hidrojen peroksit bunun yanı sıra ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve aminoasit oksidaz ile de metabolik reaksiyonlardaki moleküler oksijenin peroksizomlarda tüketimi sırasında da oluşabilmektedir. Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları olarak adlandırılan iki reaksiyon ortamda Fe^{2+} ya da Cu^{+2} gibi geçiş metalleri varlığında H_2O_2 'yi OH^- a çevrilmektedir. Bu reaksiyonlar şu şekildedir (Birben vd., 2012):



Süperoksit radikalının kendisi hidrojen peroksitle de etkileşime girebilmektedir. Bunun üzerine Tablo 1.3'de de görülen reaksiyon gerçekleşmekte ve hidroksil radikali meydana gelmektedir. Hidroksil radikali, DNA, karbonhidrat, protein, yağ gibi çok önemli moleküllere zarar verebilmekte ve lipid peroksidasyonunu başlatmaktadır. Hipoklorik asit ise, solunum yolları patojenleri öldüren ve DNA ile etkileşime girerek DNA hasarına neden olabilen bir radikaldir. Aynı şekilde hidroperoksil ve peroksil radikalleri de çok zararlı oksidanlardır (Birben vd., 2012).

1.6.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Ekzojen Kaynakları

Bu kaynakları şöyle sıralayabiliriz (Birben vd., 2012):

- Sigara dumanı
- Ozona maruz kalma
- Hiperoksi

- İyonize Radyasyon
- Ağır metal iyonları

1.7. Antioksidanlar

Hücrelerimizde zarara neden olan ve yaşlanma süreci ile hastalık gelişiminde merkezi bir rol oynadığına inanılan serbest radikallere karşı en önemli savunma mekanizmamız antioksidanlardır. Antioksidanlar hem serbest radikal hasarından korunmaya neden olacak hem de sağlıklı ve iyi olmanın temelinde rol oynayacaktır. Vucudun organ sistemlerini ve hücrelerini reaktif oksijen türlerinden korumak için insanlar yüksek derecede sofistike ve kompleks olan antioksidan savunma sistemleri içerirler. Bu savunma sistemleri şu şekildedir (Percival, 1998):

- Antioksidan enzimler
 - Süperoksit dismutaz
 - Katalaz
 - Glutasyon redüktaz
 - Glutasyon peroksidaz
 - Glutasyon transferaz
- Besin kökenli antioksidanlar
 - Askorbik asit (Vitamin C)
 - Tokoferoller ve Tokotrienoller (Vitamin E)
 - Karotenoidler
 - Glutasyon ve lipoik asit gibi diğer küçük moleküler ağırlıklı bileşenler
- Metal bağlayan proteinler
 - Ferritin
 - Laktoferrin

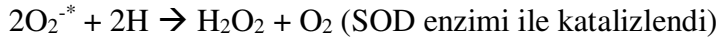
- Albumin
- Serruloplazmin
- Metallotionein
- Miyogloblin
- Transferrin
- Ve daha çok sayıdaki antioksidan maddeler
 - NADPH ve NADH
 - Koenzim Q10
 - Urik asit
 - Polifennoller
 - Bilirubin
 - Tiyoller gibi.

Bunların yanı sıra birçok gıda ve farmasötik ürün sentetik antioksidan içermektedir. Bu antioksidanlar raf ömrünü uzatmak için yağ asitlerinin doymamış çift bağlarının oksidasyonunun engellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bunun yanında farmasötik ürünlerde kullanım sebebi ise oksidasyona uğrayabilecek kimyasal bileşenlerin ve terapatik ajanların stabilitesini artırmaktır. Bu sentetik antioksidanlardan en çok kullanılanlar şu şekildedir (Shebis vd., 2013):

- Bütillenmiş hidroksianizol (BHA)
- Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
- Propil gallate
- Tert-Butil-Drokinon (TBHQ)

1.7.1. Biyolojik Sistemlerdeki Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutaz, fagositik hücreler ve mitokondri kloroplastında gerçekleşen elektron transport zincirindeki areobik hücrelerde üretilen süperoksit radikallerinin yıkımının katalize edilmesinde görevli enzimdir. Süperoksit reduksiyon ajanı ya da zayıf oksidasyon ajanı olarak davranabilir. Süperoksit askobik asidi oksitler ve Sitokrom c de bulunan FE^{3+} iyonunu Fe^{2+} iyonuna indirger. Süperoksitin zararlarından korunmak için hücreler süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla süperoksiti katalaz enzimi ile ortadan kaldırılabilen hidrojen peroksit'e dönüştürür.



Bu reaksiyon sonunda oluşan hidrojen peroksit ise katalaz enziminin kullanılması ile Su ve oksijene dönüştürülerek zararlı radikaller ortadan kaldırılır.



Bu iki enzimin yanısıra Glutatyon peroksidaz enzimi in vivo lipid peroksidasyonuna karşı önemli bir koruyucu mekanizma sağlamaktadır. Bu enzim hidrojen verici olarak GSH yani glutatyon, glutamik asidin bir tripeptid türevi, sistein ya da glisin kullanarak hidrojen peroksid enzimi ile reaksiyona girmektedir. Reaksiyonda bulunann 2 adet GSH okside GSOG ve su oluşumu meydana getirmektedir.



Glutatyon redüktaz normal hücrelerde GSH/GSOG oranı 10'un üzerinde tutmak için GSOG'yi GSH'a geri döndürebilmektedir. Ayrıca glutatyon peroksidaz enzimi, alkoksil radikalleri ve hücreye zararlı aldehytleri oluşturacak biçimde ayrıışmayan kararlı hidroksi lipidlerin oluşmasını engellemek için lipid ve steroid hidroperoksitleri indirgemektedir.

Miyeloperoksidaz enzimi ise aktive haldeki fagositik hücreler iktihaplanma bölgelerinde üretilen güçlü bir oksidan olan Hipokloröz asit ($HOCl$)'i elde etmek

için hidrojen peroksit varlığında klorür iyonları okside etmektedir. Ve bu oksidan ile bakterileri öldürmektedir (Frankel, 2007:38).

1.7.2. Enzimatik Olmayan Oksijen İndirgeyici Ajanlar

Plazmadaki suda çözünebilen en etkili antioksidan askorbik asittir. Singlet oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksi radikali, hidroperoksi radikali ve hipoklorük asidin indirgenmesinde kullanılan askorbik asit aynı zamanda demir ve bakır gibi metallerin eşliğini gerektiren antioksidan durumlarında da prooksidan olarak görev yapmaktadır. Ürik asit de lipit peroksidasyonunu engelleyen önemli indirgeyici ajanlardan birisidir. Hidroksil radikali, peroksil radikalini, singlet oksijen ve hipoklorük asidin indirgenmesini gerçekleştirmektedir. Koenzim Q ve vitamin E gibi enzimatik olmayan antioksidanlarda bulunmaktadır (Frankel, 2007:39). Bunlar Tablo 1.4’de özetlenmiştir (Zampelas ve Micha, 2014).

Tablo 1.4: Enzimatik olmayan antioksidanlar ve etkiledikleri oksidan madde

Vitaminler gibi enzimatik olmayan önemli ajanlar ve etki ettikleri oksidan	
Tokoferoller	Lipid peroksidasyonunda başlangıç zincirleri
Beta karotenler	Singlet oksijen
Likopen	Singlet oksijen
Koenzim Q	Serbest radikaller
Glutasyon	İndirgeyici
Urat	Serbest radikaller
Bilirubin	Serbest radikaller

1.8. DNA Koruyucu Aktivite

Hücre içinde oluşan reaktif oksijen türleri, hücre yapısına zarar vererek 30’dan farklı hastalığa sebebiyet vermektedir. DNA, lipid ve protein gibi zarar verdiği bu yapıların korunması için insan vücudundaki reaktif oksijen türlerinin dengesi sağlanmalıdır. Bunun için de antioksidanların rolü oldukça büyüktür. Serbest radikallerin DNA gibi moleküllere zarar vererek, kanser, diyabet, kardiyovasküler

hastalıklar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer hastalıklar ile yaşlanmada rol oynadığı bilinmektedir. Besinlerdeki antioksidan etkiler araştırılarak bunların önüne geçilmeye çalışılmaktadır (Jiang vd., 2012).

Son yıllarda birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarla tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen ürünlerin DNA Koruyucu Aktiviteleri ortaya koyulmaya başlamıştır. Bu sebepten günümüzde hala birçok tıbbi ve aromatik bitki üzerinde antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojen, antifungal özelliklerinin araştırılması için çalışmalar da yapılmaktadır (Golla ve Bhimathai, 2014).

1.9. Antimikrobiyal Aktivite

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonla savaşmakta kullanılan en önemli silahlardır ve keşiflerinden beri insan sağlık kalitesinin artırılmasında ve tedavilerde çok iyi katkılarda bulunmuştur. Ancak son zamanlarda, sağlığa faydaları olan bu antibiyotikler toksik reaksiyonlar ürettikleri için hastalıklara karşı daha az etki göstermektedirler. Hastalıklar yıllardır kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir ve yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotik artık eski etkilerini gösterememektedir (Bhaloida ve Shukla, 2011).

Eldeki antimikrobiyal ve antibakteriyelin başarısızlıkları sonucu, birçok araştırmacı yeni bioaktif moleküllerin kaynağı olarak kullanılmak üzere doğal ürünleri araştırmaya başlamıştır. Bu amaç için birçok metod bulunmaktadır. Hepsi aynı prensibe sahiptir ancak mikroorganizmaya göre test çeşidi değişiklik gösterebilmektedir. Test sistemleri basit, hızlı, tekrarlanabilir ve maliyeti düşük olmalıdır ki etkili olsun. Bunun için genellikle bu çalışmada da kullanılan disk difüzyonu yöntemi ve well difüzyon yöntemi ve broth ya da agar dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır (Balouri vd., 2016). Antibakteriyel aktivite düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan testlerden bazıları şöyledir:

1) Disk difüzyon testleri

2) Dilüsyon testleri:

a. Agar dilüsyon testleri

b. Broth dilüsyon testleri

1. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi
2. Mikrodilüsyon testleri
- 3) Gradient strip testleri (E-test, MICE)
- 4) Otomatize yöntemler
- 5) Moleküler yöntemlerdir.



BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

Inatani ve ark. (1983), *Rosmarinus officinalis* L. türünden elde ettiği özütlerdeki antioksidan etkiyi ölçmüşlerdir. Rosmanol olarak adlandırılan renksiz ve kokusuz antioksidan maddenin sentetik BHT ve BHA gibi antioksidanlara göre 4 kez daha etkili olduğunu ortaya koydukları bu çalışmada rosmanolun yanısıra karnosol gibi bileşenler de tespit edilmiştir.

Collins ve Charles (1987), *Rosmarinus officinalis* L. türüne ait iki antioksidan bileşen olan karnosol ve ursolik asidin antimikrobiyal aktivitesini araştırmak için BHT, BHA'yı da kontrol olarak kullanmış ve ursolik asidin ikisinden de yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Karnosol ise BHT ve BHA ile benzer olarak ve ursolik asitten daha az bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Schwarz ve Ternes (1992), *Rosmarinus officinalis* ve *Salvia officinalis* türlerinin antioksidatif bileşenlerini ve antioksidatif aktivite ile fenolik diterpenlerini belirlemek için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda, her iki türde de galdozol, rosmaridifenol, isokornosol, alfa ve beta tokoferoller saptamışlardır.

Frankel ve ark. (1996), Yağ su emülsiyonu ve dökme yağ içerisindeki karnosol, rosmarinik asit gibi biberiye özütlerinin antioksidan aktivitesini araştırdıkları çalışmada karnosolun diğer bileşenlerden daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca hazırladıkları emülsiyonlarda pH faktörü kullanan araştırmacılar, biberiye antioksidanlarının stabilitesi üzerinde pH'ın etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. pH5 de daha az aktiviteye sahip olan karnosol, pH 7'de en fazla aktivite göstermiştir.

Mangena ve Muyima (1999), *Artemisia afra*, *Pteronia incana* ve *Rosmarinus* türlerine ait esansiyel yağların seçilen bakteri ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırmalı değerlendirmesini yapmışlardır. Toplam 41 bakteri ve maya kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada *Artemisia afra* ve *Rosmarinus officinalis*'in benzer ve *P. incana* türüne göre daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Çeliksaş ve ark. (2007), farklı bölge ve farklı mevsimsel varyasyonlarda bulunan *Rosmarinus officinalis* türünün esansiyel yağlarının ve metanol özütlerinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda metanol ekstraktlarının esansiyel yağlara göre çok düşük antioksidan özellik içerdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca sıcak iklim olarak Mersin, Daha az sıcaklığa sahip olarak İzmir ve daha serin olarak Çanakkale şehirlerden toplanan örneklerin içerdiği antioksidan özellik arasında kayda değer bir fark bulamamışlardır.

Gachkar ve ark. (2007), *Cuminum cyminum* ve *Rosmarinus officinalis* türlerinin içerdiği esansiyel yağların kimyasal ve biyolojik aktivilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada bu iki türünde alfa-pinen (%29.1, %14.9), 1.8-sineol (%17.9, %7.43) ve linalool (%10.4, %14.9) bileşenlerine ana bileşenler olarak rastlanmıştır. Antibakteriyel aktivitenin ölçülmesi için *E. coli*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterilerinin kullanıldığı bu çalışmada *C. cymium* esansiyel yağlarının *R. officinalis*' göre daha güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. DPPH yöntemini de kullanan bu çalışma sonunda, hem *C. cyminum* hem de *R. officinalis* türlerinin gıdalarda hatırı sayılır derecede antioksidan özelliğe sahip olduğu da belirlenmiştir.

Erkan ve ark. (2008), *Rosmarinus officinalis* ve *Nigella sativa* türlerinde bulunan esansiyel yağlar, karnosik asit, rosmarinik asit ve sesamolün antioksidan aktivitesini DPPH ve ABTS yöntemi kullanılarak yapmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda, biberiye özütünün *N. sativa*'dan daha yüksek antioksidan aktiviteye ve daha yüksek oranda fenolik bileşene sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Gade ve ark. (2010), *Opuntia ficus-indica* kullanarak gümüş nanopartikül elde ederek, in vitro antibakteriyel aktivitesini ve bu aktivitenin gerçekleşmesinde rol oynayan mekanizmaları çalıştılar. Bu çalışma sonucunda, Amphotericin ve

Streptomycin maddesinin en yüksek antibakteriyel aktiviteyi oluşturduğunu gözlemlediler. Ayrıca bu aktivitenin gerçekleşmesinde temelde bioüretim ve başlıklı nanopartikül üretimine yol açan ara kompleksler şeklinde iki basamaktan oluştuğunu ortaya koydular.

Zaouali ve ark. (2010), Tunus'ta endemik olan *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* ve var. *trogodytorum* varyetelerinin esasnsiyel yağ kompozisyonunu belirleyerek, antimikrobiyal ve antioksidant aktivitelerini ölçmüşlerdir. DPPH ve FRAP yöntemini kullandıkları bu çalışmanın sonucunda bu iki türden en fazla 1.8-sineol ve kamfor elde etmişler ve 8 farklı bakteride deneyerek antibakteriyel etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kp ve Savithramma (2013), Hindistan'ın Andhra Pradesh şehrinin Kurnool bölgesinde Vitis hastalığının tedavisi için yoğun olarak kullanılan, *Cabada fruticosa*'nın antimikrobiyal aktivitesini ölçmek için özüt kullanmışlardır. Ve sonuçlar bu bitkinin içerdiği sekonder metabolit ve diğer bileşenlerin çeşidine göre antimikrobiyal aktivitesinin değiştiğini ancak her durumda bu hastalığın tedavisinde başarılı olduğunu göstermiştir.

Abdel-Aziz ve ark (2014) *Chenopodium murale* yaprak özütü kullanılarak sentezlenen bileşenlerdeki antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada yaprak özütü içeren Ag nanopartiküllerin, bitki özütü ve gümüş nitrat çözeltisinden daha yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 3

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. *Rosmarinus officinalis*'in Toplanması ve Teşhisi

Gaziantep İli ve civarından toplanan *Rosmarinus officinalis* türleri, herbaryum tekniklerine uygun olarak preslenip kurutulmuştur (Seçmen vd., 1998). ve çalışma materyali olarak kullanıma hazırlanmıştır. Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarından Fatih YAYLA tarafından teşhis edilen örneklerin taze ve sağlıklı görünen kısımları çalışma için seçilmiştir. Bu kısımlar kullanılmadan önce distile suyla yıkanmış ve gölgede, oda şartlarında kurutulmuştur.

3.2. *Rosmarinus officinalis* Özütlerinin Eldesi

3.2.1. Materyal

Rosmarinus officinalis türünün özüt eldesi için kullanılan materyaller şu şekildedir:

- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Sigma Aldrich marka)
- Metanol (CH_3OH) (Sigma Aldrich marka)
- Hekzan (C_6H_{14}) (Sigma Aldrich marka)
- Distile su (dH_2O)
- Soxhlet (Gerhardt EV 14)
- Evaporatör (Heildolph Heizbad HB Digit)

3.2.2. Bitki Özütlelerinin Hazırlanması

Özütlelerinin hazırlanışı ise şu şekilde yapılmıştır (Topçu vd., 2007):

1. Biberiyeler güneşin etkisinin az olduğu gölge yerlerde asılmış ve kuruması sağlanmıştır.
2. Gerhardt EV 14 marka Soxhlet cihazında biberiyeler özütle işlemine uygun hale gelmesi için toz haline getirilmiştir.
3. Toz haline getirilen biberiyelerden diklorometan, hekzan ve su özütleleri Soxhlet yöntemi ile çıkarılmıştır.
4. Çıkarımı yapılan özütlelerden diklorometan, metanol, hekzan ve suyun uzaklaştırılması için Rotary evaporator cihazında evaporasyon işlemi uygulanmıştır.
5. Diklorometan, hekzan, metanol ve su uzaklaştırılan özütleler çalışma yapılana kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.3. *Rosmarinus officinalis* Özütlelerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Parametreler ve Metotlar

3.3.1.DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi Yöntemi Kullanılarak Antioksidan Aktivite Belirlenmesi

3.3.1.1. Materyal

Bu aşamada kullanılan materyaller şu şekildedir:

- DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)
- Metanol (Sigma Aldrich marka)
- Distile su (dH₂O)
- Thermo Scientific Multiskan Go (Vantaa marka)
- Spektrofotometre
- Eliza plate

- Vorteks

3.3.1.2. DPPH Çözeltisi Hazırlama

DPPH çözeltisi, 4 mg DPPH üzerine 100 ml metanol eklenmesi ve son derişim 0.2 Mm olacak şekilde seyreltilmesi şeklinde hazırlanmıştır.

3.3.1.3. Protokol

Özütlerin serbest radikal giderim kapasiteleri DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kullanılarak tespit edildi (Arıduru ve Arabacı, 2013). Protokol şu şekilde uygulanmıştır.

- Eliza plate içerisine 1 mL'lik örnekler koyulmuştur.
- 1 mL örnek içeren numunelere daha önce hazırlanan 4mg/100ml'lik DPPH çözeltisinden 4 mL eklenmiştir.
- Kontrol olarak 1 mL distile su kullanılmıştır.
- Örnekler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyona bırakılan örnekler daha sonra 517 nm'de absorbans ölçümüne tabi tutuldu ve örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirilmiştir.
- Serbest radikal giderim aktivitesinin hesaplanması için şu eşitlik kullanılmıştır:

$$\text{İnhibisyon \%} = [(\text{kontrolün absorbansı} - \text{örneğin absorbansı}) / \text{kontrolün absorbansı}] \times 100$$

3.3.1.4. Prensibi

DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal DPPH'in, elektron ve hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalları tarafından temizlenmesi ile karakteristik mor rengin açılması ve spektrofotometrik olarak belirlenmesine prensibine dayanmaktadır (Erciyes, 2014).

3.3.2. Total Antioksidan Aktivitesinin ABTS Yöntemi ile Belirlenmesi

3.3.2.1. Materyal

- Rel Assay Diagnostic, Tas Assay Kit
 - Reagent 1 (Assay tampon)
 - Reagent 2 (Renkli ABTS Radikal Solüsyonu)
 - Standart 1 (0.0 mmol Troleks Equiv/L) Solüsyonu
 - Standart 2 (1.0 mmol Troleks Equiv/L) Solüsyonu
- Distile su (dH₂O) H₂O
- Biberiye özütleri
- Thermo Scientific Multiskan Go (Vantaa marka) Spektrofotometre
- Eliza plate

3.3.2.2. Protokol

TAS assay kit kullanılan protokol şu şekildedir:

- Eliza plate kuyucuklarına 200 il Reagent 1 koyulmuştur.
- Reagent 1 üzerlerine 0.1 mg/1000 µl lik stok çözeltiden 12 µl bitki özütleri eklenmiştir.
- Başlangıç absorbansları 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.
- Ölçüm sonrası üzerlerine 30 µl Reagent 2 eklendi ve 5 dakika 37 °C’ de inkübe edilmiştir.
- İnkübe sonrası 660 nm’de yeniden absorbans ölçümü yapılmıştır.
- Ölçüm yapılırken şu formül kullanılmıştır:

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Sample})]}{}$$

$$[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]$$

Δ Standard1 absorbansı= (Std1'in ikinci absorbansı - Std1'in birinci absorbansı)

Δ Standard2 absorbansı= (Std2'nin ikinci absorbansı - Std2'nin birinci absorbansı)

Δ Örnek absorbansı = (Örneğin ikinci absorbansı - Örneğin birinci absorbansı)

3.3.2.3. Prensibi

Bu yöntemde, örnekteki antioksidan maddeler Reagent 2 içerisinde bulunan koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini indirgenmiş ABTS formuna dönüştürür. Yöntemde serbest radikal olarak 2,2 AzinoBis 3-Etil Benzo Tiazolin-6-Sulfonik Asit (ABTS), pozitif kontrol olarak ise sentetik antioksidan ve Trolox kullanılmıştır. Trolox, vitamin E analogudur.

3.3.3. Total Oksidan Seviye (TOS) ile Antioksidan Aktivite

3.3.3.1. Materyal

- Rel Assay Diagnostic, Tas Assay Kit
 - Reagent 1 (Assay tamponu)
 - Reagent 2 (Prokromojen solüsyon)
 - Standard 1 (Blank solüsyon)
 - Standard 2 Solüsyon (800 mM H₂O₂ Equiv/L)
 - Deiyonize su (dH₂O)
- Spektrofotometre
- Eliza plate
- Biberiye özütleri

3.3.3.2. Standart çalışma solüsyonunun hazırlanması (Standard 1)

Stok Stabilize Standart Solüsyon (SSSS), deiyonize su ile 40 kez seyreltildi. Seyreltilmiş 5 µl SSSS üzerine 1 µl distile su ilave edildi ve vortekslendi. Tekrar bu çözeltiden 5 µl alındı ve yine 1 µl distile su ilave edilip vortekslendi. Bu şekilde 20µM H₂O₂ hazırlanmış oldu.

3.3.3.3. Protokolü

- Eliza plate kuyucuklarına 200 µl Reagent 1 koyulmuştur.
- Reagent 1 üzerine hazırlanan stok solüsyondan (SSSS), 30 µl eklenmiştir.
- Başlangıç absorbansı spektrofotometrik olarak 530 nm’de okunmuştur.
- Ölçümden sonra üzerine 10 µl Reagent 2 eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübe sonrası ikinci kez 530 nm’de absorbans ölçülmüştür.
- Aynı işlemler standart 2 içinde tekrarlanmıştır.
- Ölçüm için şu formül kullanılmıştır:

Sonuç: (Δ Örneğin absorbansı / Δ Standart2’nin absorbansı) X 20 (Standard2 Değeri)

Δ Standard2 absorbansı= (Std2’nin ikinci absorbansı - Std2’nin birinci absorbansı)

Δ Örnek absorbansı = (Örneğin ikinci absorbansı – Örneğin birinci absorbansı)

Standart 2 Değeri = 20 µmol H₂O₂ Equiv/L

3.3.3.4. Prensibi

Oksijen varlığında ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyon oksitler. Reaksiyon ortamında oksidanların bulunmasına bağlı olarak oksidasyon reaksiyon yoğunluğu artış gösterir. Ferrik iyon asidik ortamda renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür ve absorbans değeri örnekteki oksidan değerini göstermektedir (Çetinkaya, 2013).

3.4. *Rosmarinus officinalis* Bitki Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

3.4.1. Antimikrobiyal Test Organizmaları

Çalışmada kullanılan bakteriler ve kodları aşağıdaki Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Bakteriler ve kodları

Bakteri	Kodu
<i>Klebsiella</i>	ATCC 700603
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25322
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

3.4.2. Kullanılan Bakteri Şuşları

Tablo 3.1’de verilen ve bu tezde kullanılan bakteri şuşları şu şekildedir:

- ***Escherichia coli*:** *Escherichia coli*, ortalama 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde Gram negatif bir basil peritriş kirpikleri sayesinde hareketlidir. Hareketsiz şuşları da vardır. Bazı şuşlarda kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır. Spor oluşturmazlar ve fakültatif anaerobturlar. İnsan ve hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunur ve bağırsaktaki en baskın fakültatif anaerob türdür. *Escherichia coli* günümüzde toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenleri arasında yer almaktadır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında en sık izole edilen ve hemen her organ ve dokuda enfeksiyon oluşturabilen patojen

E. coli'lerin enfeksiyonları mukozal yüzeylerde sınırlı kalabildikleri gibi tüm vücuda da yayılabilir (Ocak, 2014).

- ***Pseudomonas aeruginosa***: Gram negatif, nonfermantatif olan bakteri, spor üretmez. Düz ve hafif kıvrımlıdır. Çubuk şekilli bu bakteriler tek veya çoklu kamçıları ile genellikle hareketlidir ve doğada yaygın bulunurlar. Klinik ve çevresel açıdan önemli bir türdür. Optimum sıcaklık istekleri 4-36 °C arasında değişmektedir. Yüksek ilaç direncine sahiptirler bu sebeple genellikle ağır ve tedavisi zor enfeksiyonlar oluştururlar. Fırsatçı bir patojen olan bu bakteri deride, akciğerde ve korneada nekrozlara neden olur. Sağlıklı kişilerde nadiren hastalığa neden olur. Nekrozların olduğu kişiler genellikle sağlıklı kişiler değildirler (Paşa, 2013).
- ***Staphylococcus aureus***: *Micrococcaceae* familyasına ait olan *Staphylococcus aureus* bakterisi gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz ve katalaz pozitif olan bir bakteridir. Başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizma sayısının azaltılmasına yönelik tüm uygulamaları karşı yüksek duyarlılık göstermekte ve buna karşılık insanlarda zehirlenmeye neden olan enterotoksinler üretebilmektedir. Doğal olarak insanların üst solunum yolları ve derilerinde bulunmaktadır. Sağlıklı insanın yaklaşık %30-40'nın burun mukozasında bu bakteri olduğu belirlenmiştir (Küçükçetin ve Milci, 2008).
- ***Klebsiella pneumoniae***: **Birçok** hastalığa eden olabilen gram negatif bakteridir. Pnömoni, kan enfeksiyonları, yara ya da ameliyat bölgesi enfeksiyonları ve menenjit bu hastalıklardan bazılarıdır. *Klebsiella* özellikle karbapenem olarak bilinen antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç geliştirmiştir. Bakteri normal olarak insan bağırsaklarında ve insan dışkıında bulunmaktadır ve hastalık oluşturmamaktadır. Hastalık oluşturma hasta insanlar arasındaki tedavi işlemleri sırasında oluşabilmektedir. Sağlıklı insanlar genellikle *Klebsiella* enfeksiyonlarına maruz kalmazlar (CDC, 2012).

3.4.3. Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi Protokolü ve Materyaller

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için eliza plate, mikropipetler, biberiye özürleri, broth besiyeler, test organizmaları ve DMSO kullanılmıştır.

Rosmarinus officinalis'in antimikrobiyal aktivitesinin belirlenebilmesi için CLS klavuzuna uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır ve yöntem 3 tekrarlı çalışılmıştır (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

- Test mikroorganizmalarından Enterik bakterilerden olan E. coli ve K. pneumoniae Eozin metilen blue (EMB) agarda, diğer bakteriler Mueller hinton agar (MHA) agarda bir gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Antibakteriyel aktivite testi için 0.1 mg özür tartıldı ve 1000 µl DMSO içinde çözdürülmüştür. Bu şekilde elde edilen biberiye özütlerinin antiakteriyel aktiviteleri mikrodilüsyon metoduna göre tespit edilmiştir.
- Standart bakteri suşlarının bulunduğu EMB ve MHA besiyelerinden 0.5 Mc Farland değerine eşit olacak şekilde 0.0009 NaCl içerisinde hazırlanmıştır.
- Her kuyucuğa bitki özütlerinin her birinden 0.1 mg eklenmiştir.
- Her bir kuyucuğun üzerine 100 µl MHB besiyeri ve 100 µl test mikroorganizması konularak özütlerin sulandırma işleminde 0.5 mg/ µl'den başlanarak son derişim 0.015625 mg/ml olacak şekilde 5 kez seri sulandırma gerçekleştirilmiştir.
- Tüm kuyucuklarda son hacim 200 µl olacak şekilde tüm özütler için işlem tamamlanmıştır.

3.5. *Rosmarinus officinalis* Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Tayini

3.5.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

3.5.1.1. Materyal

- Biberiye özütü
- Metanol
- Santrifüj
- Folin Ciocalteu çözeltisi
- Na₂CO₃ çözeltisi
- Saf su
- Gallik asit

3.5.1.2. Protokol

Fenolik madde tayini taze, kurutulmuş biberiye örneklerine uygulanmıştır.

- 100mg kurutulmuş biberiye 2 ml metanol ile homojenize edilmiştir.
- Homojenat filtre edilip 25 ml %80 metanol ile tekrar ekstrakte edilmiştir.
- Ekstraktlar süzildükten sonra filtratlar birleştirilip 30 dakika 2500xg'de santrifüj edilmiştir.
- Metanol ekstraktının berrak kısmı alınıp toplam fenolik madde ölçümü için küvetlere 50 µL örnek 250 µL Folin-Ciocalteu çözeltisi, 750 µL %20'lik Na₂CO₃ çözeltisi ve 3 ml saf su konulup 2 saat karanlıkta bekletilerek 765 nm'de okuma yapılmıştır.

Fenolik maddeler Folin-Ciocalteu çözeltisi kullanılarak Zhang ve Hamauzu (2004) belirttiği şekilde gallik asit standardı kullanarak sonuçlar mg gallik asit/100 g taze ağırlık üzerinden ifade edilmiştir. Elde edilen grafik ve absorbans değerleri EK 1'de verilmiştir.

3.5.2. Toplam Flavonoid Madde Tayini

3.5.2.1. Materyal

- Biberiye özütleri
- Distile su (dH_2O)
- $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi
- NaOH
- UV-VIS spektrofotometresi
- NaNO_2 çözeltisi

3.5.2.2. Protokol

Biberiye özütlerinde flavonoid miktarı için:

- 1 ml filtrat üzerine 5 ml distile su ve 0.3 ml %5'lik NaNO_2 çözeltisi ilave edilip karıştırıcıda karıştırıldı ve 5 dk beklenmiştir.
- Süre sonunda 0.6 ml %10'luk Süre sonunda 0.6 mL %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilave edilip karıştırıldı ve 5 dk beklenmiştir.
- Daha sonra 2 mL 1M NaOH eklenip saf suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır.
- UV-VIS spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbansı belirlenmiştir.

Sonuçlar, kateşin mg/L olarak ifade edilmiştir. Elde edilen grafik ve absorbans değerleri EK 2'de verilmiştir.

3.6. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplanması

TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilen OSİ hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrildi. Hesaplanırken şu formül kullanılmıştır.

$$\text{OSİ} = \text{TOS mikromol H2O2 Equiv/L} / \text{TAS, mmol Trolox Equiv/L} \times 10$$

3.7. *Rosmarinus officinalis* bitki Özülerinin DNA Koruyucu Aktivitesinin Belirlenmesi

3.7.1. Materyal

- pBR322 DNA (vivantis)
- H₂O₂
- %1.25'lik agaroz jel
- Distile su (dH₂O)
- UV translüminatör (DNR-IS)
- Jel dökümantasyon sistemi (DNR-IS, MiniBIS Pro)
- DMSO

3.7.2. Protokol

Özütlerin, DNA'yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır. Plazmid DNA'sı özütlerin varlığında H₂O₂ ve UV uygulanarak hasara uğratılmış ve % 1,25'lik agaroz jel üzerinde görüntüleme gerçekleştirilmiştir. DNA koruyucu aktivite testi için *Rosmarinus officinalis* özütlerinden %0.1 lik stok derişimi hazırlamak için 0.1 mg tartılmış ve üzerine 100 µl DMSO eklenerek çözölmüştür. Özütlerin, tamamen çözönməsi sağılandıktan sonra % 0.1'lik *Rosmarinus officinali* özütü solösyonundan 1/5 oranında seyreltilmiştir. Bunun için 10 µl özüt üzerine 40 µl dH₂O eklenmiştir ve çalışmada bu oran kullanılmıştır (Tepe vd., 2011).

3.8 *Rosmarinus officinalis* ve Kontrol özütlerinin hazırlanması

K1. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)

K2. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV

K3. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ H₂O₂ (1 µl)

K4. Kontrol: Plazmit DNA (3 µl) + dH₂O (6 µl)+ UV+ H₂O₂ (1 µl)

B1a. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye su özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (50 µl)

B2a Plazmit DNA (3 µl) + biberiye metanol özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (50 µl)

B3a. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye diklorometan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (50 µl)

B4a Plazmit DNA (3 µl) + biberiye hekzan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (50 µl)

B1b. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye su özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (25 µl)

B2b. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye metanol özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (25 µl)

B3b. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye diklorometan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (25 µl)

B4b. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye hekzan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (25 µl)

B1c. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye su özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (25 µl)

B2c. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye metanol özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (10 µl)

B3c. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye diklorometan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (10 µl)

B4c. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye hekzan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (10 µl)

B1d. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye su özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (7,5 µl)

B2d Plazmit DNA (3 µl) + biberiye metanol özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (7,5 µl)

B3d. Plazmit DNA (3 µl) + biberiye diklorometan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (7,5 µl)

B4d Plazmit DNA (3 µl) + biberiye hekzan özütü (5 µl)+ UV+ H₂O₂ (7,5 µl)

Yukarıda açıklanan kontroller haricinde tüplere *Rosmarinus officinalis*, değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış özütlerden 5 µl, plazmid DNA'sından 3 µl ve %30'luk H₂O₂'den 1 µl koyulmuştur. Özütlerin bulunduğu tüpler ile ikinci ve dördüncü tüpler birlikte beş dakika UV ışınları maruz bırakıldıktan sonra 4 µl yükleme tamponu eklenmiştir ve %1.25'lik agaroz jele yüklenmiştir. Işık kaynağı olarak oda sıcaklığında 302 nm dalga boyunda ve 8000 µW/cm yoğunlukta ışık üreten UV translüminatör (DNR-IS) cihazı kullanılmıştır. 100 dakika 100 Voltluk % 1,25'lik agaroz jel elektroforezi uygulamasından sonra jel dökümantasyon sisteminde (DNR-IS, MiniBIS Pro) görüntülenerek fotoğrafları elde edilmiştir. Bu test sisteminde kontrol olarak, UV ve H₂O₂ uygulaması yapılmamış pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

4. BULGULAR

4.1. *Rosmarinus officinalis* DPPH, TAS VE TOS Aktivite Bulguları

Biberiyenin taze ve sağlıklı görünen kısımları çalışma için seçilmiştir. Bu kısımlar kullanılmadan önce distile suyla yıkanmış ve gölgede, oda şartlarında kurutulmuştur. Aşağıdaki bulgular laboratuvarında yapılan işlemler sonucunda elde edilmiştir.

4.1.1. DPPH Grafikleri

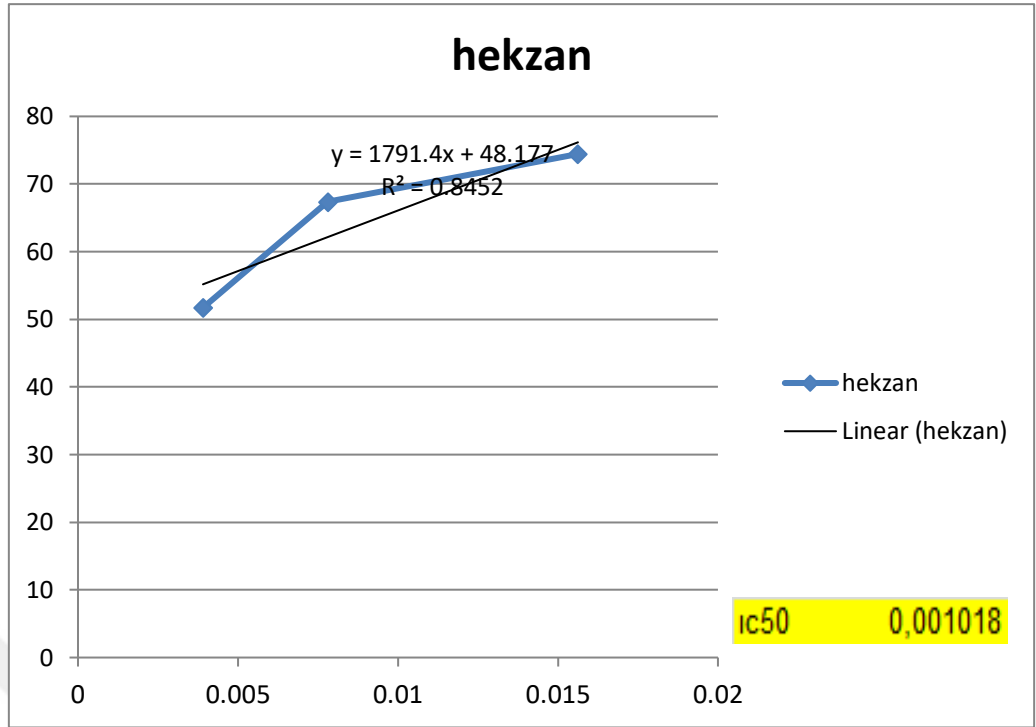
DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal DPPH'in, elektron ve hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalları tarafından temizlenmesi ile karakteristik mor rengin açılması olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır (Erciyes,2014).

Çalışmamızda DPPH çözeltisi, 4 mg DPPH üzerine 100 ml metanol eklenmesi ve son derişim 0,2 Mn olacak şekilde seyreltilmesi şeklinde hazırlanmıştır.

Serbest radikal giderim aktivitesinin hesaplanması için ise şu eşitlik kullanıldı.

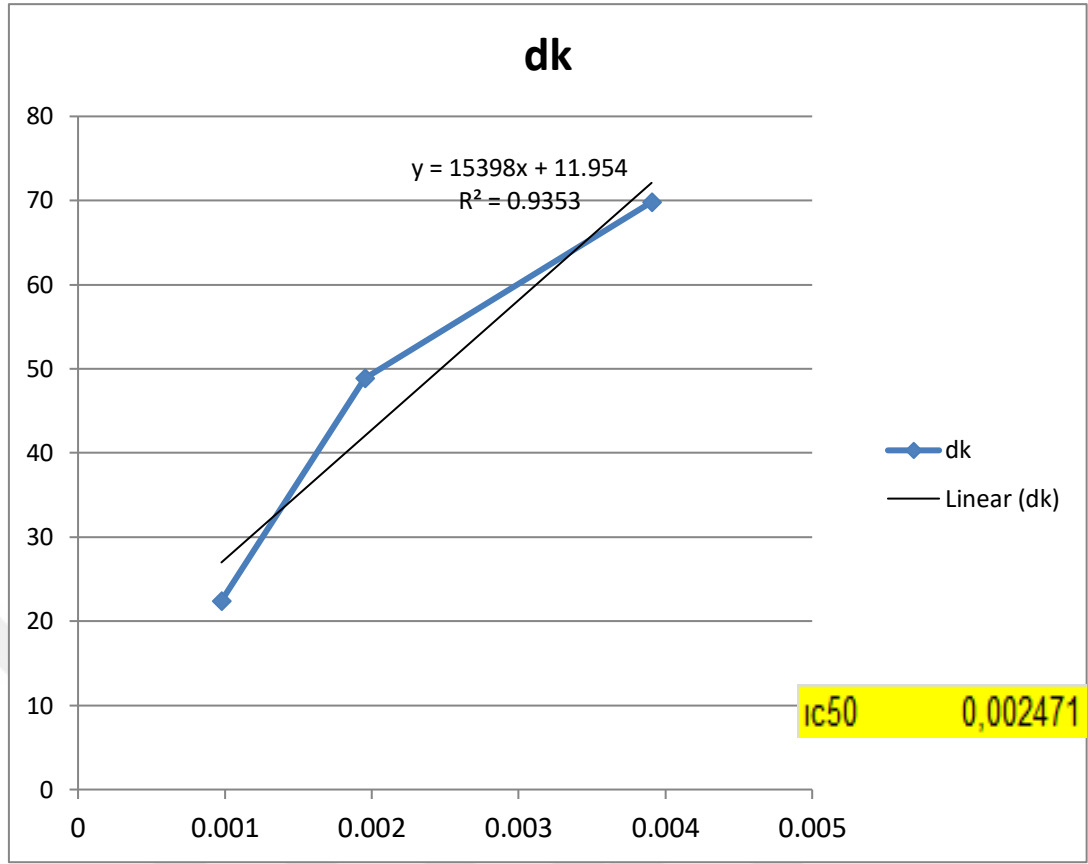
$$\text{İnhibisyon \%} = [(\text{kontrolün absorbensı} - \text{örneğin absorbensı}) / \text{kontrolün absorbensı}] \times 100$$

Ortaya çıkan sonuçlar aşağıdaki grafiklerle ifade edilmiştir.



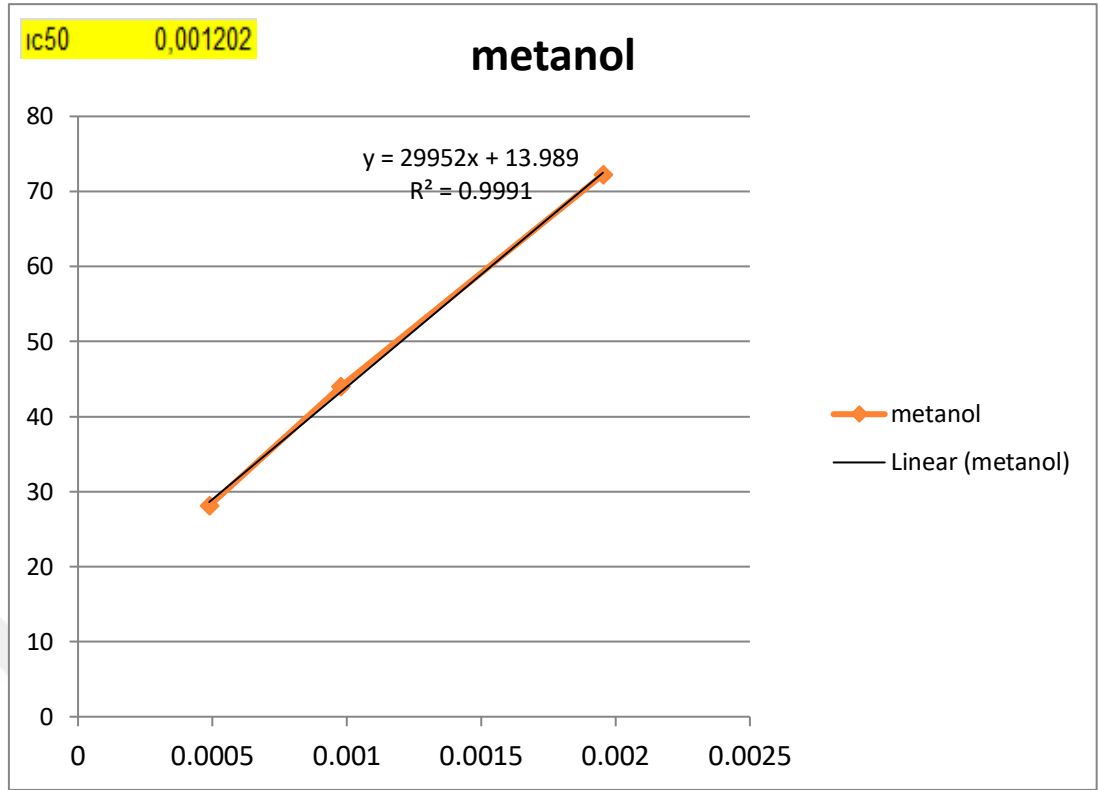
Şekil 4.1: *Rosmarinus officinalis* özütü- hekzan DPPH grafiği

Yukarıda verilen Şekil 4.1'e bakıldığında, *Rosmarinus officinalis* özütünün, hekzan ile olan DPPH grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre, IC₅₀ yani hekzanın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı 0.001018'dir. Bu IC₅₀ değeri ile çalışılan grafikte Y eksenini % inhibisyon oranını ve X eksenini konsantrasyonu (µg/ml) temsil etmektedir ve grafikte hekzan özütünün 0.02 µg/ml konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin % 75 civarlarında olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bunun yanısıra grafiğe bakıldığında hekzan 0.005 µg/ml konsantrasyondan daha az konsantrasyonlarda serbest radikal süpürücü etkisinin bulunmadığı, 0.005 µg/ml konsantrasyondaki hekzanın ise yalnızca %50 oranlarında serbest radikal süpürücü etki gösterdiği söylenebilmektedir.



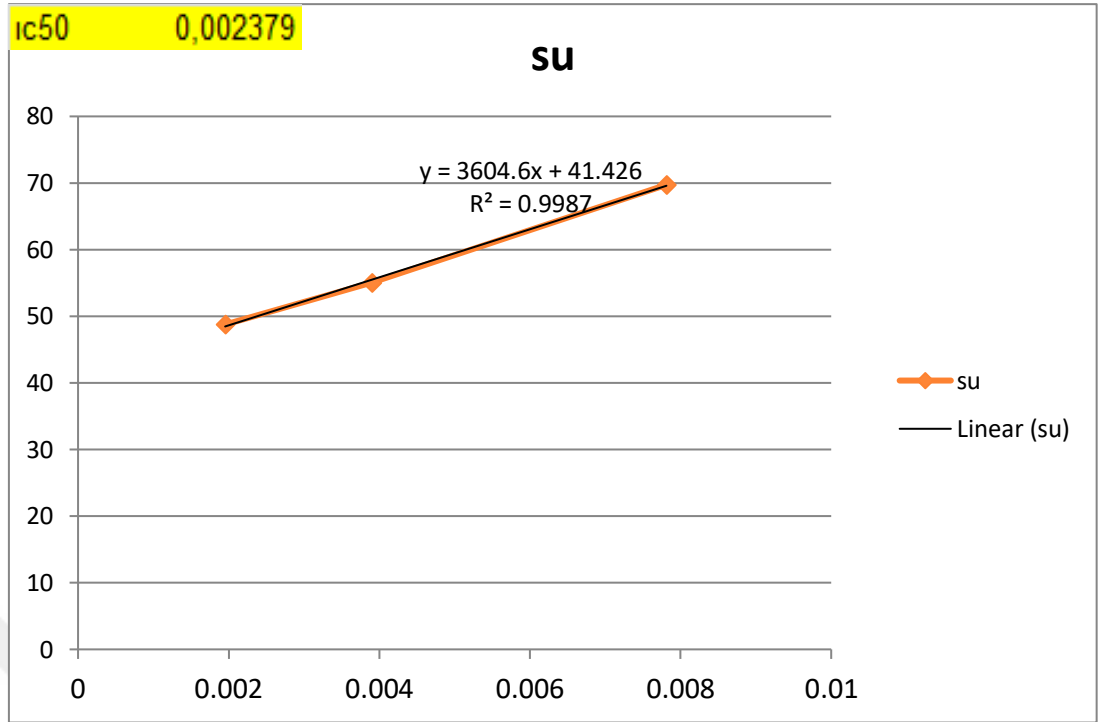
Şekil 4.2: *Rosmarinus officinalis* özütü - diklormetan DPPH grafiği

Yukarıda verilen Şekil 4.2'ye bakıldığında, *Rosmarinus officinalis* özütünün, diklormetan ile olan DPPH grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre, IC₅₀ yani diklormetanın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı 0.002471'dir. Bu IC₅₀ değeri ile çalışılan grafikte Y eksenini % inhibisyon oranını ve X eksenini konsantrasyonu temsil etmektedir ve grafikte diklormetan özütünün 0.004 µg/ml konsantrasyon civarında serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin % 70 civarlarında olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bunun yanı sıra grafiğe bakıldığında diklormetan 0.001 µg/ml konsantrasyondan daha az konsantrasyonlarda serbest radikal süpürücü etkisinin bulunmadığı, 0.001 µg/ml konsantrasyondaki diklormetanın ise yalnızca %20 oranlarında serbest radikal süpürücü etki gösterdiği söylenebilmektedir.



Şekil 4.3: *Rosmarinus officinalis* özütü – metanol DPPH grafiği

Yukarıda verilen Şekil 4.3'e bakıldığında, *Rosmarinus officinalis* özütünün, metanol ile olan DPPH grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre, IC₅₀ yani metanolun en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı 0.001202'dir. Bu IC₅₀ değeri ile çalışılan grafikte Y eksenini % inhibisyon oranını ve X eksenini konsantrasyonu temsil etmektedir ve grafikte metanol özütünün 0.002 µg/ml konsantrasyon civarında serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin % 71 civarlarında olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bunun yanı sıra grafiğe bakıldığında metanol 0.0005 µg/ml konsantrasyondan daha az konsantrasyonlarda serbest radikal süpürücü etkisinin bulunmadığı, 0.0005 µg/ml konsantrasyondaki metanolun ise yalnızca %30 oranlarında serbest radikal süpürücü etki gösterdiği söylenebilmektedir



Şekil 4.4: *Rosmarinus officinalis* özütü – su DPPH grafiği

Yukarıda verilen Şekil 4.4'e bakıldığında, *Rosmarinus officinalis* özütünün, su ile olan DPPH grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre, IC₅₀ yani suyun en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı 0.001202'dir. Bu IC₅₀ değeri ile çalışılan grafikte Y eksenini % inhibisyon oranını ve X eksenini konsantrasyonu temsil etmektedir ve grafikte su özütünün 0.008 µg/ml konsantrasyon civarında serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin %70 civarlarında olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bunun yanı sıra grafiğe bakıldığında su 0.002 µg/ml konsantrasyondan daha az konsantrasyonlarda serbest radikal süpürücü etkisinin bulunmadığı, 0.002 µg/ml konsantrasyondaki su ise yalnızca %50 oranlarında serbest radikal süpürücü etki gösterdiği söylenebilmektedir.

Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'e bakıldığında en etkin serbest radikal süpürücü etkiye sahip olanın biberiye-hekzan özütü (%75) olduğu, ancak diğer özütlerinden bu orandan çokda farklı olmadığı görülmektedir (%70, 71). Bunun yanında diklormetan diğerlerinin yanında daha az konsantrasyonlarda bile serbest radikal süpürücü etkisi gösterebilmektedir.

4.2. *Rosmarinus officinalis* TOS ve TAS değerleri

4.2.1. TOS değerleri

Oksijen varlığında ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla oksitler. Reaksiyon ortamında oksidanların bulunmasına bağlı olarak oksidasyon reaksiyon yoğunluğu artış gösterir. Ferrik iyon asidik ortamda renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülür ve absorban değeri örnekteki oksidan değerini göstermektedir (Çetinkaya, 2013).

Ölçüm işlemi şu aşamalardan oluşmuş ve aşağıdaki grafikte ifade edilmiştir.

Sonuç: $(\Delta \text{ Örneğin absorbanı} / \Delta \text{ Standart2'nin absorbanı}) \times 20$ (Standard2 Değeri)

$\Delta \text{ Standard2 absorbanı} = (\text{Std2'nin ikinci absorbanı} - \text{Std2'nin birinci absorbanı})$

$\Delta \text{ Örnek absorbanı} = (\text{Örneğin ikinci absorbanı} - \text{Örneğin birinci absorbanı})$

Standart 2 Değeri = 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L

Tablo 4.1: *Rosmarinus officinalis* özütlerine ait TOS değerleri

R.OFFİCİNAL İS	HEKZAN	DİKLORMETAN	SU	METANOL
TOS1	0,2117	0,5422	0,7048	0,2232
TOS2	1,2793	1,3197	2,1074	1,5786
TOS	105,8602	77,0947	139,0778	134,3976

Tablo 4.2: TOS Referans Değerleri

TOS REFERANS DEĞERLER ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv/L}$)		
<5.0		Çok İyi
8.0	5.0	Normal
12.0	8.0	Yüksek Oksidan Seviyesi
>12.0		Çok Yüksek Oksidan Seviyesi

Yukarıda Tablo 4.1’de *Rosmarinus officinalis* özütlerine uygulanan TOS1, TOS2 ve TOS değerleri görülmektedir. Tabloya göre, biberiye-hekzan özütü, TOS1 değeri açısından biberiye-metanol özütü ile yakınlık gösterirken, diklormetan-biberiye ve su-biberiye özütünden oldukça düşüktür. Su en yüksek TOS1 değerine sahipken diklormetan su-biberiye özütünü takip etmektedir. TOS2 değeri en yüksek olan biberiye-su özütünü, birbirleriyle yakın TOS2 değerleri gösteren sırasıyla biberiye-metanol, biberiye-diklormetan ve biberiye-hekzan özütleri takip etmektedir. TOS değerine bakıldığında ise, en yüksek total oksidan kapasitenin biberiye-su özütüne ait olduğu ve ona yakın olan metanol özütünde su özütünü takip ettiği görülmektedir. En düşük TOS değerini ise diklormetan göstermektedir.

Tablo 4.1. değerleri birbiriyle karşılaştırılıp ve bu değerler Tablo 4.2’de verilen TOS referans değerleri ile değerlendirmeye alındığında her bir özütün çok yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu görülmektedir.

4.2.2. TAS değerleri

Bu yöntemde, örnekteki antioksidan maddeler Reagent 2 içerisinde bulunan koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini indirgenmiş ABTS formuna dönüştürür. Yöntemde serbest radikal olarak 2.2 AzinoBis 3-Etil Benzo Tiazolin-6-Sulfonik Asit (ABTS), pozitif kontrol olarak ise sentetik antioksidan ve Trolox kullanılmıştır. Trolox, vitamin E analogudur.

Ölçüm işlemi şu aşamalardan oluşmuş ve aşağıdaki grafikte ifade edilmiştir.

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Sample})]}{[(\Delta\text{Abs Std1}) - (\Delta\text{Abs Std2})]}$$

Δ Standard1 absorbansı= (Std1'in ikinci absorbansı - Std1'in birinci absorbansı)

Δ Standard2 absorbansı= (Std2'nin ikinci absorbansı - Std2'nin birinci absorbansı)

Δ Örnek absorbansı = (Örneğin ikinci absorbansı – Örneğin birinci absorbansı)

Tablo 4.3: *Rosmarinus officinalis* özütlerine ait TAS değerleri

R.OFFİCİNAL İS	HEKZA N	DİKLORMETA N	SU	METANO L
TAS1	0,0705	0,1188	0,0791	0,0564
TAS2	0,8343	0,1289	0,0881	0,0665
TAS	1,457678	4,280524	4,28464 4	4,280524

Tablo 4.4: TAS referans değerleri

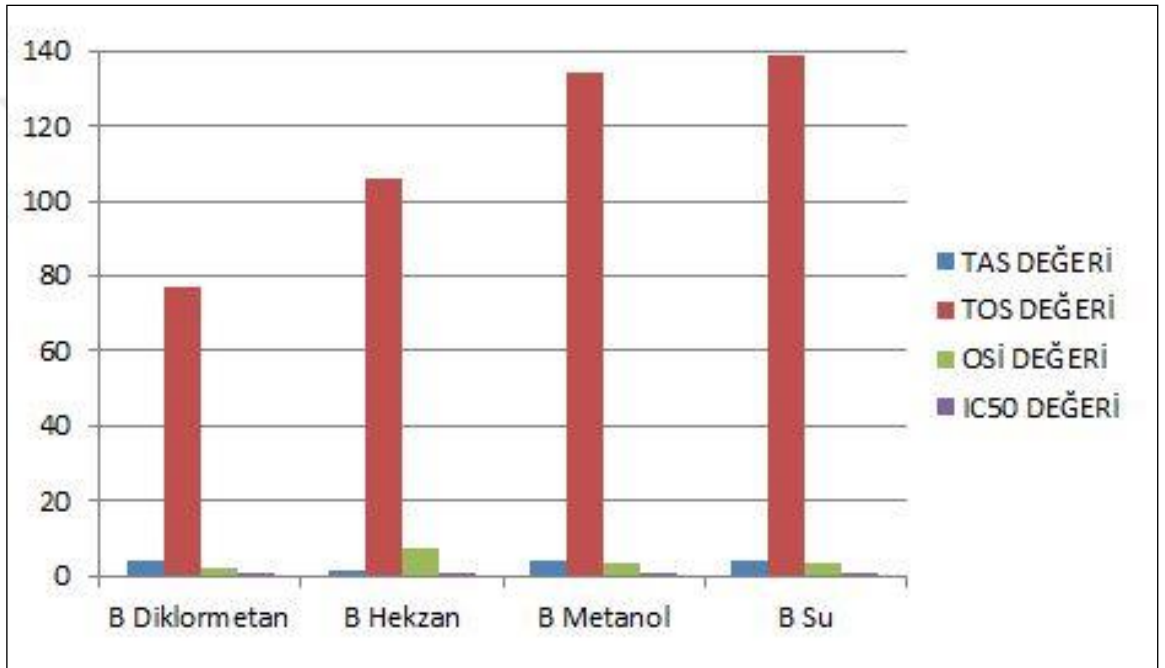
TAS REFERANS DEğERLER ($\mu\text{mol Trolox Equiv/L}$)		
>2.0		Çok İyi
1.45	2.0	Normal
1.2	1.45	Normal Kabul Edilebilir
1.0	1.1	Düşük Antioksidan Seviyesi
<1.20		Çok Düşük Antioksidan Seviyesi

Tablo 4.3'e bakıldığında biberiye hekzan, diklormetan, su ve metanol özütlerinin toplam antioksidan kapasite değerleri görölmektedir. Bu değerlere göre TAS1 değeri diklormetanda en yüksek iken hekzan ve su özütü bu orandan sonra gelmekte, metanol ise en düşük TAS 1 değerini göstermektedir. Diklormetan TAS2 değerinde de en yüksek değerini korumaktadır. Hekzan ve su özütlerinin TAS2 değerleri birbirine çok yakinken, metanol özütü TAS2 değeri bunlardan düşüktür. Ayrıca tabloya bakıldığında asıl total antioksidan kapasitesini temsil eden TAS değeri diklormetan, su ve metanol-biberiye özütleri için birbirine çok yakın ve hekzana göre yüksektir.

Tablo 4.3'den elde edilen sonuçlar, Tablo 4.4'de verilen TAS referans değerleri ile değerlendirilmeye tabi tutulduğunda, biberiye-metanol, biberiye-diklormetan, biberiye-su özütleri çok iyi derecede antioksidan özellik gösterirken, biberiye-hekzan normal derecede antioksidan özellik göstermektedir

Tablo 4.5: TAS-TOS-OSİ- IC₅₀ değerleri

ÖZÜTLER	TAS DEĞERİ	TOS DEĞERİ	OSİ DEĞERİ	IC ₅₀ DEĞERİ
B Diklormetan	4,280524	77,0947	1,801057534	0,002471
B Hekzan	1,457678	105,8602	7,262248589	0,001018
B Metanol	4,280524	134,3976	3,139746442	0,001202
B Su	4,284644	139,0778	3,245959290	0,002379



Şekil 4. 5: TAS-TOS-OSİ- IC₅₀ değerleri grafiği

4.3. *Rosmarinus officinalis* Antimikrobiyal Aktivite Değerleri

Rosmarinus officinalis özütlerinin hiçbir bakteri üzerinde antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır. Bakterilerin her biri biberiye ekstraktlarının varlığına rağmen üremeye başlamış ve koloni oluşturmuşlardır. Böylelikle biberiye bitkisinin antimikrobiyal özelliğinin olmadığı saptanmıştır.

4.4. *Rosmarinus officinalis* Fenolik ve Flavonoid Değerleri

Fenolik madde tayini taze, kurutulmuş biberiye örneklerine uygulanmıştır. Fenolik maddeler Folin-Ciocalteu çözeltisi kullanılarak Zhang ve Hamauzu (2004)

belirttiği şekilde gallik asit standardı kullanarak sonuçlar mg gallik asit/100 g taze ağırlık üzerinden ifade edilmiştir.

Taze, kurutulmuş biberiye örneklerine uygulanan flavonoid madde tayininde sonuçlar, mg kateşin/L olarak ifade edilmiştir.

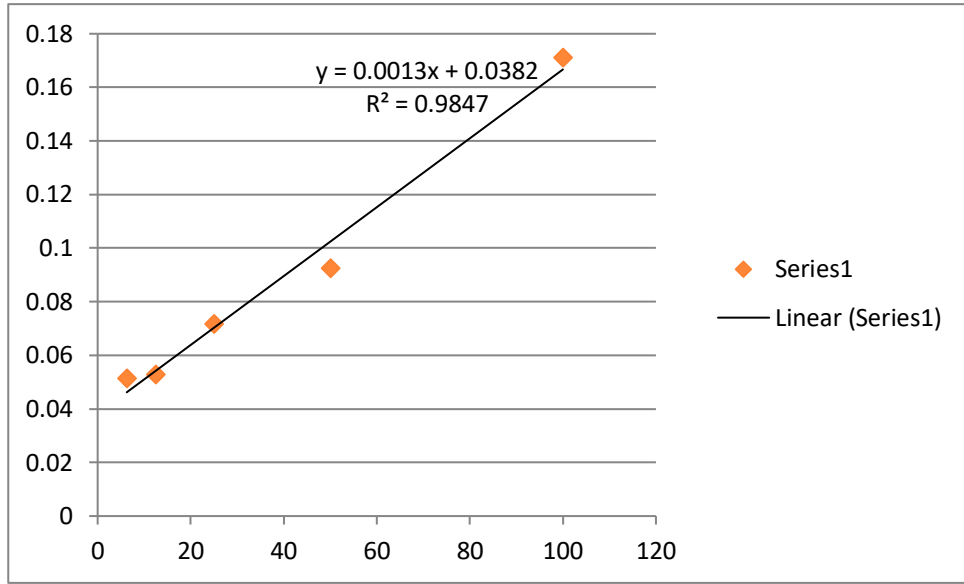
4.4.1. Flavonoid Değerleri ve Grafiği

Rosmarinus officinalis bitkisinin hekzan, diklorometan, su ve metanol özütlerinde flavonoid ölçümleri yapılmış ve elde edilen absorbans değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir.

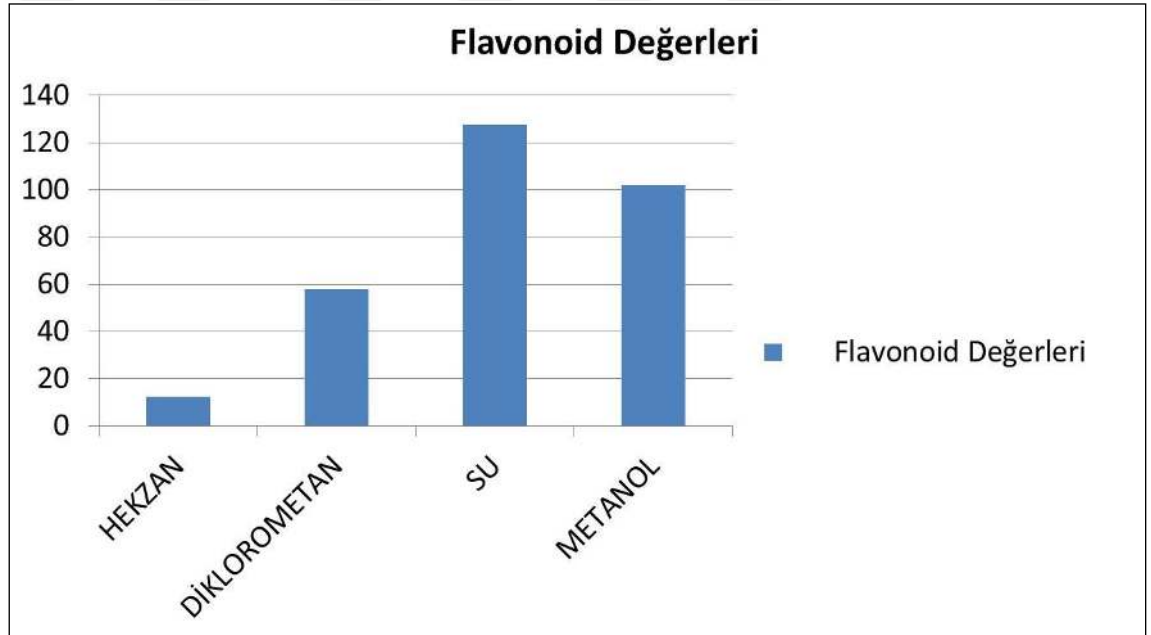
Tablo 4.6: 50 mg bitki özütlerinin flavanoid absorbans değerleri

50MG ÖRNEK	ABSORBANS
HEKZAN	0,0545
DİKLOROMETAN	0,1137
SU	0,2041
METANOL	0,1707

Tablo 4.6’de verilen absorbans değerleri ile Flavanoid grafiği çizilmiş ve Şekil 4.6’da verilen grafik elde edilmiştir. Bu grafikte x eksenini absorbansı, y eksenini ise kateşin/mg örneği temsil etmektedir. Grafikten $y = 0.0013x + 0.0382$ denklemi elde edilmiştir. R^2 değerinin 0.9847 olması, grafiğin doğruluğunu kanıtlar niteliğindedir (R^2 değeri bire ne kadar yakın olursa grafik o kadar doğrudur).



Şekil 4.6: Flavonoid grafiği,



Şekil 4.7'daki grafikten elde edilen denklemde x değerleri yerine Tablo 4.5'de verilmiş olan absorbans değerleri koyularak özütlerin flavanoid değerleri kateşin/mg cinsinden bulunmuştur. Buna göre, en yüksek flavanoid içeriği 127,61 kateşin/mg değerinde olan biberiye'nin su özütünde görülmektedir. 101.92 kateşin/mg değeri ile metanol özütündeki flavanoid değerinin takip ettiği verilerde en düşük değer hekzan özütüne (12.54 kateşin/mg) aittir. Diklormetan özütündeki flavanoid değeri ise, su ve metanol özütlerine göre düşük olup, 58,075 kateşin/mg değeri ile hekzan özütünden daha yüksek bir değere sahiptir.

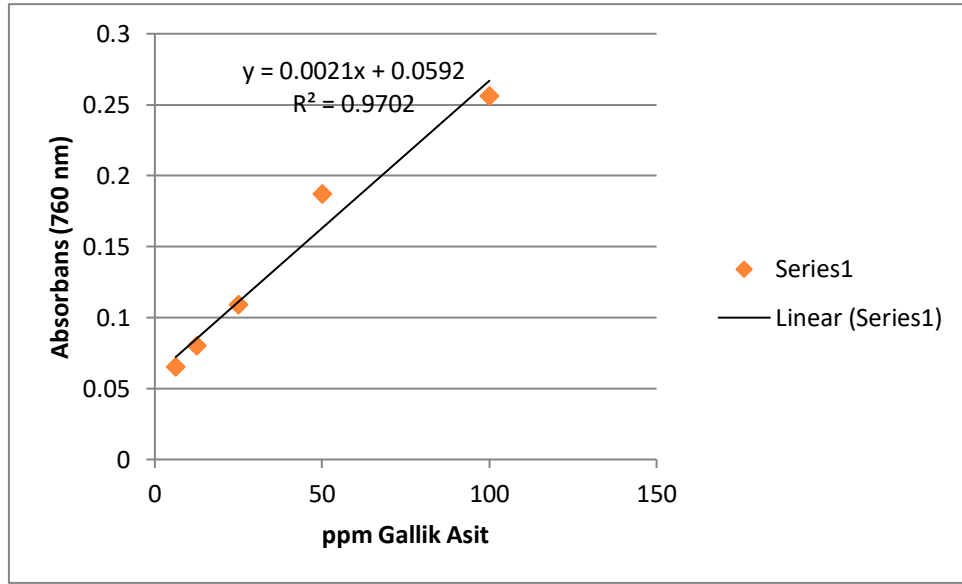
4.5. *Rosmarinus officinalis* Fenolik Grafiği ve Değerleri

Rosmarinus officinalis özütlerinde yapılan fenolik çalışması sonucunda Tablo 4.7’da verilen absorbens değerleri elde edilmiştir.

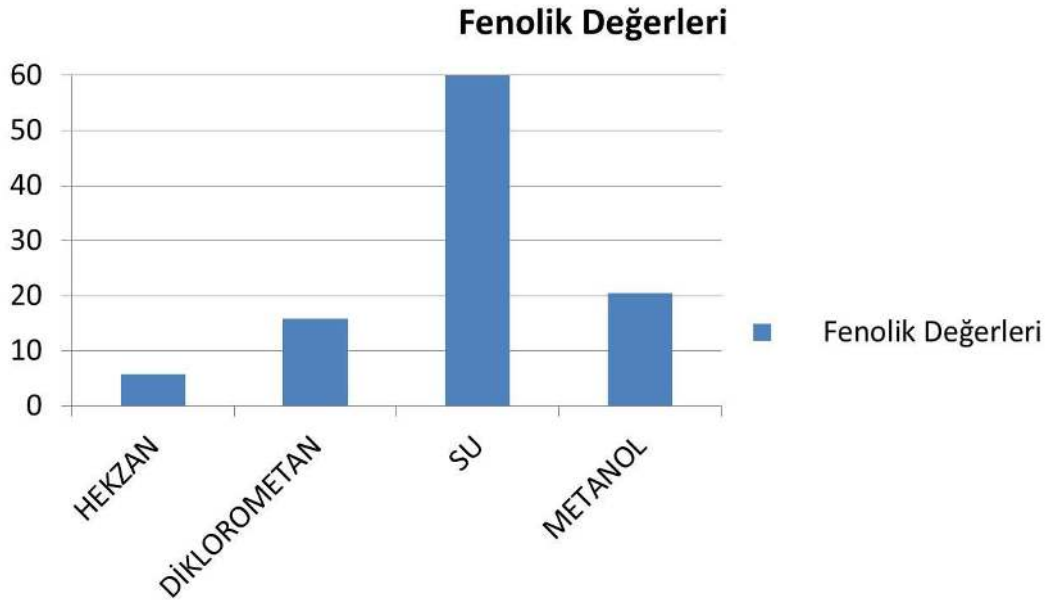
Tablo 4.7: 50 mg bitki özütlerinin fenolik absorbens değerleri

50MG ÖRNEK	ABSORBANS
HEKZAN	0,0471
DİKLOROMETAN	0,0924
SU	0,1851
METANOL	0,1022

Tablo 4.7’da verilen absorbens değerleri ile elde edilen flavanoid grafiği Şekil 4.6’da verilmiştir. Bu tabloda x ekseni gallik asit/ppm değerlerini gösterirken, y ekseni absorbens değerlerini göstermektedir. Grafiğin yapılması ile $y = 0.0021x + 0.0592$ denklemi edilmiştir. R^2 değerleri ise 0,9702’dir ve bire çok yakın olması grafiğin doğruluğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.7: Fenolik grafiği



Şekil 4.7’da verilen grafiğin denkleminde y değeri yerine Tablo 4.6’da verilen absorbans değerleri koyularak gallik asit/ppm niteliğindeki fenolik değerleri elde edilmiştir. Bu değerlere göre, en yüksek fenolik bileşen 59,95 gallik asit/ppm değeriyle su özütünde bulunmaktadır. 20,47 gallik asit/ppm ile metanol özütü ve 15,8 gallik asit/ppm değeri ile diklorometan su özütünde sonra yüksek fenolik bileşen içeren özütler olarak değerlendirilebilmektedir. En düşük fenolik bileşik ise, 5,76 gallik asit/ppm değeri ile hekzan özütündedir.

4.6. Biberiye Özütlerinin DNA Koruyucu Aktivite Bulguları

Rosmarinus officinalis bitkisinin özütlerinin DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmit DNA'sı kullanılarak test edildi. Bu yöntemle göre, DNA hasarına engel olma yeteneği değerlendirilmiştir. Bitkiden elde edilen özütlerin DNA'yı UV ve H₂O₂'nin DNA üzerine hasar verici etkilerine karşı değişik koruyucu etkisi saptanmıştır. Biberiye özütlerinin DNA koruyucu aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8: DNA koruyucu aktivite

Şekil 4.8'e bakıldığında *R.officinalis* DNA koruyucu aktivite açısından en fazla koruyucu aktivite gösteren metanol özütlerin olduğu belirlenmiştir. Diklormetan özütünde konsatrasyonu yüksek olan özüt en iyi koruyucu aktivite göstermiştir. Hekzan özütünde ise 20 mg lik konsantrasyonda en iyi koruyucu etki görülmüştür. Sonuç olarak biberiye bitkisinin DNA'yı Hidrojen peroksit ve UV_C'ye karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Lamiaceae familyasından önemli aromatik ve tıbbi bitkisi olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Tükçede akpüren, kuşdili ve hasalbal farklı isimlerle de ifade edilmektedir (Begum ve ark., 2013). Biberiye çalı görünüşte, soluk mavi renkli ve her dem yeşil kalmayı başaran, 50-100 cm yüksekliğindeki bir bitkidir (Baytop, 1984). Biberiye' nin yetiştirme sahası Akdeniz ikliminin hâkim yabancı yerlerdir (Ceylan, 1987). Dünya'da geniş kullanım alanına sahip olan biberiye süs bitkisi, aromatik ve tıbbi, bir bitki olarak bilinmektedir. Çok büyük bir miktarı doğadan toplanan biberiyenin ülkemizde ve İspanya ile Fransa' da büyük bir yetiştirme sahası bulunmaktadır. Odun dışı orman ürünleri kategorisinde yer alan biberiye, Türkiye'nin batı kıyı şeridi ve güney kesiminde yetiştirilmektedir. 2013 yılı üretim miktarı 172 ton iken 2014 yılında, bu oran 758 tona yükselmiştir. (Kırıcı, 2015). Amerika ve Avrupa'da antioksidan olarak kullanıma sunulan biberiye (Bozin ve ark., 2007) ülkemizde tek ticari bitki olmasından ötürü yetiştiriciliği yapılması gereken bir bitki türüdür.

Literatürde biberiyenin antioksidan etkisinin sentetik antioksidanlar ve α - tokoferol asetat yanında diğer bitkisel ürünlerle karşılaştırıldığı çalışmalara da rastlamak mümkündür. Nitekim Rababah ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada çemen otu, zencefil, yeşil ve siyah çay, üzüm çekirdeği, gotu kola (Hindistan ve Endonezya'ya ait tropik bir bitki), ginkgo (Japon eriği) ekstraktları ile Vitamin E, tertButilhidroksi quinon (TBHQ)'nın toplam fenol içeriği ile antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; toplam fenol içeriği en yüksek biberiye ekstresinde saptanmasına karşılık en yüksek antioksidan aktivitesi üzüm çekirdeği ile yeşil çay ekstraktlarında elde edilmiştir.

İnsan sağlığı açısından sentetik antioksidanların toksik etkileri olabileceği gerçeğinden sonra bitkisel antioksidanlara olan talep artmıştır (Malayoğlu, 2010). Kalite faktörlerinin araştırılması bakımından bilinen antioksidan içeriği ile yeni

antioksidan bitkilerin içeriği hakkında yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Antioksidan içeriğinin belirlenmesi için biberiye bitkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Gurbuz, 2015). Fakat ortaya uygun genotipler ve yeterli koşullar konmadığı için bitkiden standart bir antioksidan elde edilmemiştir.

Yaptığımız çalışmamızda biberiye özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olup, antimikrobiyal etki saptanmamıştır. Genena ve ark., (2008) *Rosmarinus officinalis* bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal bileşenleri üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada DPPH yöntemi kullanmış ve antimikrobiyal etkinin araştırılması için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus cereus* ATCC 11778 ile gram-negatif olan *Escherichia coli* ATCC 25922 ile *Pseudomonas aeruginosa* organizmalarını kullanmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda antimikrobiyal aktivitesi düşük de olsa göstermiştir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda antimikrobiyal etki saptanmayıp bu çalışmayla paralellik göstermemiştir.

Yaptığımız çalışmamızda TAS ve TOS değerleri elde edilmiştir. TOS ve TAS değerleri bakımından su özütleri en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Aynı zamanda en yüksek fenolik bileşen biberiye-su özütünde saptanmıştır. Perez ve ark., (2006), *Rosmarinus officinalis* özütlerindeki antioksidan aktiviteyi ortaya koymak için bir çalışma yapmış ve bu çalışmada metanol, etanol ve su özütlerini kullanarak DPPH yöntemini uygulamıştır. Çalışmanın sonucunda fenolik bileşenlerin en yüksek su özütünde olduğunu ve antioksidan aktivite ile fenolik bileşenlerin korelasyonlarının iyi olduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak diklormetan özütü de kullanılmasına rağmen, sonuç bu çalışma ile paralellik göstermiş ve en yüksek fenolik bileşen oranı biberiye-su özütünde saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada biberiye bitkisinin DNA koruyucu aktivitesi çalışılmıştır ve iyi derecede DNA koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Horvathova ve ark. (2014), biberiye bitkisinden elde ettikleri esansiyel yağ, fenolik ve flavanoid bileşenlerin antioksidatif ve DNA koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada, plazmid DNA kullanmışlardır. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi hidrojen peroksit ile indüklenen DNA hasarları üzerinde çalışılmış ve sonuçlarda

korelasyon göstermiştir. Biberiye bitkisi iyi derecede DNA koruyucu etkiye sahip olduğu için çalışmamız bu çalışma ile örtüşmektedir.

Yaptığımız çalışmamızda biberiye özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olup, antimikrobiyal etki saptanmamıştır. Oliwatuyi ve ark. (2004) yılında biberiye bitkisinin elde ettikleri özütlerin antimikrobiyal etkileri üzerine yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus* kullanmışlar ve metilen dirençli türler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda da özütlerin antimikrobiyal etkileri bulunmamıştır. Bu sebeple bu çalışma ile bizim sonuçlarımız örtüşmektedir.

Çalışmamızda biberiye bitkisinin fenolik, flavonoid bileşenlerine ve antioksidan aktivitesi çalışılmıştır. Sonuç olarak yüksek fenolik, flavonoid bileşenleri olduğu ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Del bano ve ark. (2003), *Rosmarinus officinalis*'in yaprak, çiçek, kök ve meyveleri üzerinde yaptıkları çalışmada fenolik, flavonoid ve antioksidan aktivite ölçümü yapmışlardır. Çalışmanın sonunda bizim çalışmamıza paralel olarak yüksek fenolik, flavonoid bileşenler ve antioksidan aktivite olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca yaptıkları çalışmada kullandıkları bitki kısmına göre, yaprakların en yüksek değerleri gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda biberiye bitkisinin antioksidan aktivitesi çalışılmış ve antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Çeliktaş ve ark., (2007), *Rosmarinus officinalis* özütlerinin antioksidan aktivitesini ölçmüş ve süperkritik karbon dioksiti süpürücü etkisini ortaya koymuşlardır. İzmir, Çanakkale ve Mersinden Aralık, Mart, Haziran ve Kasım aylarındaki farklı hasat aylarında elde ettikleri biberiyeler ile özüt elde etmiş ve DPPH ile TEAC yöntemini kullanarak Süperkritik karbondioksit üstündeki etkisini ölçmüşlerdir. Bizim çalışmamızla benzer olarak DPPH yönteminin kullanıldığı bu çalışma sonucunda bizim çalışmamızdan farklı olarak hidrojen peroksit değil süperkritik karbondioksit kullanılmasına rağmen, çalışmamıza paralel şekilde yüksek oranda antioksidan aktivite ölçülmüş ve yüksek süpürücü etki elde edilmiştir.

Yaptığımız çalışmamızda biberiye özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olup, antimikrobiyal etki saptanmamıştır. Mangena ve Muyima (1999), *Artemisia*

afra, *Pteronia incana* ve *Rosmarinus* türlerine ait esansiyel yağların seçilen bakteri ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırmalı değerlendirmesini yapmışlardır. Toplam 41 bakteri ve maya kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada *Artemisia afra* ve *Rosmarinus officinalis*'in benzer ve *P. incana* türüne göre daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda ise antimikrobiyal aktivite saptanmamıştır.

Biberiye bitkisi üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Yapılan araştırmaların hepsinde biberiye bitkisinin, antioksidan, antimikrobiyal, antifungal etkileri, serbest radikal süpürücü aktiviteleri, DNA üzerindeki koruyucu etkileri, fenolik ve flavanoid bileşen açısından zenginlikleri ve bunların faydalı biyolojik aktivileri doğrulanmakta ve her geçen gün bunların üzerine yeni bilgiler eklenmektedir.

Bu tez çalışmasında da *Rosmarinus officinalis* bitkisinin su, metanol, diklormetan ve hekzan özütleri hazırlanarak TOS, TAS, DPPH grafikleri , fenolik ve flavanoid değerleri ile DNA koruyucu etkisi gösterilmiştir. Hekzan özütünün 0.02 µg/ml konsantrasyonda serbest radikal süpürücü etkisini maksimuma çıkardığı ve bu etkinin % 75 civarlarında olduğu açık bir şekilde görülmektedir. TOS referans değerleri ile her bir özütün çok yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. TAS referans değerleri; biberiye-metanol, biberiye-diklormetan, biberiye-su özütleri çok iyi derecede antioksidan özellik gösterirken, biberiye-hekzan normal derecede antioksidan özellik göstermektedir.

Bu çalışmaya göre, en yüksek flavanoid içeriği 127,61 kateşin/mg değerinde olan biberiyenin su özütünde görülmektedir. 101.92 kateşin/mg değeri ile metanol özütündeki flavanoid değerinin takip ettiği verilerde en düşük değer hekzan özütüne (12.54 kateşin/mg) aittir. Diklormetan özütündeki flavanoid değeri ise, su ve metanol özütlerine göre düşük olup, 58,075 kateşin/mg değeri ile hekzan özütünden daha yüksek bir değere sahiptir. Çalışmamızda, en yüksek fenolik bileşen 59,95 gallik asit/ppm değeriyle su özütünde bulunmaktadır. 20.47 gallik asit/ppm ile metanol özütü ve 15.8 gallik asit/ppm değeri ile diklorometan su özütünde sonra yüksek fenolik bileşen içeren özütler olarak değerlendirilebilmektedir. En düşük fenolik bileşik ise, 5.76 gallik asit/ppm değeri ile hekzan özütündedir.

R. officinalis DNA koruyucu aktivite açısından en fazla koruyucu aktivite gösteren metanol özütlerin olduğu belirlenmiştir. Diklormetan özütünde konsantrasyonu yüksek olan özüt en iyi koruyucu aktivite göstermiştir. Hekzan özütünde ise 20 mg lik konsantrasyonda en iyi koruyucu etki görülmüştür. Sonuç olarak biberiye bitkisinin DNA'yı Hidrojen peroksit ve UV_C'ye karşı koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda diğer çalışmaların aksine antimikrobiyal etkisine rastlanmamıştır. Bu da antimikrobiyal etki göstermesi için özütlerin oranlarının iyi ayarlanması gerektiğine, her miktardaki biberiye bileşenlerinin antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını literatüre katmamızı sağlamıştır. Bu sebeple yaptığımız çalışma *R. Officinalis*'in biyolojik aktivitesinin ortaya konulmasında literatüre katkıda bulunmaktadır.

Son yıllarda, tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen bitkisel ilaç hammaddeleri üzerinde yapılan çalışmalara ilgi giderek artmaktadır. Bunun başlıca nedenleri; bitkilerin, yan etkilerinin bulunmaması ya da sentetik ilaçlara göre yan etkilerinin az olması ve uzun zamandır kullanıldıklarından bu yan etkilerinin iyi bilinmesi, sentetik ilaçların pahalı olması şeklinde sıralanabilir (Kaya 2010). Geleneksel tıp bilhassa Uzak Doğu ülkelerinde yaygındır. Dünya Sağlık Örgütüne göre, dünya nüfusunun %65-80'i geliştirmekte olan ülkelere yaşamakta ve tedavilerinde geleneksel tıptan yararlanmaktadır (Şener 2010). Ancak geleneksel ilaç keşfi sürecinde bitkilerin önemi azalmıştır ve kapsamlı bilimsel araştırmaların eksikliği nedeniyle çok az bitki klinik olarak önerilmektedir (Raskin ve ark. 2002). Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre, dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan yaklaşık 70 000 bitkinin 21 000 kadarı ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Kaya 2010).

Her geçen gün biberiye ve diğer tıbbi aromatik bitkiler üzerindeki çalışmalar artmaktadır. Doğal ve sağlığa yararlı bitki arayışının ve elde var olan bileşenlere bağışıklık kazanan hastalık yapıcıların varlığını engelleyecek bileşenlerin bulunmasının devam edeceği ve gelecekte yararların artacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz MS, Shaheen MS, El-Nekeety AA, Abdel-Wahhab MA. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, **18**, 356–363
- Agostini, F. Santos, A. C. A. D., Rossato, M., Pansera, M. R., Santos, P. L. D., Serafini, L. A., ... & Moyna, P. (2009). Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*(2), 473-478.
- Anonim, 2016, <http://florawww.eeb.uconn.edu/198501280.html> (Erişim tarihi: 09.12.16)
- Bağdat, B. R. Gümüşçü, A. Coşge, B. (2014). Lamiaceae familyasına ait önemli bazı türlerin kullanım alanları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C. S., Shao, X., Pan, M. H., & Ho, C. T. (2010). Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5363-5367.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71-79.
- Begum, A., Sandhya, S., Syed Shaffath, A., Vinod, K. R., Swapna, R., & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci Pol Technol Aliment*, *12*(1), 61-73.
- Bhalodia, N. R., & Shukla, V. J. (2011). Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *2*(2), 104.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 1.
- Castellano, G., Tena, J., & Torrens, F. (2012). Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and Its relation to antioxidant properties of *posidonia oceanica* (L.) Delile. *Environment*, *2*, 6.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2012) *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings, <https://www.cdc.gov/HAI/organisms/klebsiella/klebsiella.html> (Erişim Tarihi: 16.12.2016)
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, *100*(2), 553-559.

Collins, M. A., & Charles, H. P. (1987). Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*, 4(4), 311-315.

Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey and the east Aegean islands (Vol. 7)*. Edinburgh University Press.

del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., del Río, J. A., Ortuño, A., ... & Gerard, D. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis* Antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4247-4253.

Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.

Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.

Frankel, E. N. (2007). *Antioxidants in food and biology: facts and fiction*. Bridgwater, UK: oily Press. 38-40.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., & Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 131-135.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904.

Gade, A., Gaikwad, S., Tiwari, V., Yadav, A., Ingle, A., & Rai, M. (2010). Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: in vitro antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis. *Current Nanoscience*, 6(4), 370-375.

Genena, A. K., Hense, H., Smânia Junior, A., & Souza, S. M. D. (2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28(2), 463-469.

Golla, U., & Bhimathati, S. S. R. (2014). Evaluation of antioxidant and DNA damage protection activity of the hydroalcoholic extract of *Desmostachya bipinnata* L. Stapf. *The Scientific World Journal*, 2014.

Goloniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazon, J. (2013). *Phenolic Acids In Natural Products* (pp. 1957-1973). Springer, Berlin, Heidelberg.

Haksel, M. (2007). *Biberiye (Rosmarinus officinalis)*. Eczacı odası yayınları, Kasım sayı1, 32-35.

Heywood, V. (1997, November). Medicinal and aromatic plants as global resources. In *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 1: Biological Resources, Sustainable Use, Conservation and Ethnobotany* 500(pp. 21-30).

Horvathova, E., Navarova, J., Galova, E., Sevcovicova, A., Chodakova, L., Snahnicanova, Z., ... & Slamenova, D. (2014). Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(28), 6632-6639.

Inatani, R., Nakatani, N., & Fuwa, H. (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and biological chemistry*, 47(3), 521-528.

Jiang, Y., Han, W., Shen, T., & Wang, M. H. (2012). Antioxidant activity and protection from dna damage by water extract from pine (*Pinus densiflora*) bark. *Preventive Nutrition and Food Science*, 17(2), 116-121.

Jorgensen JH and Ferraro MJ. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*, 49, 1749-1755

Kp, V. S., & Savithramma, N. (2013). Synthesis of silver nanoparticles and anti microbial activity from *Cadaba fruticosa*—an important ethnomedicinal plant to treat vitiligo of Kurnool district, Andhra Pradesh, India. *Journal Of Pharm Research*, 3(12)

Kunwar, A., & Priyadarsini, K. I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2), 53.

Küçükçetin, A., & Milci, S. (2008). Staphylococcus aureus ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda Dergisi*, 33(3).

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction. In *Natural Products*(pp. 1543-1580). Springer, Berlin, Heidelberg.

Lee SK, Mbwambo ZH, Chung HS, Luyengi L, Games E JC, Metha RG. Kinghorn, AD& Pezzuto JM. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1, 35-46.

Maiti, S., & Geetha, K. A. (2005). Characterization, genetic improvement and cultivation of *Chlorophytum borivillianum*—an important medicinal plant of India. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(02), 264-272.

Mangena, T., & Muyima, N. Y. O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in applied microbiology*, 28(4), 291-296.

Materska, M., & Perucka, I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1750-1756.

Ocak, H. Ö, DR. (2014). Kan kültürlerinden izole edilmiş kinolon dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında plazmid aracılı kinolon direncinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Trabzon

Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 13 (1): 48-59.

Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., & Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65(24), 3249-3254.

Paşa, Ö. DR. (2013). Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu, metallo ve ampc tipi beta laktamaz varlığının araştırılması, Ampc tipi beta laktamaz üretiminin genotipik olarak saptanması. Uzmanlık Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Hatay.

Percival, M. (1998). *Antioxidants*. Clinical Nutrition Insight. 1/96, Rev. 10/98

Pérez, M. B., Calderon, N. L., & Croci, C. A. (2007). Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food chemistry*, 104(2), 585-592.

Raja, R. R. (2012). Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(3), 203-213.

Schwarz, K., & Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 195(2), 95-98.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., & Yehoshua, Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643.

Singh, R. P., Sharad, S., & Kapur, S. (2004). Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *Journal of Indian Academic Clinical Medicine*, 5(3), 218-225.

Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogianni, E., & Danalatos, N. G. (2016). Medicinal and Aromatic Plants Diversity in Greece and Their Future Prospects: A Review. *Agricultural Science*, 4 (1): 9-20.

Timiryazev, K. A. (2014). *Medicinal plants & their importance*, Rus Devlet Tarım Üniversitesi, Moskova

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M. (2007). Ulubelen, A., A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103:816-822.

Vihakas, M. (2014). Flavonoids and other phenolic compounds: characterization and interactions with lepidopteran and sawfly larvae. Doctoral thesis, University of Turku, Turku, Finland.

Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002). What is oxidative stress?. *Japan Medical Association Journal*, 45(7), 271-276.

Zampelas, A., & Micha, R. (Eds.). (2015). *Antioxidants in health and disease*. CRC Press. 18

Zaouali, Y., Bouzaine, T., & Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3144-3152.

