



Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi (Research Article)

Makale Doi: 10.17100/nevbiltek.763694

Geliş Tarihi:03-07-2020

Kabul Tarihi:16-07-2020



Adıyaman Akdağ (Tut-Erkenek) Bölgesinden Toplanan *Achillea Clusiana* ve *Centranthus Longiflorus* Türlerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri¹

Mustafa GÜLTEKİN^{1*}, Şahlan ÖZTÜRK²

¹Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi

ORCID ID: 0000-0001-9213-1603

²Nevşehir Hacıbektaş Veli Üniversitesi Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü

ORCID ID: 0000-0002-6064-3628

Öz

Bu çalışmada *Achillea Clusiana* Tausch ve *Centranthus longiflorus* Steven türlerinin antioksidan ve anti bakteriyel açıdan etkileri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada DPPH serbest radikali yakalama testi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenolik içerik tayini, β-karoten ve likopen miktar analizleri ve anti bakteriyel etki çalışmaları yapılmıştır. Anti bakteriyel etki çalışmasında kullanılan test patojenleri ticari antibiyotik diskler kullanılarak; antibiyotiklerin patojenler üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Tüm bu çalışmalar neticesinde *Achillea clusiana* Tausch türü yüksek antioksidan etki ve yüksek anti bakteriyel etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Achillea clusiana*, *Centranthus longiflorus*, DPPH, antioksidan, antibakteriyel etki

Antioxidant and Antibacterial Activities of *Achillea Clusiana* and *Centranthus Longiflorus* Collected from Adıyaman Akdağ (Tut-Erkenek) Region

Abstract

In this study, antioxidant and antibacterial effects of *Achillea Clusiana* Tausch and *Centranthus longiflorus* Steven species were determined. In this study, DPPH free radical capture test, metal ions chelating activity, total phenolic content, β-carotene and lycopene values and antibacterial effect was performed. Commercial antibiotic discs used for determination of antibiotic effect for comparison the effect of tested pathogens. As a result of all these studies, *Achillea clusiana* Tausch species showed high antioxidant and antibacterial effect.

Keywords: *Achillea clusiana*, *Centranthus longiflorus*, DPPH, antioxidant, antibacterial effect

1. Giriş

Geçmişten günümüze bitkiler birbirinden farklı hastalıkları tedavi etme amacıyla bir çok kez tercih edilmiştir. Antik çağlarda hemen her kes pek çok otu çay olarak veya besin olarak tanıyor ve kullanıyordu. Bunun yanı sıra, baharat, kozmetik veya diğer amaçlarla da bitkiler insan yaşamının önemli bir parçasıydı[3]. Antik Mısır'da kendisinden ilaç yapılan maddeler arasında çeşitli bitkileri, çeşitli maden ve taşları ve hayvanların bazı uzuvlarını sayabiliriz[1]. O dönemlerde bitkilerin çeşitli kimyasal olmayan metotlarla yağlarını ve özlerini çıkararak kullanımı gerçekleştirilmiştir. Bazı bitkilerden merhemler yapılmıştır. Yara iyileşmesinde ve ameliyat çalışmalarında hayvansal ve bitkisel ürünler kullanılmıştır. Günümüze ulaşan veriler ışığında en çok tıbbi ilaç kullanımı ve yapımı Antik Mısır döneminde gerçekleşmiştir[1]. Antik Mısır'da mumyalama çalışmalarında çürümüş mür otu, çeşitli aromatikler, palmye yağı ve bazı baharatlar da kullanılırdı. [2].

¹ Bu makale yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

*Sorumlu yazar e-mail: 14220910001@nevsehir.edu.t

Antik Yunan'lar da bazı bitkilerden ilaçlar üretmiş ve bu ilaçları da çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmışlardır. Yunan hekimler, kök söküçüler tarafından yıllar boyu toplanan bitkisel drogları kullanmaktaydı. Bunlar, bitki ve kökleri tıpta olduğu kadar büyücülükte de kullanmak için toplamışlar ve bir müddet sonra bunların etkileri hakkında zengin bilgi sahibi olmuşlardı[3]. Mezopotamya uygarlıklarındaki hekimler göz hastalığını çok yakından incelemişler ve bu hastalıkları iyileştirmek için göz banyoları, merhemler ve çeşitli yağlar kullanmışlardır[4]. Göz hastalıklarına karşı bir takım otları kaynatarak yağ içerisinde bir merhem yaptıkları ya da bakır madenini arpa suyuna karıştırarak bununla hasta gözü yıkadıkları öğrenilmektedir[5].

İslamiyet Öncesi Türk'lerde tıbbi ilimlerde dini sembollerden biri olan şamanlar uzmanlaşmıştı. Şamanlar psikolojik yöntemleri kullanarak tedavi etmişlerdir. İlaçla tedavi eden hekimlere ise otacı denmektedir. Kaşgarlı Mahmud, ansiklopedik büyük lûgatında otacıyı şöyle açıklar; ot = bitki, ot, ilâç, ağı bundan dolayı hekime otacı denir. "*Otamak*" ise tedavi etmektir. Otacılar Yusuf Has Hâcib'in Kutadgu Bilig eserinde şu şekilde ifade edilmiştir. "*Otacı'nın sözüne göre, ilâç alınırsa, hastalığa iyi gelir, afsuncu'nun sözüne göre muska taşırsan, cinler senden uzaklaşır*". Otacılar için ilaç hazırlayanlara ise idişçi adı verilmiştir. Günümüzde eczacılara karşılık gelmektedir. İdişçiler genel olarak içecek formda ilaçları hazır bulundururlardı. Her çeşit bitkiyi bilgileri dahilinde hastalığa bağlı olarak karıştırıp ilaç hazırlamakla görevlilerdi[6].

İslamiyet'ten sonra ise İbn-i Sina, Buruni gibi büyük Türk tabipleri yetiştirilmiştir. Kullandıkları yöntemler ve bitkisel ilaçlar günümüz modern tıbbına ışık tutmuştur.

Yıllar içinde mikroskobun keşfi ve geliştirilmesi neticesinde hücreler ve hücre tipleri keşfedilmiştir. Keşfedilen hücrelerdeki; metabolik faaliyetler, hayatta kalma mücadelesi, üreme, boşaltım vs. gibi birçok konu araştırılıp biyoloji ve tıp biliminin hizmetine sunulmuştur. Zamanla birçok hastalığa sebep olan patojenler keşfedilmiştir. Bu aralıkta mikroorganizmalar keşfedilip hücre sel yapıları aydınlatılmıştır. Bitkilerde olduğu gibi mikroorganizmalarda tiplerine bağlı olarak sınıflandırılmıştır.

Elektron mikroskobunun icadı moleküler bilimin ortaya çıkışını sağlamıştır. DNA'nın keşfi ile bir çok hastalığın DNA'ya bağımlı olduğu anlaşılmasına da başlanmıştır. DNA üzerindeki en küçük kusur dahi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. İnsan genom projesinin tamamlanması ile genetik organizasyon çok daha net anlaşılmıştır. Kanser gibi ölümcül hastalıkların keşfedilmesi ile bir çok hücre sel organizasyonun zarar gördüğü, normal de yapması gereken işin dışında bir iş ile uğraştığı, çevresindeki sağlıklı hücreleri rahatsız ederek onları da kanserleştirdiği gibi bir çok yeni alan XXI.y.y. başlarında keşfedilmiştir. Bu süreç içerisinde hücre ölüm mekanizmaları da incelenince tüm bu olayların DNA, kanserojen (kansere sebep olan madde), hücre ölüm yolağı ve mitokondri ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Organizmada gerçekleşen bir takım reaksiyonlar sonucunda eşlenmemiş elektronu bulunan bir takım moleküllerin varlığına ulaşılmıştır. Bu olaylar normal olarak organizmada gerçekleşmesine rağmen popülasyonlar arası ifade yüzdesindeki artış yüzünden güncel hayatta kanser dediğimiz hastalığa yakalanmamıza sebep olmaktadır. Organizma belli bir düzeye kadar kontrol sağlayabilirken bu miktarın üstüne çıkılması sonucunda kanser denilen hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

Kansere sebep olan bazı maddeler fiziksel, kimyasal, viral ve hormonal kaynaklı olabilmektedir. Organizmada normal olarak gerçekleşen metabolik reaksiyonlar neticesinde serbest radikallerin ve ya hormonal bozukluklar neticesinde ortaya çıkan kanser tipleri günümüzde hala araştırılmaktadır. Genel olarak serbest radikaller DNA hasarlarına yol açtığı gibi gen ürünlerine de zarar vererek hücre sel organizasyonun bozulmasında önemli bir faktör olarak nitelendirilmektedir. Serbest radikaller, son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran ve bu açığı kapatabilmek için başka bileşiklerin elektronlarını almaya çalışan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türevleri (ROT/RNT) gibi atom veya bileşiklerdir[9]. Oksijen türevli olan bu maddelere oksidan adı verilmiştir. Mitokondri ATP üretiminin yanı sıra oksidatif fosforilasyon ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretildiği ve bunun bir sonucu olarak da oksidatif hasara en

yoğun olarak maruz kalan organeldir[7]. Bu maddelerin etkilerini azaltabilen ve ya ortadan kaldırabilen maddelere ise **antioksidan** adı verilmiştir.

Bitkiler; günümüz teknolojisi ile incelenince antioksidan aktivite gösterdiği ve çeşitli kanser hastalıklarında pozitif etki gösterdiği inkar edilmez bir gerçektir. Bu gibi maddeleri bitkisel ürünlerin içerisinde belirli miktarlarda görebilmekteyiz. Farmakoloji(ilaç bilimi) alanında bu özellikleri sebebiyle de bitkiler ilaç sanayiinin vazgeçilmez hammaddelerindendir.

Bitkilerin hayatsal fonksiyonlarını gerçekleştirmek için ürettiği moleküllere primer metabolitler denmektedir. Primer metabolitlerin dışında bitkilerin ürettiği aromatik içerikteki bileşenlere ise sekonder metabolitler denmektedir. Sekonder metabolitler içerisinde fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenoidler, glikozitler, ribozomal olmayan peptitler gibi özel bileşikler antioksidan özellik ve antimikrobiyal özellik gösteren bazı bileşik çeşitleridir[8].

Antioksidanların bu özellikleri keşfedildikten sonra gıda sanayiinde kullanımı artmıştır. Bir takım yöntemlerle yapay antioksidanlar koruyucu özelliklerinden dolayı katkı maddeleri olarak gıda sanayiinde kullanılmaktadır. Bunun dışında doğal olarak bitkilerinde sekonder metabolit olarak ürettiği antioksidan özellik gösteren bileşenleri de vardır. Antioksidanların bitkiler tarafın üretilen türlerine doğal antioksidanlar, kimyasal yöntemlerle üretilebilenlerine ise sentetik antioksidanlar denmektedir.

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında mikroorganizmaların üremesi ve ortamda baskın tür olmasını engelleyen doğal antibiyotik özellik gösteren türlerinde olduğu bilinmektedir. Bu tür özellik gösteren bitkiler farmakolojik açıdan oldukça değerlidirler.

Bu çalışmanın amacı; kanser tedavisinde kullanılmak amacıyla bitkisel içeriklerin belirlenmesini, metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikal kirliliğinin azami sınıra indirilmesi, ilaç sanayiinde kullanılan kimyasal materyallerin azaltılması ve bitkisel alternatif tıbbın günümüz teknolojisi ile tedavi etme potansiyelinin kanıtlanmasıdır.

2. Materyal Metot

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada: Sinbo Scm-2934 marka kahve ve baharat öğütücü, ISOLAB laborgerate GmBh marka soxhlet ekstraktörü, Bandelin HD 2070 marka sonikasyon cihazı, SELECTA 2001244 00-E 53034 marka etüv, Tetra T60 marka spektrofotometre, Tetra MED 20 marka otoklav, BUCHI marka rotary evaporatör cihazı, ISOLAB LWD-3004 marka safsu cihazı, KERN & Sohn GmbH marka hassas terazi, VESTEL marka buzdolabı ve SOIF OPTİKAL INSTRUMENTS marka ışık mikroskobu kullanılmıştır.

Ek olarak ISOLAB marka plastik petripler, ISOLAB marka 2.5 ml plastik mikroküvetler, ISOLAB marka plastik öze, ofis zimba makinası, ameliyat bonesi, ISOLAB marka 100-1000 ml erlen mayerler, ipek marka hidrofilik pamuk, alüminyum folyo, saf su, ISOLAB marka 10 µl – 50 µl – 200 µl – 1000 µl pipet uçları ve uygun mikropipetler de elektronik cihazlar dışında kullanılan diğer materyallerdir.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde Merck marka Nutrient broth, Sodium chloride (NaCl), Nutrient Agar, Alkomed marka Etil alkol (% 96), Merck marka Metanol, Aldrich marka DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl), SIGMA- Aldrich marka FeCl₂, SIGMA-Aldrich marka 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid Sodium salt, Sodyum corbanate (Na₂CO₃), folin-Ciocalteu's phenol reagent, Merck marka Aseton ve Merck marka Hekzan kullanılmıştır.

Ayrıca Bioanalyse marka antibiyotik diskler kullanılmıştır.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Deney Mikroorganizmaları

Bu çalışmada *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

2.2. Metod

2.2.1. Ekstraksiyon İşlemleri

Bitkilerin hayat döngülerini belirleyerek toplama koşullarının uygunluğu kesinleştirilmiştir. Rakıma bağlı olarak bitkilerin toplanma aralığı 20 Haziran - 15 Temmuz aralığında belirlenmiştir. Her toplanan bitki köklü bir şekilde alınmıştır. Toplama işlemi bittikten sonra bitkiler güneş almayan bir yerde oda koşullarında yaklaşık bir hafta kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra paketlenip çalışma laboratuvarına ulaştırılmıştır. Tüm bitkilerden yaklaşık olarak 150 gr – 250 gr kuru ağırlık elde edilmiştir. Her ekstraksiyon işlemi için yaklaşık 50-70 gr aralığında kuru madde tartılıp 350 ml etanol varlığında ekstrakte edilmiştir. Elde edilen etanol + bitki ekstresi +4°C de buzdolabında saklanmıştır. Bu aşamadan sonra bitki ekstraktları evoparatör cihazına verilmiştir.

Evoparatör cihazında çözücü madde uzaklaştırılmış ve kalan katı madde + etanol karışımı petrilere dökülmüştür. Çözücü madde; bir gün + 60°C de etüv vasıtasıyla tamamen uçurulmuştur.

2.2.2. DPPH Serbest Radikal Süpürme Testi

Bitki ekstraktlarının serbest radikal süpürme aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidazil (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir[10]. Elde edilen bitki ekstraktlarından 1 gr / 10 ml bitki ekstresi + metanol karışımı ana stok olarak belirlenmiştir. Uygulanan dozlar ise 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm ve 200 ppm olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlardaki bitki ekstresi + metanol karışımı %0,004 DPPH çözeltisiyle muamele edilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortam koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresi sonunda spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri okunmuştur. Negatif kontrol karışımında 1 ml metanol + 1 ml DPPH çözeltisi, örnek karışımında ise bitki ekstresi + metanol (1 ml) ve 1 ml DPPH çözeltisi bulunmaktadır. Pozitif kontrol karışımında ise aynı dozlarda bitki ekstresi + metanol (2 ml) karışımı bulunmaktadır. Serbest radikalleri süpürme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Süpürme = \left\{ \frac{A-(B-C)}{A} \right\} * 100$$

A= Negatif kontrolden okunan absorpsiyon değeri

B= Örnekten okunan absorpsiyon değeri

C= Pozitif kontrolden okunan absorpsiyon değeri

2.2.3. Metal İyonları Şelatlama Testi

Metal iyonları şelatlama aktivitesi testleri serbest halde bulunan ağır metallerin yıkıcı etkilerini inhibe etmek amacıyla kullanılan bir test yöntemidir. Bu çalışmada Decker ve arkadaşının[11] belirlediği yöntemde bazı değişiklikler yapılarak çalışılmıştır. Ana stok üzerinden alınan konsantrasyonlar 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm, 2500 ppm olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda hazırlanan metanol bitki ekstresi karışımlarına 2 mM FeCl₂ ve 5mM ferrozin çözeltisi sırasıyla eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika karanlık ortamda bırakılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra tüm örnekler 562 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Tüm işlemler sonunda % bağlama değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Şelatlama = \left\{ \frac{A-(B-C)}{A} \right\} * 100$$

A= Negatif kontrolden okunan absorpsiyon değeri

B= Örnekten okunan absorpsiyon değeri

C= Pozitif kontrolden okunan absorpsiyon değeri

2.2.4. Total Fenolik Bileşik Miktarının Tespiti

Toplam fenolik bileşik miktarları, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir[9]. Bu işlem için; 0,1 ml metanol + ekstrakt karışımı 0,2 ml %50 folin ile vortex yardımıyla karıştırılıp 3 dakika beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra 1 ml %2'lik Na₂CO₃ eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika karanlık ortamda

inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresi sonunda tüm çözeltiler 760 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülüp aşağıdaki hesaplama metoduna bağlı olarak ekstrakta bulunan total fenolik içerik belirlenmiştir.

$$\text{Total fenol: } y = 0,0063x - 0,0101 \quad x = (y+0,0101) / 0,0063$$

y: okunan abs değeri x: µg cinsinden fenol miktarı

2.2.5. *β-karoten ve Likopen Bileşik Miktarlarının Tespiti*

Çeşitli bitki ekstralarının içerdiği β-karoten ve likopen miktarının tespiti için 0,1 gr kuru bitki ekstresi örneği tartılıp aseton : hekzan (4 ml : 6 ml) karışımında çözdürülmüştür. Daha sonra tüm örnekler 453 nm, 505 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüş aşağıdaki formüllere bağlı kalarak β-karoten ve likopen miktarları belirlenmiştir.

$$\beta\text{-caroten: } [(0,216 \times a(663) \text{ nm}) - (0,304 \times a(505) \text{ nm}) + (0,452 \times a(453) \text{ nm})]$$

$$\text{Likopen: } [(-0,0458 \times a(663) \text{ nm}) + (0,372 \times a(505) \text{ nm}) + (0,0806 \times a(453) \text{ nm})]$$

Bulunan değer 100 ml'deki mg (mg / 100 ml'deki) cinsinden β-karoten ve likopen miktarını ifade eder.

2.2.6. *Mikroorganizmaların Kültür Ortamları*

Çalışmanın bu aşamasında kullanılan bitki ekstraları metanolde çözdürülmüştür. Stok halde bulunan saf ATCC kültürleri nutrient broth besiyerine steril pipet yardımıyla 100 µl eklenmiştir. ATCC kültürleri için aktifleştirme süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan ATCC kültürleri nutrient broth besiyerinde iki kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme için 37°C sıcaklık sabit tutulmuştur.

Sıvı kültürde üretilen ATCC kültürleri nutrient agar besiyerine yayma preparat yöntemi kullanılarak 100 µl eklenmiştir.

2.2.7. *Antibiyogram Testleri İçin Kuyuların Hazırlanması*

Çalışmada kullanılan 9 farklı bitki türü üçerli gruplar halinde ayrılmıştır. Her ayrılan grup için 1 petri hazırlanmıştır. Çalışmada 6 farklı ATCC kültürü kullanılmıştır. Her grup tüm ATCC kültürleri ile muamele edilmiştir. Toplamda her tekrar için 18 petri kullanılmıştır. Aktifleştirme sonrasında her petri eklenen ATCC kültürünün ismi ile kodlanmıştır. Kodlama işlemi sonrasında her petriye 100 µl sıvı kültürden alınan ATCC örnekleri aktarılmıştır. Hazırlanan nutrient agar besiyeri yaklaşık 35°C ile 40°C arasındaki bir sıcaklıkta petrilere aktarılmıştır. Eklenen nutrient agar sonrası petrilere taşmayacak ve kapağa yapışmayacak şekilde hafifçe çalkalanmıştır. Bu işlem ATCC'lerin dağılması tamamen dağılması için yapılmaktadır. Tüm petrilere ekildikten yaklaşık 30 - 40 dakika sonra tamamen donduklarından emin olunmuştur. Petrilere her birine 3 farklı kuyu (8 mm) açılmıştır. Açılan kuyulara bitki ekstraları eklenmiştir. Bu işlemler sonunda petrilere 37°C ye sabitlenen etüvde 24 saat beklemeye alınmıştır. 24 saatlik bekleme süresi sonunda bitki ekstralarının ATCC kültürleri üzerinde oluşturdukları zon çapları ölçülmüştür.

2.2.8. *Antibiyotik Duyarlılık Testi*

Çalışmanın bu kısmında 10 farklı antibiyotik çeşidi kullanılmıştır. Sıvı besiyerinden alınan 100 µl'lik örnekler yayma preparat yöntemi ile steril petrilere aktarılmıştır. Nutrient agar besiyeri 35°C-40°C sıcaklıkta dökülmüştür. Dökülen besiyeri hafifçe test bakterilerinin dağılması için çalkalanmıştır. Yaklaşık 30-40 dakika sonra donduğundan emin olunduktan sonra antibiyotik diskler besiyeri üzerine uygun konumda bırakılmıştır. 24 saat 37°C sıcaklıkta etüvde bekletilmiştir. Bekleme süresi sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür.

3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan bitkilerin tür tanımlamaları Peter Hadland Davis'in Türkiye florası yayınlarından elde edilmiştir. Tür teşhisi yapılan bitkilerin ise www.theplantlist.org internet sayfasından doğruluğu netleştirilmiştir. Çalışmada kullandığımız bitkiler aşağıdakilerdir. Çalışmada kullanılan tüm bitkiler Adıyaman (Tut) Akdağ'ın Malatya sınırlarından toplanmıştır. *Achillea clusiana* Tausch (37°50'52.1"N 37°55'18.5"E), *Centranthus longiflorus* Steven (37°50'26.6"N 37°55'29.1"E)

3.1. DPPH Serbest Radikal Süpürme Aktivitesi

Çalışmalarda kullanılan bitki ekstralarını standart olarak 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm ve 200 ppm konsantrasyon aralığında serbest radikal bağlama aktivitelerine bakıldığında; konsantrasyon oranları arttıkça aktivite oranlarının arttığı gözlemlenmiştir. Bitki ekstralarının DPPH süpürme oranlarının etkileri hesaba katılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Elde edilen değerler baz alındığında etanol ekstraları için *Achillea clusiana* Tausch IC₅₀: 59,29 µg / ml sonucuna varılmıştır. *Centranthus longiflorus* Steven ise IC₅₀: 67,27 µg / ml sonuçlarına sahiptir.

3.2. Metal İyonları Şelatlama Aktivitesi

Çalışmada kullanılan bitki ekstralarının konsantrasyon miktarı arttıkça metal iyonlarını şelatlama aktivitesinde yükselme olduğu görülmüştür. Uygulanan konsantrasyon aralığı 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm ve 2500 ppm aralığındadır. İşleme tabii tutulan iki bitkinin % şelatlama oranları hesaplanmış ve IC₅₀ değerleri bu veriler ışığında belirlenmiştir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi yüksek olan tür; *Achillea clusiana* Tausch'dur. (IC₅₀: 1,47 mg / ml) IC₅₀ değerlerine göre düşük aktiviteyi ise *Centranthus longiflorus* Steven'dır. (IC₅₀: 1,75 mg / ml)

3.3. Biyoaktif İçeriklerin Tayini

Bir maddenin antioksidan özellik gösterdiğini belirlemek için biyoaktif içerik tayini yapılmalıdır. Çalışılan bitki türlerinin; total fenol, likopen ve β-karoten içerikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada; *Achillea clusiana* türü 18,98 mg / g total fenolik içerik miktarına, 69,58 µg / g likopen miktarına ve 110,67 µg / g β-karoten miktarına sahiptir. *Centranthus longiflorus* türü ise 31,56 mg / g total fenolik içerik miktarına, 56,07 µg / g likopen miktarına ve 88,51 µg / g β-karoten miktarına sahip olduğu bulunmuştur.

3.4. Antibakteriyel Etki

Kullanıma hazır hale getirilen katı besiyerlerine kuyular açılmıştır. Steril ortamdaki kuyulara metanolde çözdürülmüş bitki ekstraları eklenmiştir. Bir gün boyunca bakterilerin üremesi için 37°C sıcaklıktaki etüvde beklemeye alınmıştır. 24 saat sonunda bitki ekstralarının bakteriler üzerinde oluşturdukları direnç çapları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları tablo 3.5 te olduğu gibidir.

Tablo 4.1 Bitki ekstralarının anti mikrobiyal aktiviteleri

	Bakteriler						
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	
Bitkiler	<i>Achillea clusiana</i> Tausch	17mm±1,2	16mm±0,8	18mm±1,4	13mm±0,4	11mm±0,4	37mm±1,6
	<i>Centranthus longiflorus</i> Steven	12mm±0,4	20mm±0,6	23mm±0,4	-	21mm±0,8	17mm±0,8

(-) antimikrobiyal etki yok

3.5. Deneysel Bakterilere Karşı Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal etki çalışmalarında kullanılan bakterilerin üzerinde herhangi bir değişiklik yapmadan; aynı bakteriler üzerinde antibiyotik disklerle karşı direnç oluşturup oluşturmadıkları incelenmiştir. Nutrient agar besiyerleri hazırlanıp diskler yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar tablo 3.6 da olduğu gibidir.

Bu çalışmada aynı markaya ait 10 farklı antibiyotik disk kullanılmıştır. Bu çalışmada; Cefuroksim (CXM30) ve Ceftriakson (CRO30) isimli antibiyotikler 5 farklı deney bakterisi üzerinde antibakteriyel etki gösterirken; oksalisin (OX1) antibiyotiği sadece *Micrococcus luteus* adlı deney bakterisi üzerinde etki göstermiştir.

Tablo 4.2 Antibiyotik disklere karşı direnç

	Bakteriler					
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Ampisilin AM10	21mm±0,6	-	23mm±0,6	17mm±0,8	-	-
Erythromcin E15	13mm±0,8	-	17mm±0,4	18mm±0,4	-	46mm±1,4
Gentamisin CN10	14mm±0,6	17mm±0,8	15mm±0,4	-	-	10mm±0,9
CefiksımCF M5	-	-	-	11mm±0,6	24mm±0,8	19mm±0,4
Oksalisin OX1	-	-	-	-	-	35mm±0,4
Penisilin P10	17mm±0,9	-	25mm±1,0	15mm±0,6	-	-
Ceftriakson CRO30	13mm±0,4	11mm±0,4	11mm±0,2	13mm±0,4	21mm±0,4	-
Amoksilin AMC30	15mm±0,6	-	32mm±1,2	29mm±0,9	11mm±0,2	-
Cefuroksım CXM30	13mm±0,2	-	19mm±0,6	17mm±0,8	19mm±0,6	27mm±0,8
Cefoksitin FOX30	-	-	-	-	21mm±0,6	33mm±0,6

(-) antibiyotik etki yok

4. Tartışma ve Sonuç

Bitkiler bir çok alanda kullanılmaktadır. Yer yer besin, ilaç ve çevre düzenlemesi amacıyla çokça tercih edilmektedir. Bitkilerin tıbbi alanlarda inkar edilemez bir ilaç potansiyeli vardır. En basit ağrı kesiciler bile bitkilerden elde edilmiştir. Çeşitli aromatik bitkilerin birbirine benzer ya da birbirinden farklı kimyasal etki mekanizmaları vardır.

Çalışmalarda kullandığımız; *Achillea clusiana* Tausch, ve *Centranthus longiflorus* Steven, türleri üzerinde DPPH radikali süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenolik içerik tayini, β -karoten ve likopen miktar tayini, antibakteriyel aktiviteleri tespit edilmiştir. Ek olarak uygulama yapılan bakteriler üzerinde antibiyotik disklere karşı direnç testleri uygulanmıştır.

Bir maddenin antioksidan özellik gösterip göstermediğini tayin etmede kullanılan yöntemlerden biri de DPPH radikali yakalama aktivitesidir. 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil molekülü olarak DPPH olarak bilinmektedir. Uygulanan bitki ekstralarının dozları arttırıldıkça süpürme aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilerin etanol ekstraları içerisinde; en iyi süpürme aktivitesi gösteren bitki *Achillea clusiana* türü olmuştur. Tüm türler için 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm konsantrasyon aralığında uygulanan dozlar arasında IC₅₀ değeri en iyi olan tür *Achillea clusiana* iken, IC₅₀ değeri bakımından düşük aktiviteyi gösteren ise *Centranthus longiflorus* türü olmuştur.

Çalışmada bitkilerin yanı sıra sentetik antioksidanlardan biri olan BHT molekülü de kullanılmıştır. BHT molekülünün IC₅₀ değeri 43 μ g / ml olarak belirlenmiştir. Bu veriye istinaden *Achillea clusiana* türü için IC₅₀ değeri 43,3 μ g / ml, *Centranthus longiflorus* türü için IC₅₀ değeri 67,27 μ g / ml olarak belirlenmiştir. Bu veriler ışığında bir kıyaslama yapmak gerekirse *Achillea clusiana* türünün sentetik antioksidan olan BHT molekülünden DPPH radikali süpürme noktasında daha iyi olduğu ortadadır.

Önder ve arkadaşlarının [12] yaptığı çalışmada *Centranthus longiflorus* türünün metanol ekstresi için DPPH serbest radikali süpürme testi sonuçlarına göre IC₅₀ değerini 45 μ g / ml bulmuşlardır. Buna göre çalışmada kullanılan bitki ekstresinin sonucu tutarlıdır.

Çoban' ın [13] yaptığı çalışmada *Centranthus longiflorus* türünün metanol ekstesi için DPPH serbest radikali süpürme testi sonuçlarına göre IC₅₀ değerini 45 µg / ml bulmuşlardır. Her iki çalışma; kullanılan bitki ekstresinden elde edilen tutarlı sonucunu desteklemektedir.

Achillea clusiana Tausch türü için yapılan tüm çalışmalar ilk defa yapılmıştır. Sonuçları mukayese edilebilecek analitik veri mevcut değildir.

Bu yöntemde bir maddenin demir iyonlarına bağlanarak indirgemesi prensibi esas alınarak bitki ekstralarının metal iyonlarını bağlayabilme aktiviteleri kıyaslanmıştır. Fe⁺³ iyonun Fe⁺² iyonu haline gelmesi demek demir atomuna bir elektron bağlanması ya da başka bir madde ile bileşik oluşturması demektir. Bu yöntemde sarı renkte olan çözelti karışımı, reaksiyonun gerçekleşmesi ile Prusya mavisine dönüşür[52]. Demir atomlarının organizmadaki yıkıcı etkileri göz önüne alınırsa uygulanan materyalin yine kanserojen etkileri indirgeyeceği düşünülür.

Yapılan çalışmalarda kullanılan ekstraların farklı konsantrasyonlarda; konsantrasyon arttıkça aktivite oranlarının da yükseldiği gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında tüm bitki ekstralarının IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu veriler ışığında *Achillea clusiana* türü için IC₅₀ değeri 1,47 mg / ml iken *Centranthus longiflorus* için ise IC₅₀ değeri 1,75 mg / ml olarak tespit edilmiştir.

Zengin ve arkadaşlarının [14] yaptığı çalışmada; *Centranthus longiflorus* türünün metanol ekstresinde metal iyonları şelatlama testi için IC₅₀ değeri 32,3 mg / ml olarak tespit edilmiştir.

Bu test yöntemlerinde ise antioksidan özellikte olan bitki ekstralarının biyoaktif içeriklerinin tayini yapılmıştır. Bitki ekstresinin β-karoten, likopen ve total fenolik içerik miktarları belirlenmiştir.

β-karoten vitamin A'nın hammaddesi olarak bilinmektedir. Bu madde tıpkı vitamin A gibi yağda çözünmektedir. Oksidasyon ile birlikte oluşan serbest radikalleri scavenging etki ile süpürerek yıkıcı etkilerini inhibe etmektedir. Bu çalışmaya göre *Achillea clusiana* türünün β-karoten miktarı 110,67 µg / g olarak belirlenmiştir. *Centranthus longiflorus* türünün ise β-karoten miktarı 88,51 µg / g olarak tespit edilmiştir.

Likopen ise koyu kırmızı renkte olan bir pigmenttir. Kırmızı renkli bir çok yiyecekte de bolca bulunmaktadır. Karotenoidler ailesi bilinen en güçlü antioksidanları barındırmaktadır. Bu bileşik kirlilik ve UV ışıklardan kaynaklanan serbest radikaller ile mücadele etmede birebirdir. Bu sebepten ötürü bir maddenin antioksidan özelliğinin ortaya koyulabilmesi için likopen miktarını tayin etmek şarttır. Yapılan çalışmaya göre *Achillea clusiana* türünün likopen miktarı 69,58 µg / g, *Centranthus longiflorus* türünün likopen miktarı ise 56,07 µg / g olarak tespit edilmiştir.

Total fenolik içerik tayininde gallik asit denklik yöntemine uygun olan Folin-Ciocalteu reaktifiyle gerçekleştirilmiştir. Fenoller ve flavanoidler antioksidan etki çalışmalarında ölçülmesi gereken materyallerdir. Her türlü serbest radikal ile etkileşim kurabilirler. Yapılan çalışmaya göre *Centranthus longiflorus* türünün total fenolik içerik miktarı 31,56 mg / g iken *Achillea clusiana* türünün total fenolik içerik miktarı 19 mg / g olarak tespit edilmiştir.

Zengin ve arkadaşlarının[14] yaptığı çalışmada *Centranthus longiflorus* türünün metanol ekstraları için total fenolik içerik miktarını 46,2 mg / g olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmalar bütününde β-karoten ve likopen miktarı; metal iyonları şelatlama yöntemi ve DPPH serbest radikali süpürme testi arasında bir korelasyon olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan çalışmanın bu ayağında iki farklı bitkinin metanol ekstralarına ait patojenik test bakterilerine karşı dirençler ölçülmüştür. *Achillea clusiana* tüm patojenik test bakterileri üzerinde anti bakteriyel etkiye sahipken *Centranthus longiflorus* türü ise sadece *Pseudomonas aeruginosa* patojenik test bakterisi üzerinde anti bakteriyel etki göstermemiştir.

Bu çalışmaya ek olarak çalışmada kullanılan patojenik test bakterileri üzerinde antibiyotik disk çalışmaları da yapılmıştır. Yapılan antibiyotik disk çalışmasında cefuroksim (CXM30) antibiyotiği *Bacillus hariç* tüm patojenik test bakterine karşı zon oluşturmuştur. Ancak cefuroksim antibiyotiği çalışmada kullanılan bitki ekstraları ile kıyaslanınca

daha az bir etki göstermiştir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere metanolik bitki ekstrlerimiz çok daha verimli bir seçenektir. Bunun sebebi kullanılan antibiyotiklerin içeriğinin sabit kalması ve bu sebepten organizmaların zamanla kullanılan antibiyotiğe karşı direnç kazanması olarak açıklanabilir. Kullanılan bitki ekstrleri de bu sebepten oldukça etkili olmaktadır. Ancak kimyasal içeriği ve içerdiği organik maddelerin kimyasal yapıları patojenler üzerinde etki kurmaktadır.

Makki ve arkadaşları[15] Lübnan'dan elde ettikleri *Centranthus longiflorus* türünün etanolik bitki ekstresinde yüksek dozlar kullanarak sonuçlar elde etmişlerdir. İki çalışmada da *E.faecalis* patojenleri ortak kullanılmıştır. Makki ve arkadaşları[15] yüksek dozlarda anti bakteriyel etki tespit etmişken; yapılan çalışmada daha düşük dozlarda etki tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *Achillea clusiana* türünün ilk kez anti bakteriyel etki mekanizması çalışılmıştır. Ekstrelerin içeriğinde bulunan likopen ve total fenolik içerik miktarı anti bakteriyel etki üzerinde etkilidir. Elde edilen veriler ışığında bu sonuca varmak mümkündür.

Yapılan tüm çalışmada Adıyaman'nın Tut ilçesi ile Malatya'nın Doğanşehir ilçesine bağlı Erkenek kasabası arasında bulunan Akdağ isimli dağdan toplanan *Achillea clusiana* Tausch, *Centranthus longiflorus* Steven türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan bitki türlerine ait metanol ekstrlerinin farklı konsantrasyon aralığında DPPH serbest radikalini süpürme aktivitesi, metal iyonları şelatlama aktivitesi, total fenolik içerik miktar tayini, likopen miktarı ve β -karoten miktarları ve patojenik test bakterilerine karşı oluşturdukları direnç çapları belirlenmiştir.

Bu testler neticesinde her bitkinin farklı kimyasallar üzerinde farklı etkileri bulunmaktadır. Uygulanan test yöntemlerine bağlı standart bir korelasyon bulunmamaktadır. Her test yönteminin kendine has bir reaksiyon kinetiği mevcuttur. Bu veriler ışığında biyolojik bir materyalin yapılan tek bir test yöntemine bağlı kalarak yüksek antioksidan kapasite gösterdiğini belirlemek mümkün değildir. Sonuçlar uygulanan her test yöntemine ve bitkinin toplandığı bölgesel farklılıklara bağlı olarak değişmektedir. Bitkinin maruz kaldığı koşullar dahi uygulanan test yöntemlerindeki farklılıkların kaynağı olabilmektedir.

Sonuç olarak kullanılmak istenen biyolojik materyalin antioksidan aktivitesi belirlenirken, birbirinden farklı metotlar kullanılarak canlı sistemlerdeki biyokimyasal olayları göz önünde bulundurmak, ayrıca kesinliği ve uygulanabilirliği yüksek yöntemler kullanmak doğruluk oranı yüksek sonuçlar elde etmek için daha iyi olacaktır.

5. Kaynaklar

- [1].Ceran, B., "Antik Mısır Ve Anadolu Uygarlıklarında Tıp", *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, :38s, Konya 2008.
- [2].Akbaş, G., "Mumya bilimi", *PiVOLKA*, 21(7): 12s, 2013.
- [3].Arıhan, S.K., "Antik Dönemde Bitkisel Tıp Ve Tedavi", *Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 199s, Ankara, 2003.
- [4].Uncu M.E., "Eski Mezopotamya'da tıp", *History Studies International Journal Of History* ,5(5): 110, 2013.
- [5].Gündüz, A., "Mezopotamya ve Eski Mısır", Buke Yayınları, : 303s, İstanbul, 2002.
- [6].Altıntaş, A., "Eski Türk Tıbbına Bir Bakış", *Tıp Tarihi Araştırmaları*, 1, : 84-87s, İstanbul 1986.
- [7].Aral, C., "Mitokondriyal DNA Değişimlerinin Kanser İle İlişkinin Araştırılması", *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi*, : 23s, İstanbul, 2007.
- [8].İnternet: Wikipedia Özgür Ansiklopedi "İkincil metabolit"
https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0kincil_metabolit#:~:text=%C4%B0kincil%20metabolit%20canl%C4%B1n%C4%B1n%20normal%20b%C3%BCy%C3%BCme,metabolit%20eksikli%C4%9Finde%20ani%20%C3%B6l%C3%BCm%20gerekle%C5%9Fmez.

- [9].Singleton, V.L., Rossi, J.A., "Clorimetry of total phenolics with phosphomolybdcid-phosphotungstic acid reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158, 1995.
- [10].Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologien*, 28: 25-30, 1995.
- [11].Decker, E.A., Welch, B., "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677, 1990.
- [12].Önder, A., Çınar, A.S., Gençaslan, G., Çoban, T., "Antioxidant potentials of the extracts from 14 selected medicinal plants", *Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine*, 6: 19, 2020
- [13].Çoban, T., "Türkiye'de halk arasında kullanılan bazı bitkilerin antioksidan aktivite potansiyelinin değerlendirilmesi" *Ankara Üniversitesi bilimsel araştırma projesi*, 6, Ankara, 2007
- [14].Zengin, G., Nithiyantham, S., Locatelli, M., Ceylan, R., Uysal, Ş., Aktümsek, A., Selvi, P.K., Maskovic, P., "Screening of in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of different extracts from two uninvestigated wild plants: *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* and *Cerinthus minor* subsp. *Auriculata*", *European Journal of Integrative Medicine*, 8: 286-292, 2016.
- [15].Makki, R., Dirani, Z.E., Rammal, H., Sweidan, A., Al bazzal, A., Crock, A., "Antibacterial Activity of Two Lebanese Plants: *Eryngium creticum* and *Centranthus longiflorus*" *Nanomedicine & Nanotechnology*, 6:5, 5, 2015.