

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

CALAMINTHA NEPETA (L.) SAVI. SUBSP. *GLANDULOSA* (REQ.) P. W. BALL TÜRÜNÜN
PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL,
ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİDEM KARAARSLAN

Balıkesir, Temmuz 2010

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

CALAMINTHA NEPETA (L.) SAVI. SUBSP. *GLANDULOSA* (REQ.) P. W. BALL TÜRÜNÜN
PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL,
ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Didem KARAARSLAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Sınav Tarihi: 23.07.2010

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Gülendam TÜMEN (BAÜ)

Doç. Dr. Arzu U. TÜRKER (AİBÜ)

Doç. Dr. Tülin AŞKUN (BAÜ- Danışman)

Enstitü Yönetim Kurulunun tarih sayılı oturumunun nolu
kararı ile Mezun olmuştur.

Balıkesir, Temmuz - 2010

**Bu tezi 2009/06 nolu proje ile destekleyen Balıkesir Üniversite Rektörlüğü Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.**

ÖZET

***CALAMINTHA NEPETA* (L.) SAVI. SUBSP. *GLANDULOSA* (REQ.) P. W. BALL TÜRÜNÜN PETROL ETERİ, ETANOL VE METANOL EKSTRELERİNİN ANTİBAKTERİYEL, ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

DİDEM KARAARSLAN
Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Doç.Dr.Tülin AŞKUN)
Balıkesir, 2010

Lamiaceae familyası, özellikle Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetişen ve, 200 kadar cins ve 3000' in üzerinde türü bulunan zengin bir familyadır. Çalışmamızda Balıkesir Susurluk ilçesinden toplanan Lamiaceae familyasına ait olan 'Güzel Nane' olarak bilinen *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* bitkisine ait metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri belirlendi. HPLC analizi ile fenolik madde içeriği belirlendi.

Çalışmamızda *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* bitkisine ait metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile incelendi ve minimum bakterisit/fungisit konsantrasyonu belirlendi. Antimikrobiyal aktivite sonucunda, bitki metanol ekstresi sadece *Escherichia coli* üzerinde bakterisit etki gösterdi (12.5 mg/mL). *Aspergillus ochraceus* ve *Fusarium proliferatum* üzerinde 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde fungusit etki gösterdi. Etanol ekstresi *Proteus vulgaris* üzerinde bakterisit etki gösterirken, *F. proliferatum* üzerinde (1.6 mg/mL) fungusit etki gösterdi. Petrol eteri ekstresi *P. vulgaris* ve *E. coli* üzerinde 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit etki gösterdi. *F. proferilatam* üzerinde 1.6 mg/mL ve *A. ochraceus* üzerinde 6.3 mg/mL konsantrasyon değerinde fungusit etki gösterdi.

Antimikrobiyal aktivitede *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Bacillus cereus* (CCM 99), *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) ve maya olan *Candida albicans* (ATCC 10239) kullanıldı.

Antioksidan aktivite DPPH metodu kullanılarak yapıldı ve IC50 değerleri metanol, etanol ve petrol eteri ekstraları için sırasıyla 4.78±0.2, 10.19±0.1, 63.5±1.25 µg/mL olduğu tespit edildi. Total fenol miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla incelenmiş olup, etanol ekstresinin en yüksek total fenol miktarına sahip olduğu belirlendi (187.33 mgGA/gr). Alüminyum Klorür (AlCl₃) Kolorimetrik Metodu kullanılarak metanol ekstresinin 21.7 mgkatakol/gr total flavonoid miktarı ile en yüksek konsantrasyonda flavonoid içerdiği tespit edildi. HPLC analizi sonucunda bitkinin ekstralarında bulunan fenolik bileşikler tespit edildi ve elde ettiğimiz sonuçlarla tartışıldı.

Anahtar kelimeler: *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*, Lamiaceae antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite

ABSTRACT

DETERMINING THE ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF THE PETROLEUM ETHER, ETHANOL AND METHANOL EXTRACTS OF *CALAMINTHA NEPETA* (L.) SAVI. SUBSP. *GLANDULOSA* (REQ.) P. W. BALL

Didem KARAARSLAN
Balıkesir University, Institute of Science
Department of Biology

(MSc Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Tülin AŞKUN)
Balıkesir, 2010

Lamiaceae is a rich family which grows naturally especially in Mediterranean countries and which has approximately 200 kinds and over 3000 species. In our study, the antimicrobial and antioxidant activities of the methanol, ethanol and petroleum ether extracts of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* – a plant that is known as ‘Nice Mint’ and collected in Susurluk county of Balıkesir Province – have been determined.

In our study, the antimicrobial activities of the methanol, ethanol and petroleum ether extracts of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* were examined using the disc diffusion and microdilution methods, and a minimum bactericide/fungicide concentration was determined. As a result of its antimicrobial activity, the methanol extract of the plant had a bactericide effect only on *Escherichia coli* (12.5 mg/mL). It had a fungicide effect on *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium proliferatum* with a concentration of 12.5 mg/mL. The ethanol extract had a bactericide effect on *Proteus vulgaris*, whereas it had a fungicide effect on *F. proliferatum* (1.6 mg/mL). While the petroleum ether extract had a bactericide effect on *P. vulgaris* and *E. coli* with a concentration of 12.5 mg/mL, it had a fungicide effect on *F. proliferatum* with a concentration of 1.6 mg/mL and on *A. ochraceus* with a concentration of 6.3 mg/mL.

For the antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897), *Bacillus cereus* (CCM 99), *Aspergillus niger* van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh. (MUCL 39534), *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2) and *Candida albicans* (ATCC 10239), which is a yeast, were used.

The antioxidant activity was carried out using the DPPH method and the IC₅₀ values of the methanol, ethanol and petroleum ether extracts were found to be 4.78±0.2, 10.19±0.1, 63.5±1.25 µg/mL respectively. The amount of total phenol was examined using the Folin-Ciocalteu method and it was found that the ethanol extract had the highest amount of total phenol (187.33 mgGA/gr). Using the Aluminium Chloride (AlCl₃) Colorimetric Method, it was determined that the methanol extract contained the highest concentration of flavonoid (21.7 mgCatachol/gr). By means of HPLC analysis, phenolic compounds were determined in the extracts of the plant and the results were discussed.

Keywords: *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*, Lamiaceae, antimicrobial activity, antioxidant activity

İÇİNDEKİLER

Konu	Sayfa	
No		
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii	
ABSTRACT, KEY WORDS	iii	
İÇİNDEKİLER	iv	
ŞEKİL LİSTESİ	vi	
ÇİZELGE LİSTESİ	vii	
KISALTMA LİSTESİ	viii	
ÖNSÖZ	ix	
1	GİRİŞ	1
1.1	Lamiaceae Familyası	1
1.1.1	Genel Özellikleri	1
1.1.2	Kullanım Alanları	2
1.2.	<i>Calamintha</i> Mill. Cinsi	2
1.2.1	Genel Özellikleri	2
1.2.2	Morfolojik Özellikleri	3
1.2.3	Kimyasal İçeriği	4
1.2.4	Kullanım Alanları	6
1.2.5	Yöresel Adları	7
1.2.6	Yabancı Dillerdeki Adları	7
1.3.	<i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi subsp. <i>glandulosa</i>	8
1.3.1	Morfolojik Özellikleri	8
1.3.2	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> sistematikteki yeri	9
1.3.3	Türün Türkiye’ de Yayılışı	9
1.3.4	Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları	10
2	ARAÇLAR VE YÖNTEMLER	13
2.1	Bitki Örneğinin Hazırlanışı	13
2.2	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı	14
2.3	Kullanılan Mikroorganizmalar	15
2.4	Kullanılan Besiyerleri	16

2.4.1	Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri	16
2.5	Serum Fizyolojik Hazırlanışı	17
2.6	İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı	17
2.7	Metabolizma İndikatörü Çözeltilisinin Hazırlanışı	18
2.8	Antimikrobiyal Aktivite	18
2.8.1	Disk Difüzyon Yöntemi	18
2.8.2	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)	19
2.8.3	Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) ve Minimum Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MFK)	20
2.9	Antioksidan Aktivite	20
2.9.1	DPPH Metodu	20
2.9.2	Total Fenol Miktar Tayini	21
2.9.2.1	Folin-Ciocaltaeu Yöntemi	21
2.9.3	Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	22
2.9.3.1	Alüminyum Klorür (AlCl ₃) Kolorimetrik Metodu	22
2.10	HPLC Analizi (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)	23
2.10.1	Kullanılan Shimadzu Marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler	23
2.11	Kullanılan Cihazlar	24
3	BULGULAR	25
3.1	Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	25
3.1.1	Disk Difüzyon Yöntemi Bulguları	25
3.1.2	MİK, MBK ve MFK Bulguları	27
3.2	Antioksidan Aktivite Bulguları	34
3.2.1	DPPH Yöntemi Bulguları	34
3.2.2	Total Fenol Yöntemi Bulguları	35
3.2.3	Total Flavonoid Yöntemi Bulguları	36
3.3	HPLC Bulguları	37
4	SONUÇ VE TARTIŞMA	38
5	EKLER	43
6	KAYNAKLAR	47

ŞEKİL TABLOSU

Şekil No	Şekil	Sayfa
Şekil.1.1	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> ' nın yayılışı	9
Şekil 1.2	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	10
Şekil 2.1	Dönerli Buharlaştırıcı	14
Şekil 3.1	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	30
Şekil 3.2	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	30
Şekil 3.3	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	31
Şekil 3.4	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ve etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	31
Şekil 3.5	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresinin disk difüzyon sonuçları	32
Şekil 3.6	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresinin disk difüzyon sonuçları	32
Şekil 3.7	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresinin disk difüzyon sonuçları	33
Şekil 3.8	<i>C. nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresinin küf örneklerinde disk difüzyon sonuçları	33
Şekil 3.9	Gallik asit kalibrasyon grafiği	35
Şekil 3.10	Katakol kalibrasyon grafiği	36
Şekil A-1	HPLC standart kromatogramı	43
Şekil A-2	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresi HPLC kromatogramı	44
Şekil A-3	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresi HPLC kromatogramı	45
Şekil A-4	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresi HPLC kromatogramı	46

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Çizelge Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> ' ya ait bilgiler	13
Çizelge 2.2	Ekstrasyon işlemine ait bilgiler	16
Çizelge 2.3	Antimikrobiyal aktivitede kullanılan besiyerleri	17
Çizelge 3.1	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları	26
Çizelge 3.2	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları	26
Çizelge 3.3	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları	27
Çizelge 3.4	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri	28
Çizelge 3.5	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri	28
Çizelge 3.6	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri	29
Çizelge 3.7	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> bitki ekstrelerinin ve askorbik asitin IC ₅₀ değerleri	34
Çizelge 3.8	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> bitki ekstrelerinin ve askorbik asitin % inhibisyon değerleri	34
Çizelge 3.9	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> bitki ekstrelerinin total fenol miktarları	35
Çizelge 3.10	<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> ekstrelerinin total flavonoid miktarları	36
Çizelge 3.11	Metanol, etanol ve petrol eteri ekstresinde bulunan fenolik maddeler	37

KISALTMA LİSTESİ

Kısaltma	Açılımı
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	Minimum Bakterisit Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungisit Konsantrasyonu
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleriyle yol gösterip, her konuda desteğini hissettiğim, değerli danışman hocam Doç. Dr. Tülin AŞKUN' a sonsuz teşekkür ederim.

Araştırmam süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her konuda yol gösterici olan hocam Sayın Prof. Dr. Gülendım TÜMEN'e sonsuz teşekkürü borç bilirim. Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Fatih SATIL' a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Esra SOLMAZ, Feyzullah TOKAY ve Yalçın ERGİN' e , ayrıca desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmam esnasında içtenlikle her konuda yardımcı olan sevgili Şeyma Nur MODANLIOĞLU' na çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda laboratuvarlarını kullandığım Araş. Gör. Sema ÇARIKÇI başta olmak üzere Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma Merkezi (BÜTAM) çalışanlarına teşekkür ederim.

Antioksidan çalışmamızda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Hüsniye SAĞLAM' a ve bu çalışma sırasında olanaklarından yararlandığımız Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' ne teşekkür ederim.

Altı yıldır emeğiyle, hoşgörüsüyle, sabrıyla yanımda olan sevgili arkadaşım Derya GÜLMEZ' e çok teşekkür ederim.

İdeallerimi gerçekleştirmem doğrultusunda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve her konuda destek olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Balıkesir, 2010 Didem KARAARSLAN

1.GİRİŞ

1.1 Lamiaceae Familyası

1.1.1 Genel Özellikleri

Türkiye Lamiaceae familyasının önemli bir gen merkezi konumunda olup, bu familyaya ait 45 cins, 546 tür ve diğer alt birimlerle birlikte toplam 731 takson ile temsil edilir. Ülkemizdeki endemizm oranı %44.2 olan bu familya, Türkiye' nin en zengin üçüncü familyası konumundadır [1, 2].

Familyanın karakteristik özelliklerinden bazıları; gövde dört köşeli, yapraklar çoğu zaman basit, bazen parçalı ve dekussat dizilişlidir; çiçekler her nodusta vertisillat durumundadır, zigomorf ve bilabiattır. Uçucu yağları; sapı tek, başı sekiz hücreli pul şeklindeki Labiatae tipi salgı tüylerindedir. Çiçeklerde kaliks beş loblu, kalıcı bazen bilabiattır; korolla bilabiattır, üst dudak bazen eksiktir. Stamenler genellikle dört tane olup çoğu zaman didinamdır, bazen de iki stamen bulunur. Ovaryum iki karpelden meydana gelmiş dört gözlü ve üst durumludur, her gözde bir ovül bulunur; stilus ginobaziktir, meyve dört nukstan meydana gelen bir şizokarptır [3].

Çiçeklerinin alt dudak ve üst dudak şeklinde birleşmesinden dolayı De Jussieu tarafından 'Labiatae' olarak adlandırılmış ve 1836 yılında Lindley tarafından Lamiaceae olarak değiştirilmiştir [4].

1.1.2 Kullanım Alanları

Lamiaceae familyası baharat, halk ilacı ve koku kaynağı olarak kullanılan pek çok aromatik bitkiyi içeren bir familyadır [5].

Türkiye florasında yetişen özellikle Lamiaceae familyasının pek çok üyesi (kekik, mercanköşk, sater, karabaş otu, adaçayı, yayla çayı, nane, oğul otu, fesleğen, biberiye, lavanta gibi) koku, tat, baharat, ilaç, içecek gibi pek çok alanda yaygın şekilde değerlendirilmektedir [6].

1.2 *Calamintha* Mill. Cinsi

1.2.1 Genel özellikleri

Türkiye Florası'nda *Calamintha* Mill. (Lamiaceae) cinsi 6' sını endemik olmak üzere 9 tür ve 13 takson ile temsil edilmektedir [7]. Anadolu'da yetişen *Calamintha* genusu 8 tür ve 6 alttür içerir [8].

Calamintha türlerinin çoğunluğunun taksonomisi, diğer benzer *Acinos*, *Clinopodium*, *Micromeria*, and *Satureja* türlerinde olduğu gibi hala yeterince açıklanmamıştır. Kitiç ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmadaki amaç sabit taksonomik karakterleri belirlemek ve bu taksalar arasındaki kemotaksonomik farklılıkları ortaya koymaktır [9].

Linnaean bitki sınıflandırma projesiyle birlikte bazı tanısal benzerlikler bulunan türler ayırt edilmeye çalışılmıştır ve bunlardan biri olan *Calamintha nepeta*'nin 2 alt türünü ayırt etmenin zor olduğu bilinen bir gerçektir [10].

Calamintha nepeta subsp. *glandulosa*'nın sinonimleri *Melissa calamintha* L., *Calamintha officinalis* Moench, *Thymus glandulosus* Req., *Calamintha subnuda* Host, *Calamintha glandulosa* (Req.) Benth, *C. Byzantina*, *C. spruneri* Boiss' dır.

1. Verticillatlar gevşek, sapçık 6-13 mm; yapraklar 11-30 (-43) x 7-20 (-25) mm genellikle her bir taraftan 5-9 testere dişlidir.

subsp. nepeta

1. Verticillatlar yoğun, sapçık 0.5 (-6) mm; yapraklar 8-18 x 8-16 mm, her bir tarafına 5 diş kadar olmak üzere tamamı ya da zayıfça kenarı dişlidir.

subsp. glandulosa [11]

1.2.2 Morfolojik Özellikleri

Çok yıllık bitkiler, basit örtü tüylü, salgı tüylü veya değil. Yapraklar saplı, eliptikten ovata yada orbikulara doğru, nadiren triangular, kenarları krenattan serrata kadar veya tam, düz, pennat damarlı. Verticillastrum, floral yaprakların veya braktelerin koltuğunda, yoğun veya gevşek kimoza az veya çok çiçekli, genellikle saplı. Brakteoller dar, kısa. Kaliks bilabiye, tüp düz, torbalı değil, salgı ve örtü tüylü, 11-13 damarlı, boğaz tüylü, alt dişler üst dişlerden uzun, daima silli. Korolla menekşeden pembeye kadar, üst dudak emarginat, alt dudak 3-loblu. Stamenler 4, alttaki çift üstteki çiftten uzun, anterler üst dudağın altında yer alır, tekalar genellikle divergent. Stilla dalları eşit değil ve ince. Nutletler genişçe ovoidden suborbikulara kadar, tüysüz. Ginodioik veya değildir [11].

1.2.3 Kimyasal İçeriği

Sarer ve Pancani (1998) tarafından Türkiye'nin kuzeyinde yetişen *C.nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa*'nın uçucu yağı çalışılmıştır. Yağın 25 içeriği ve total miktarının %94'ü GC tarafından tanımlanmıştır. Temel bileşenlerin % 40.5 pulegon ve % 23.6' sı mentondur [8].

Akdeniz bölgesinden toplanan *Satureja montana*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* ve *Calamintha nepeta*' dan elde edilen esansiyel yağların kimyasal analizleri ve toksik etki miktarları test edilmiş, dört bitkiden elde edilen yağın biyotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bitkiler içinde en fazla biyotoksik etki *Calamintha* ve *Thymus* ' da gözlenmiştir [12].

Uçucu yağ içeriklerine göre yapılan sınıflandırmalarda; *Lavandula*, *Origanum*, *Satureja* ve *Thymbra* türleri yüksek düzeyde (%2' den fazla), *Acinos*, *Calamintha*, *Cyclotrichium*, *Mentha*, *Nepeta*, *Rosmarinus*, *Salvia* ve *Thymus* türleri orta düzeyde (%0.5-2.0), *Ajuga*, *Ballota*, *Clinopodium*, *Lamium*, *Marrubium*, *Melissa*, *Micromeria*, *Phlomis*, *Scutelleria*, *Sideritis*, *Stachys* ve *Teucrium* türleri düşük düzeyde (%0.5'den az) uçucu yağ içerenler grubunda sınıflandırılmıştır [4].

Souleles ve arkadaşları (1987) yaptıkları çalışmada Lamiaceae familyasındaki monoterpen ve ketonların biyogenetik araştırmalarına göre, yağın temel bileşiği olan pulegone, menthon, izomenthon ve piperitonun varlığına dair bulguları, *C. nepeta* örneğindeki terpenlerin biyogenesinin pulegone yolunu takip ettiğini göstermişlerdir [13].

Kitic ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball türünün hidrodistilasyondan elde edilen yağ, GC ve GC/MS ile analiz edilmiş ve 36 bileşen tanımlamışlardır. Yağın ana bileşenleri olarak pulegone (%37.5), menthone (%17.6), piperitetone (%15.0) ve piperitone (%10.2) bulmuşlardır. Yağın *Aspergillus niger*, *Eschericha coli* ve

Staphylococcus aureus, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı antimikrobiyal etkinliği belirlenmiştir [14].

Calamintha nepeta' nin uçucu yağının kimyasal içeriği ve antimikrobiyal aktivitesi *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella veneziana*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhimurium*, *Fusarium monoliforme*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* ve *Pyricularia oryzae*' e karşı çalışılmıştır. Üstelik yağın temel içerikleri (limonen, pulegon, mentol) aynı mikroorganizmalara karşı test edilmiştir. Sadece pulegonun özellikle *Salmonella* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir [15]. *Calamintha nepeta* yaklaşık olarak pulegone ve diğer ketonları içeren yaklaşık olarak % 0.35 oranında uçucu yağ içerir [16].

Calamintha glandulosa' nin yapraklarından asetilenmiş yeni bir flavon; acacetin 7-O-[6'''-O-acetylglucosyl (1'''→2'')] rhamnosyl (1'''→6'') glucoside ve daha önce bilinen acacetin 7-O-rhamnosyl (1'''→6'') glucoside bileşimiyle beraber izole edilmiştir..

Micromeria' nin tüm türleri ile *C. glandulosa* çalışılmış ve hepsinde acacetin 7-O-[6'''-O-acetylglucosyl (1'''→6'')] glucoside ve acacetin 7-O-rhamnosyl(1'''→6'') glucoside aynı iki bileşik bulunmuştur [17].

Anadolu' da yetişen 5 farklı lokaliteden toplanan *Calamintha nepeta*' nin uçucu yağları Alan ve arkadaşları tarafından (2010) çalışılmış ve ana bileşikler pulegone, menthone, caryophyllene oxide, trans-piperitone oxide, menthol, trans-piperitone oxide, limonene, piperitenone oxide, oxide olarak bulunmuştur [18].

1.2.4 Kullanım Alanları

Calamintha türlerinin yaprakları, çiçekleri ve dalları bitki çaylarında ve geleneksel ilaçlarda, genel olarak uyarıcı, antiseptik ve antispazmatik olarak kullanılmaktadır [19-20]. Türkiye’ de ve bazı ülkelerde *Calamintha* türleri bitki çayı olarak kullanılmaktadır [21-23].

Calamintha nepeta tıptaki kullanımıyla harekete geçirici tonik, antiseptik ve antispazmodik olarak bilinir [24-25].

Calamintha, tenyaları bağırsak kurtlarını öldürebilmektedir. Düzgün şekilde doğranmış yapraklar embriyoyu öldürmekte, mensturasyonu düzenlemektedir. Şarapla pişirildiğinde ve sarma olarak uygulandığında koyu renkli yara izlerini beyaza dönüştürür. Yılan ısırıklarında içten ve dıştan yardımcı olur.

Leonti ve arkadaşlarının (2008) Sicilya’ daki etnobotanik araştırmaları *Calamintha nepeta* Savi’ nin bağırsak parazitlerine, ilaç olarak zehirli hayvanların ısırıklarına karşı ve doğum sancısını tetiklemekte kullanıldığını göstermiştir [26].

Yeni veya nadir kullanımları arasında, *Calamintha nepeta*’ nın böcek ısırıkları için (antiemflamatuar uçucu yağ) ve *Cichorium intybus*’ un (seskiterpen lakton) hipertansiyon için diüretik ajan olarak kullanımı belirtilmiştir. Aynı zamanda *Petroselinum crispum*’ da sivilcelere karşı tedavide çözücü etmen olarak kullanımı bildirilmiştir [27].

Guarrera (2003) yaptığı çalışmada, halk arasında iyi bir antihelmintik olarak düşünülen *Calamintha nepeta* and *A. sativum*’ un, belkide bu özelliğinden dolayı pek çok yemek tarifinde bulunduğunu bildirmiştir [28].

Thymus, *Origanum*, *Satureja* ve *Thymbra* gibi genuslar halk arasında kekik olarak değerlendirilir. Bunun yanında *Calamintha*, *Cyclotrichum*, *Micromeria* ve *Teucrium* cinslerinin bazılarında da kekik olarak faydalanılmaktadır [6].

Calamintha Mill. genusunun bazı türleri geleneksel olarak nanenin yerine, mide toniklerinde, antiseptiklerde ve balgam söktürücü olarak kullanılmıştır [29].

Matt ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada *Calamintha nepeta*' yı kaynatıp suyunu içmenin gut ve cilt hastalıklarına karşı kullanmayı önerdi. Bel ağrılarına karşı da yapraklarının haricen uygulanmasını tavsiye etmişlerdir [16].

Calamintha nepeta (L.)' nin toprak üstü kısımları halk arasında böcek sokmasının deri üzerinde yaptığı kızarıklıkların yok edilmesinde ve veterinerlikte hindi ve tavukların bağırsak parazitlerine karşı korunmasında sarımsak ile birlikte kullanılmıştır [30].

Calamintha nepeta (L.)' nin yaprakları tadlandırıcı olarak omletlerde, enginarlı, salyangozlu yemeklerde, salatalarda ve ekmek, zeytinyağı gibi malzemelerde aromalandırma için kullanılır. Ayrıca uyarıcı, antiseptik, sindirime yardımcı, safra söktürücü olarak tedavi edici kullanımı da kaydedilmiştir [31].

1.2.5 Yöresel Adları

Calamintha türleri yöresel olarak “Güzel nane, Dağ nanesi, Misk otu, Dağ misk otu, Yabani oğul otu” isimlendirilir [21-23].

Calamintha cinsine bazı kaynaklarda çiçeklerinin iri ve nane gibi kokmasından dolayı “İri çiçekli güzel nane” ya da “Türkiye Melissa’ sı, Türk otu, Kediotumsu güzel nane” olarak da bilinmektedir [32].

1.2.6 Yabancı Dillerdeki Adları

Calamintha nepeta Avrupa'nın değişik bölgelerinde ‘Calamithra, Calamithros, Phliscouni, Agrioriganum’ olarak bilinen Labiate familyasından bir

bitkidir [33]. Lesser Calamint olarak da adlandırılır. *Calamintha nepeta* (L.) İtalya’ da Mentuccia olarak isimlendirilir [30].

1.3 *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa*

1.3.1 Morfolojik Özellikleri

Gövde 20-75 cm, tabandan itibaren dikleşerek yükselir. Sıklıkla seyrekten yoğunu doğru düz uzun tüylü yada kıvrık ve kısa tüylüdür. Yapraklar ovat, tam yada kenarları zayıfca oymalı-her bir kenarda 5’ e kadar diş içerir. 8-18 x 8-16 mm, salgı tüylü, hemen hemen uzun ve kısa düz tüylü yada kıvrık kısa tüylü, pennat damarlıdır. Vertisillatlar yoğun, (2-)5-15 çiçeklidir. Pedunkul 0.5(6) mm, sekonder dallar 0-9 mm. Brakte subulat, 1.5-4 mm. Kaliks 3.5-5.5 mm, salgı tüylü hemen hemen kıvrık, seyrek olarak kısa ve uzun tüylü, 13 damarlıdır. Kaliks tüyleri boğazda seyrek ve taşmıştır. Korolla açık mordan pembe renklere doğru, 6.5-12 mm. Çiçekler ginodioiktir.

1. Verticillatlar gevşek, sapçık 6-13 mm; yapraklar 11-30 (-43) x 7-20 (-25) mm genellikle her bir taraftan 5-9 testere dişlidir.

subsp. *nepeta*

1. Verticillatlar yoğun, sapçık 0.5 (-6) mm; yapraklar 8-18 x 8 16 mm, her bir tarafına 5 diş kadar olmak üzere tamamı ya da zayıfca kenarı diş dişidir.

subsp. *glandulosa* [11]

1.3.2 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*' nın Sistematikteki Yeri

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Superdivision: Spermatophyta

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Asteridae

Order: Lamiales

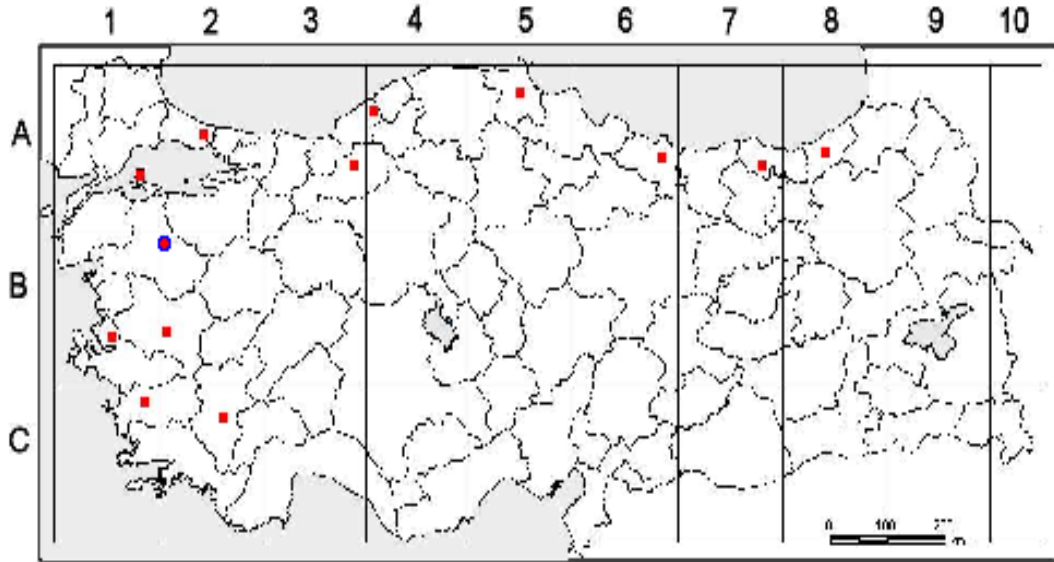
Family: Lamiaceae

Genus: *Calamintha* Mill.

Species: *Calamintha nepeta* (L.) Savi

Subspecies: *Calamintha nepeta* (L.)Savi subsp. *glandulosa* (Reg.) P.W.Ball

1.3.3 Türün Türkiye'deki Yayılışı



Şekil 1.1 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*' nın yayılışı

Türkiye' nin kuzeyi, Batı Anadolu ve Marmara Adası' nda yayılış gösterir. Genellikle kayın - kestane ormanları, kumlu ve kayalık kireçtaşı yamaçlar, tarla ve nehir kenarları arasındaki habitatları tercih eder [34].

1.3.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları



Şekil 1.2 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*

Calamintha nepeta (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball türünün uçucu yağı ile yapılan çalışmada *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı antimikrobiyal etkinliği belirlenmiştir [14].

Çalışmamızda *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball türünün metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının antimikrobiyal, antioksidan aktivitelerini ve HPLC analizi ile içeriğinde bulunan fenolik bileşikleri inceledik. Bu bitkinin Türkiye’ de yetişen lokalitelerinden uçucu yağı ile ilgili çalışma bulunmasına rağmen toprak üstü kısımlarının metanol, etanol ve petrol eteri ekstraları ile ilgili şimdiye kadar herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Biyolojik aktivite ve antioksidan aktivite ile ilgili de çalışma bulunamadı. Çalışmamızda antioksidan aktivite çalışmalarını DPPH metodunun yanı sıra bitki ekstralarında total fenol ve total flavonoid miktarlarını belirleyerek bitki türünün bilinmeyen özelliklerini belirlemeye çalıştık. Bitkimiz ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmaması çalışmamızı özgün kılmaktadır.

Dünya’ da giderek önemi daha da artan bitkisel ilaç kullanımı, ülkemizdeki bitki türlerinin zenginliğinin geniş olması açısından bizleri çok ilgilendirmektedir. Bu açıdan ülkemizde de bitkilerle yapılan çalışmalar giderek artmıştır.

Antibakteriyel etkiye sahip olan bitkiler, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştiren bakteri türlerini kontrol altına alabilme yeteneğine sahiptirler. Bu durumda bitkiler tedavi edici etkilerinin yanı sıra yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi için yapılan araştırmalara da model olarak kullanılabilirler.

Mikrobiyal aktivite besinlerin bozulması ve besin değerlerini kaybetmesine neden olan birincil etkidir *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* türleri, besin zehirlenmelerinden ve kalp, akciğer, kemik iliği, idrar yolları iltihaplarından sorumlu olan bakteri türlerindedir [35]. Besinlerin bozulmasını önlemede ve enfeksiyonel hastalıklara çözüm olması için doğal antimikrobiyallerin keşfi önemlidir.

Çalışmamızın amaçlarından biri de günümüzde yanlış antibiyotik kullanımı sonucu ortaya çıkan antibiyotik direncine karşı yeni ajanların varlığını tespit etmektir. Mikroorganizmalar mikrobiyal aktiviteleri sonucunda birçok hastalığın sebebi olmaktadır. Çalışmaların mikotoksin ve aflatoksin üreten funguslar üzerine

yapılmasında önemlidir. Çünkü aflatoksin üreten *Aspergillus* türleri de hem ekonomik olarak zararlı hemde çeşitli hastalıklara neden olmaktadır.

Antioksidan moleküller, günümüzde oluşan birçok rahatsızlığa sebebiyet veren ajanlar olan genel reaktif oksijen türlerini inaktive ederler [36]. Serbest radikaller antioksidan savunmayı aşarlar ise ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, nörodejenaratif hastalıklar, amfizem, bronşit ve karaciğer hastalıkları gibi yaşlanmayla başlayan dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumlara daha sıklıkla rastlanılmaktadır [37,38]. Bu yüzden serbest radikallerin indirgenmesini sağlayan doğal antioksidanların keşfedilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Antioksidan aktivite çalışmamız doğal antioksidanların keşfedilmesi açısından önem arz etmektedir.

2.ARAÇLAR VE YÖNTEMLER

2.1 Bitki Örneğinin Hazırlanışı

Calamintha nepeta subsp. *glandulosa* 2008 yılında Balıkesir, Susurluk' tan toplandı. Oda sıcaklığında ışık almayan ortamda 25 - 30 gün bekletilerek kurutuldu. Bitkinin teşhisi Prof. Dr. Gülendam TÜMEN ve Doç. Dr. Fatih SATIL tarafından yapıldı. Tür örneği Balıkesir Üniversitesi Biyoloji bölümü herbaryumunda bulunmaktadır. Çizelge 2.1' de bitkiye ait veri tablosu yer almaktadır.

Çizelge 2.1 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* ' ya ait bilgiler

Bitkinin adı	Toplandığı yer	Tarih	Herbaryum numarası	Yükseklik (m)
<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	Balıkesir-Susurluk (Yıldız Köyü, Tepeler)	09.11.2008	FS1508	150m

2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Bitkinin kurutulmasından sonra belli bir miktarda tartılarak yaklaşık 15 - 20 gün boyunca çözücü içerisinde bekletildi. Bekleme sürecinin ardından vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporatör) cihazı kullanılarak ekstre alım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.1).

Cihazın sıcaklığı tüm çözücülerin kaynama noktası sıcaklığına bağlı olarak farklı derecelere ayarlandı. Çizelge 2.2' de çözücü ve elde ettiğimiz cihazın sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi bilgileri verildi. Elde edilen ekstrede kalan çözücünün uzaklaştırılarak konsantre hale gelmesini sağlamak için oda sıcaklığında, ışık görmeyen ortamda 4-5 gün boyunca bekletildi.

Konsantre hale gelmiş ekstrede 0.5 gr tartılarak 5 mL % 5' lik DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözüldü. Bu stoktan 2 mL alınıp 0.22 µL' lik membran filtreden geçirilerek steril stok çözelti elde edildi. Stok çözelti ve ekstre -20°C' de buzdolabında saklandı.



Şekil 2.1 Dönerli Buharlaştırıcı

Çizelge 2.2 Ekstraksiyon işlemine ait bilgiler

Çözücü	Bitki miktarı (gr)	Çözücü miktarı (mL)	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (saat)
Petrol eteri	68	750	40	4
Metanol	68	1000	40	4
Etanol	68	1000	40	7

2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

Gram (+) bakterilerden olan *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Bacillus cereus* (CCM 99) ve gram (-) bakterilerden *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) kullanıldı. Aynı zamanda *Candida albicans* (ATCC 10239) mayası kullanıldı.

Antifungal aktivitede kullanılan filamentli funguslar *Aspergillus niger* Van Tiegh (TA 47-3), *Aspergillus flavus* Link (TA 41-17), *Aspergillus ochraceus* K. Wilh (MUCL 39534) ve *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (TA 18-2)'dir.

2.4 Kullanılan besiyerleri

2.4.1 Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Ticari olarak satın alınan hazır toz besiyerlerinden tartım alınarak distile suda çözüldükten sonra manyetik ısıtıcıda berraklaşınca kadar beklendi.

Besiyeri hazırlarken 200 ml distile su için Nutrient Agar (5.6 gr), Nutrient Broth (1.6 gr), Sabouraud Dekstroz Agar (9.4 gr), Sabouraud Dekstroz Broth (6 gr), Patates Dekstroz Agar (7.8 gr), Malt Agar (9.6 gr) olmak üzere tartıldı.

Agar içeren besiyerleri ısıtılarak agarı tamamen eritildi. Petri ve tüpte olmak üzere 2 şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri 15 dk 121 °C' de otoklavda sterilizasyon edildikten sonra bek alevi yanında petrilere 15 - 20 mL olacak şekilde döküldü.

Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise agarı tamamen eritilen besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanarak 15 dk 121 °C' de steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak bırakılarak donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Broth besiyerleri de manyetik ısıtıcıda karıştırılarak hazırlandıktan sonra 15 dk 121 °C' de steril edilerek tüplere paylaştırıldı. Daha sonra kullanılmak üzere +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Çizelge 2.3 Antimikrobiyal Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	Marka	pH	Kullandığımız alan
Nutrient broth	Difco	6.8±0.2	Antibakteriyel aktivitede MİK değerinin belirlenmesi
Nutrient agar	Fluka	6.8±0.2	Antibakteriyel aktivitede MBK değerinin belirlenmesi, disk difüzyon yöntemi ve yatık agar kültüre alma işlemi
Sabouraud dekstrozo broth	Merck	5.6±0.2	Antifungal aktivitede MİK değerinin belirlenmesi
Sabouraud dekstrozo agar	Merck	5.6±0.2	Antifungal aktivitede MFK değerinin belirlenmesi ve disk difüzyon yöntemi
Malt ekstrakt agar	Merck	7.6±0.2	Antifungal aktivitede yatık agarda küflerin kültüre alınması
Patates dekstrozo agar	Merck	5.6±0.27	Antifungal aktivitede MFK değerinin belirlenmesi ve disk difüzyon yöntemi

2.5 Serum Fizyolojik Hazırlanışı

0.9 gr NaCl, 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. Daha sonra falcon tüplerine paylaştırılarak 20 dk 121 °C’ de steril edildi. Çalışmamızda serum fizyolojik inokulum süspansiyonunun hazırlanışı işleminde kullanıldı.

2.6 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı

Antibakteriyel aktivite çalışmasında bakteri süspansiyonları serum fizyolojik ile MacFarland 0.5 standardına göre hazırlandı. Aynı zamanda spektrofotometre ile 600 nm’ de 0.5 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi.

Antifungal aktivitede fungus inokulumu 450 nm’ de 0.6 absorbans değeri okunarak doğruluğu teyit edildi.

2.7 Metabolizma İndikatörü Çözeltisinin Hazırlanışı

Antibakteriyel çalışmamızda bakteri üremesini kontrol amaçlı olarak Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet (INT); 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür metabolizma indikatörü kullanıldı. 0.04 gr Ledanitrotetrazolium violet tartılarak 10 ml steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Stoğun kontamine olmaması için 2 ml ependorfa aktarılarak çalışıldı. Çözelti +4 °C' de ışık almayan ortamda saklandı.

2.8 Antimikrobiyal Aktivite

2.8.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi ekstrenin mikroorganizma üzerinde kalitatif olarak etkili olup olmadığını bulmak amacıyla uygulandı.

İnokulum süspansiyonu 24 – 48 saatlik taze bakteri kültürlerinden hazırlandı. Nutrient Agar besiyeri bulunan petri plakları üzerine eküvyon çubuk ile yayıldı. Petri üzerine steril diskler yerleştirilip, disklere 15 µl 100 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlarında bitki ekstresi emdirildi. Bu şekilde hazırlanmış petri plakları 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnokulum 7 – 14 günlük taze fungus kültürleri kullanılarak hazırlandı. Bakterilerde olduğu gibi inokulum Sabouraud Dekstroz Agar içeren petri plaklarına eküvyon çubuk yardımıyla yayıldı. Üzerine 15 µl ekstre emdirilmiş diskler yerleştirildikten sonra 72 - 96 saat inkübasyona tabi tutuldu.

Kontrol grubu olarak bakteriler için sulphamethoxazole trimethoprim ve küfler için amphotericin B antibiyotigini içeren diskler kullanıldı. Disk çevresinde bakteri veya küf üremesininin olmadığı bölge inhibisyon zonu olarak adlandırılır. İnkübasyon sonrasında disk çapıda dahil olmak üzere zon çapı ölçülerek mm cinsinden sonuçlar verildi [39].

2.8.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)

Bakteriler ve maya, yatık Nutrient agarda 24 saat 37 °C' de funguslar ise yatık Malt agarda 72 - 96 saat 28 °C' de inkübasyona bırakılarak yetiştirildiler.

Yirmidört saatlik taze kültürlerle inokulum süspansiyonu hazırlandı ve her bir mikroorganizma için well-plate üzerinde üç seri olarak çalışıldı. Küfler için Sabouraud Dekstroz Broth, bakteriler için Nutrient Broth kullanıldı.

İlk kuyucuğa 175 µl besiyeri, diğer kuyucuklara 100 µl besiyeri konuldu. Daha sonra ilk kuyucuğa 25 µl ekstre konuldu ve altıncı kuyucuğa kadar bir önceki kuyucuktan 100 µl ekstre çözeltisi alınarak seri şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işlemi bittiğinde kuyucuklardaki son ekstre konsantrasyonu 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 ve 0.4 mg/mL' lik oldu.

Seyreltme işleminden sonra negatif kontrol dışında bütün kuyucuklara 10 µl inokulum süspansiyonu aşılandı. İçerisinde bitki ekstresi, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96' lık well-plateler, bakteriler için 37 °C' de 24 saat, funguslar için 28 °C' de 72 - 96 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra, üremenin olduğu konsantrasyondan yüksek olan bir önceki konsantrasyon minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri olarak alındı [39,40].

Bakterilerde MİK değerini saptamada Ledanitrotetrazolium violet, metabolizma indikatörü olarak kullanıldı. Bu amaçla well plate çukurlarına 15 µL Ledanitrotetrazolium violet çözeltisi konuldu ve 3-4 saat etüvde 37 °C' de bekletildi. Bekleme sonrasında üremenin olduğu çukurcuklar pembe renge boyandı. Boyanmanın görüldüğü ilk çukurcuktan bir önceki çukurcukta bulunan ekstre konsantrasyonu MİK değeri olarak alındı. Böylece minimum inhibisyon konsantrasyonu tespit edildi.

2.8.3 Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) ve Minimum Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MFK)

MİK değeri mikroorganizmaların statik aktivitesini yani mikroorganizmaların üremesini durduran konsantrasyon değerini belirtirken, bakterisit ve fungusit terimleri mikroorganizmaları öldüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilir.

Bu yöntemde üremenin olmadığı well plate çukurcuklarından 20 µl alınarak bakteriler için Nutrient Agar üzerine, küfler için Sabouraud Dekstroz Agar içeren petri plakların üzerine ekim yapıldı. İnkübasyona bırakıldıktan sonra üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri bakterilerde minimum bakterisit konsantrasyonu (MBK) değeri ve funguslarda minimum fungusit konsantrasyonu (MFK) değeri olarak bulundu [39].

2.9 Antioksidan aktivite

2.9.1 DPPH Metodu

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) çözeltisinin ekstreye karışmasından sonra düşen absorbans değeri, ekstrenin antioksidan aktivitesinin olduğunu gösterir. Belirlediğimiz IC₅₀ (inhibisyon konsantrasyonu) değeri, DPPH çözeltisinin absorbansını % 50 düşüren konsantrasyon değeridir.

Ekstre örneğinden (0.003 gr) tartılıp 3 mL metanolde çözülerek 1000 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözülden 25, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarda standart dilüsyonlar hazırlandı.

DPPH çözeltisi (1.5x10⁻⁵M), 0.0006 gr 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil'in 10 mL metanolde çözülmesiyle hazırlandı.

Calamintha nepeta subsp.*glandulosa* bitki türünün metanol, etanol, ve petrol eteri ekstrelerinden hazırlanmış dilüsyonlarından 1.5 mL alınıp 0.5 mL DPPH çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımlar 30 dakika karanlık bir odada inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm’ de absorbans değerleri UV - vis spektrofotometre ile metanole karşı okundu. Kontrol grubu olarak DPPH çözeltisi kullanıldı [41].

% inhibisyon değeri aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ DPPH İNHİBİSYON DEĞERİ} = [CA - EA] / CA \times 100$$

CA: Kontrol absorbansı

EA: Ekstrenin absorbansı

2.9.2 Total Fenol Miktar Tayini

2.9.2.1 Folin-Ciocaltaeu Yöntemi

Ekstrelerin hazırlanışı: Total fenol yönteminde kullanılmak üzere bitki ekstrelerinden 0.01 gr tartılarak 2 mL saf su içerisinde çözüldü (5mg/mL). Bu stok çözeltiden 1 mg/mL’ lik dilüsyonu hazırlandı.

Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanışı: 2 gr Na₂CO₃ tartılarak (%2’ lik) 100 mL distile su içerisinde çözüldü.

Gallik asit çözeltisinin hazırlanışı: 0.25 gr gallik asit %10’ luk etanol 10 ml içerisinde çözüldü. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak üzere 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/mL’ lik konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlandı.

Ölçüm işlemi: 20 µL bitki ekstresi ve gallik asit, 1.58 mL distile su ve 100 µL Folin-Ciocalteu çözeltisi ile karıştırıldı. 2 dk sonunda 300 µL sodyum karbonat çözeltisinden eklenip 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bekletildikten sonra absorbans değerleri 765 nm’ de ölçüldü ve total fenol miktarları eşdeğer gallik asit miktarı olarak verildi [42].

2.9.3 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

2.9.3.1 Alüminyum Klorür (AlCl₃) Kolorimetrik Metodu

Alüminyum Klorür Kalorimetrik Metodunda referans flavonoid olarak katekol kullanıldı.

Katekol çözeltilerinin hazırlanışı: 25 mL %80 etil alkolde 0.0125 gr katekol çözülerek 500 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltilerden kalibrasyon eğrisi oluşturulmak üzere 20, 40, 60, 80 ve 100 mg/mL’ lik dilüsyonları hazırlandı.

Bitki ekstralarının hazırlanışı: Metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının her birinden 0.025 tartılarak 10 mL % 80 etil alkolde çözülerek 2500 mg/mL’ lik stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 1250 mg/mL ve 500 mg/mL’ lik konsantrasyon değerinde seyreltmeler hazırlandı.

500 µL ekstre ve katekol çözeltisi, 2 mL distile su ve 150 µL % 5’ lik NaNO₃ ile iyice karıştırıldı. 5 dakika bekledikten sonra karışım içerisine 150 µL %10’ luk AlCl₃ eklendi. Altıncı dakikada 1 mL 1M NaOH eklendikten sonra 1.2 mL su ile çözelti 5 mL’ ye tamamlandı. UV-Vis spektrofotometre ile 510 nm’ de ölçüm alındı. Kör çözelti içerisine ekstre yada referans çözelti yerine aynı miktarda distile su konuldu. Sonuçlar eşdeğer katekol miktarı olarak verildi [43].

2.10 HPLC Analizi (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)

Kolon kromatografi çeşitlerinden bir tanesi olan HPLC; yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak ifade edilir. Sıklıkla biyokimya ve analitik kimya alanlarında ayırma, tanımlama ve bileşenlerin miktarını belirleme gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Kolon kromatografisi durgun faz yani paketlenmiş materyal, çözgen olarak ifade edilen hareketli faz, hareketli fazı kolona taşıyan pompa ve moleküllerin tutulma zamanını gösteren dedektör kısımlarından oluşur. Bitki ekstraktlarının fenolik bileşenlerini tayin etme amaçlı bu yöntem kullanılır.

2.10.1 Kullanılan Shimadzu Marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler

Dedektör: DAD dedektör ($\lambda_{max}=278$)

Auto sampler: SIL-10AD vp

System controller: SCL-10Avp

Pump: LC-10ADvp

Degasser: DGU- 14A

Column oven: CTO-10Avp

Kolon: Agilent EclipseXDB-C18 (250x4,60 mm) 5 mikron

Mobil faz: A: %3 asetik asit, B: Metanol

Akış Hızı: 0.8 mL / dakika

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre

Gradient programı

Pumps	CTD-10Avp	SCL-10Avp	Status Log	Time Program		
#	Time	Module	Event	Value	Comment	
1	3.00	Pumps	B.Conc	7		
2	20.00	Pumps	B.Conc	28		
3	28.00	Pumps	B.Conc	25		
4	35.00	Pumps	B.Conc	30		
5	45.00	Pumps	B.Conc	33		
6	60.00	Pumps	B.Conc	33		
7	62.00	Pumps	B.Conc	42		
8	70.00	Pumps	B.Conc	50		
9	75.00	Pumps	B.Conc	80		
10	80.00	Pumps	B.Conc	100		
11						

Numunelerden 10 mg tartılıp 1 mL metanolde çözülerek 20 µL HPLC' ye enjekte edildi.

2.11 Kullanılan Cihazlar

Ekstrelerin antibakteriyel çalışmaları kapsamında Bilser marka W-lamp hepafiltreli laminaflow kullanıldı. Antioksidan çalışmalar sırasında UVWIN 5.0 UV-VIS spektrofotometre ve kuartz küvetler kullanıldı. Bakterilerin uygun sıcaklıklarda inkübasyonu için Elektro-Mag marka etüv kullanıldı.

Çeşitli ekstrelerin ve yıkanan malzemelerin kurutulması amaçlı KD 280 Nüve marka kurutma dolabı kullanıldı. Çözeltilerin ve inokulumların homojen karışmasında Elektro-Mag marka vortex kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1 Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

3.1.1 Disk Difüzyon Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde 6 mm çapa sahip diskler kullanıldı. Bakteriler için kontrol grubu olarak sulphamethoxazole trimethoprim antibiyotiği içeren diskler kullanılırken, küfler için amphotericin B antibiyotiği kullanıldı.

100 mg/mL ve 50 mg/mL konsantrasyonlarında olan bitki ekstraları disklerle emdirilerek çeşitli bakteri ve küflere karşı denendi. İnkübasyon süresinden sonra inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar metanol ekstresi için çizelge 3.1' de, etanol ekstresi için çizelge 3.2' de, petrol eteri ekstresi için çizelge 3.3' te mm cinsinden verildi.

Çizelge 3.1 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* metanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> metanol ekstresi	Disk difüzyon zon çapları(mm)		
	1.5mg/disk	0.75mg/disk	Standart ilaç (25µg/mL)
<i>Proteus vulgaris</i>	7.75±0.95	-	43.75±1.70
<i>Bacillus cereus</i>	10.5±1.29	9.5±0.57	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.75±0.5	-	44.75±1.25
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	12.5±1.91	11±0.81	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	7.5±1.29	-	30.5±1.59
<i>Esherichia coli</i>	10.5±0.57	-	39±0.81
<i>Candida albicans</i>	6.5±0.57	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6.5±0.57	-	10±0.81
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	12.25±0.5
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	16±0.81
<i>Fusarium proliferatum</i>	6.75±0.5	-	10.5±0.57

Çizelge 3.2 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* etanol ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> etanol ekstresi	Disk difüzyon zon çapları(mm)		
	1.5mg/mL	0.75mg/mL	Standart ilaç (25µg/mL)
<i>Proteus vulgaris</i>	10.5±1.29	9±0	43.75±2.06
<i>Bacillus cereus</i>	8.75±0.95	7.25±1.25	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	46±1.15
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	10.5±0.57	9.75±0.95	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	-	30.25±1.25
<i>Esherichia coli</i>	24.18±0.5	6.25±0.5	38.5±1.29
<i>Candida albicans</i>	7±0.81	6.5±0.5	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	7.75±1.25	6.5±0.57	12.25±1.89
<i>Aspergillus niger</i>	6.75±0.5	-	12.25±0.5
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	17±1.41
<i>Fusarium proliferatum</i>	9.5±0.57	7.5±0.57	9.75±0.5

Çizelge 3.3 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* petrol eteri ekstresinin disk difüzyon metodu sonuçları

<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i> petrol eteri ekstresi	Disk difüzyon zon çapları(mm)		
	1.5mg/mL	0.75mg/mL	Standart ilaç (25µg/mL)
<i>Proteus vulgaris</i>	9.5±0.57	7.25±0.5	43.5±1.29
<i>Bacillus cereus</i>	7.5±0.57	6.5±0.57	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.25±0.5	-	30.25±0.5
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	8±0.81	7.25±0.95	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	9±1.25	8.25±0.95	25±0.95
<i>Esherichia coli</i>	8±0.81	5.25±0.5	30.5±1
<i>Candida albicans</i>	17.5±1.29	9±1.41	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	9.5±0.57	-	12.5±0.57
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	12.75±0.5
<i>Aspergillus flavus</i>	6.75±0.95	-	14.75±0.95
<i>Fusarium proliferatum</i>	9±1.82	7.5±0.57	9.5±0.57

3.1.2 MİK ve MBK/MFK Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri olarak ifade edilen MİK, metanol, etanol ve petrol eteri ekstrelerinin, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden konsantrasyon değeri olarak, MBK ve MFK konsantrasyon değeri olarak mg/mL cinsinden sırasıyla çizelge 3.4, 3.5 ve 3.6'da verildi.

Çizelge 3.4 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* metanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri

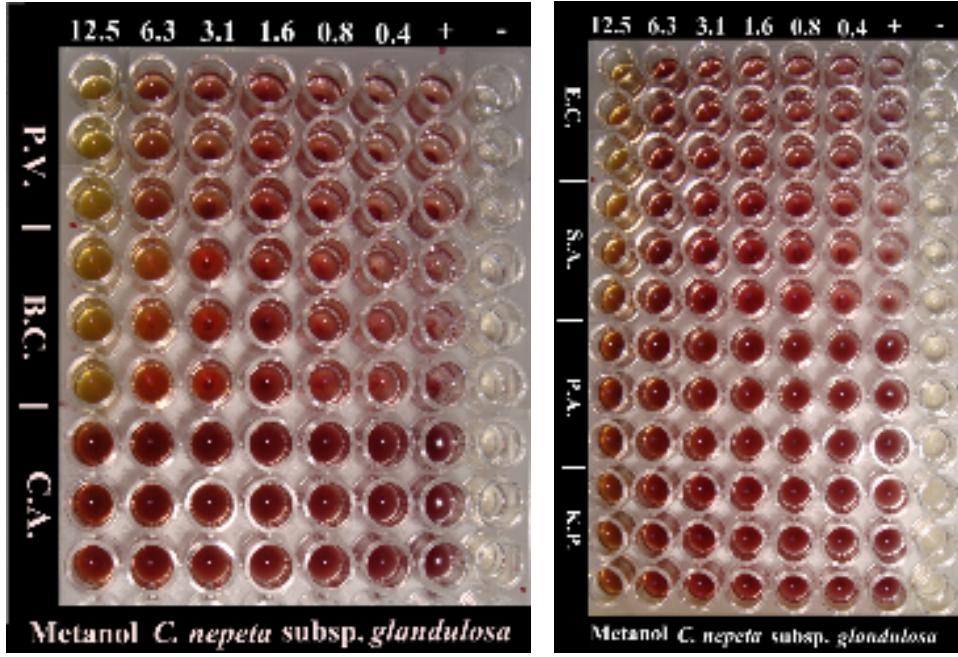
<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	Metanol	
	MİK(mg/ml)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	12.5	>12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	>12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	12.5	>12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>12.5	>12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	>12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12.5	12.5
<i>Aspergillus niger</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	12.5	>12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	12.5	12.5

Çizelge 3.5 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* etanol ekstresinin MİK ve MBK/MFK değerleri

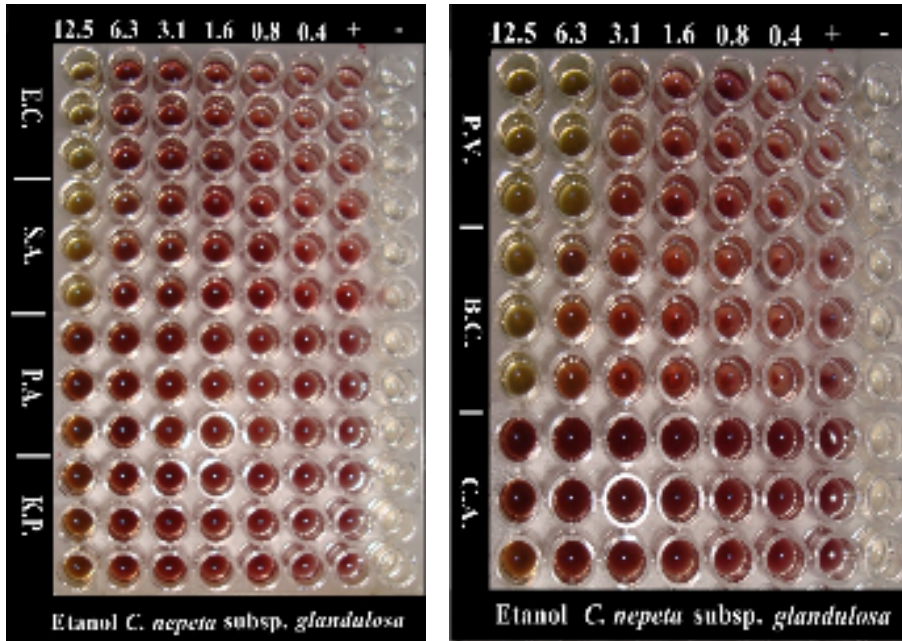
<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	Etanol	
	MİK(mg/ml)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	6.3	12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	>12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	12.5	>12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>12.5	>12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	>12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	>12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,1	6.3
<i>Aspergillus niger</i>	3,1	>12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	3.1	>12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	1.6	1.6

Çizelge 3.6 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* petrol eteri ekstresinin
MİK ve MBK/MFK değerleri

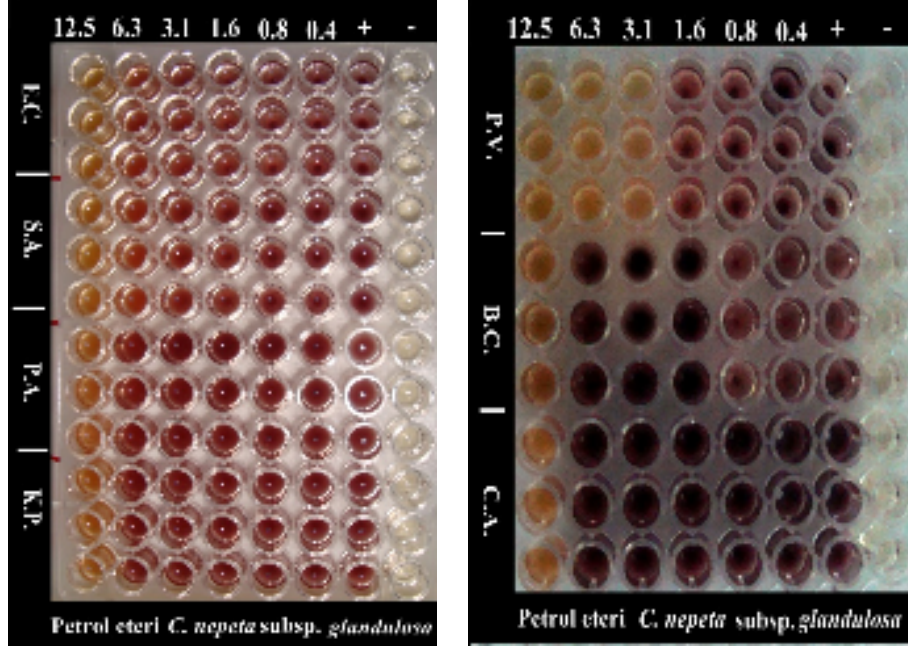
<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	Petrol Eteri	
	MİK(mg/ml)	MBK/MFK(mg/ml)
<i>Proteus vulgaris</i>	3.1	12.5
<i>Klebsiella pneumonia</i>	12.5	>12.5
<i>Bacillus cereus</i>	12.5	>12.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5	>12.5
<i>Escherichia coli</i>	12.5	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	>12.5
<i>Candida albicans</i>	12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1.6	6.3
<i>Aspergillus niger</i>	1.6	>12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	6.3	>12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	1.6	1.6



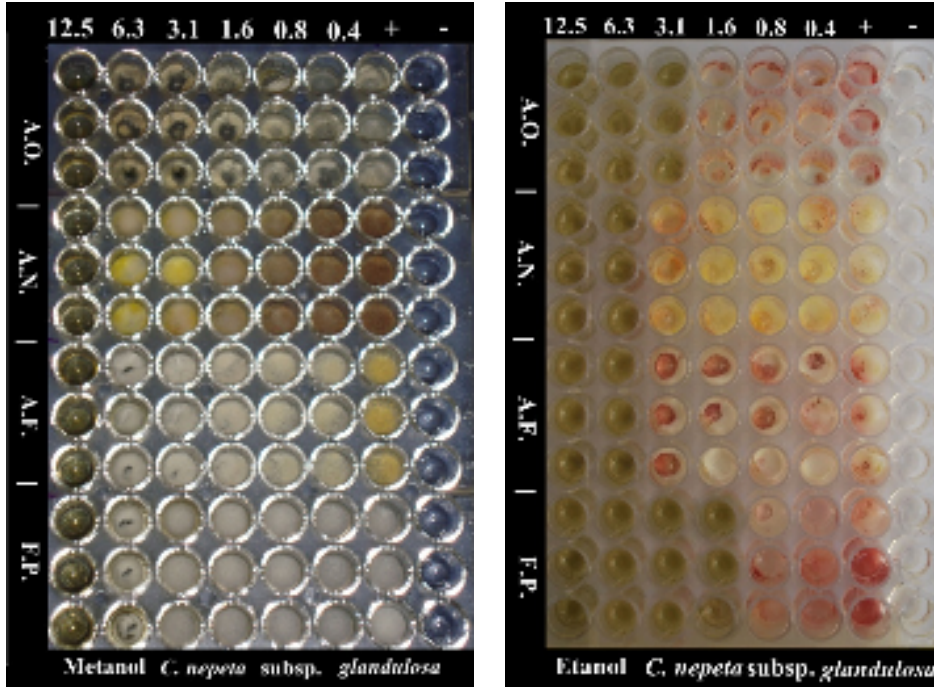
Şekil 3.1 *C. nepeta subsp. glandulosa* metanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (B.C.: *Bacillus cereus*, P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*, P.V.: *Proteus vulgaris*, K.P.: *Klebsiella pneumoniae*, S.A.: *Staphylococcus aureus*, E.C.: *Escherichia coli*, C.A.: *Candida albicans*), (Konsantrasyon 12.5-0.4 mg/mL)



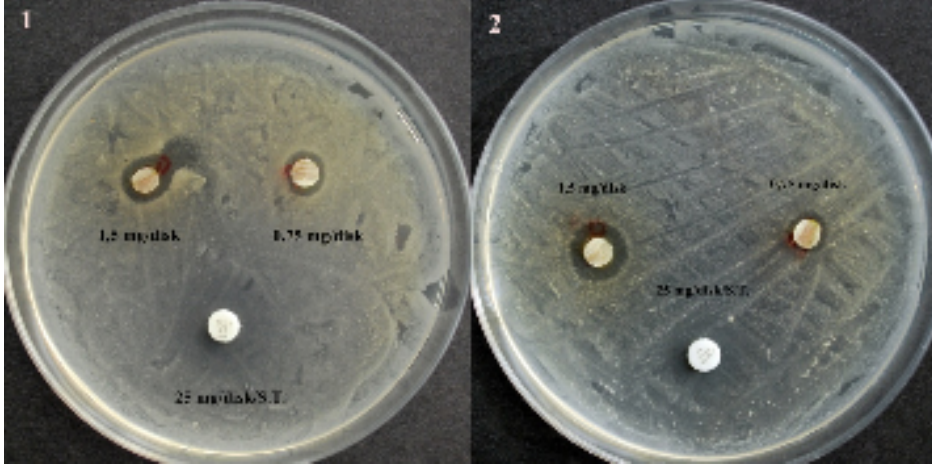
Şekil 3.2 *C. nepeta subsp. glandulosa* etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar



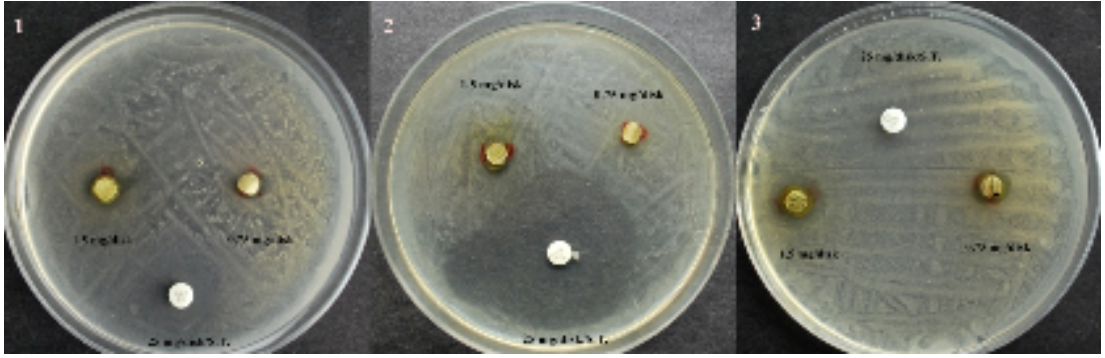
Şekil 3.3 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* petrol eteri ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar



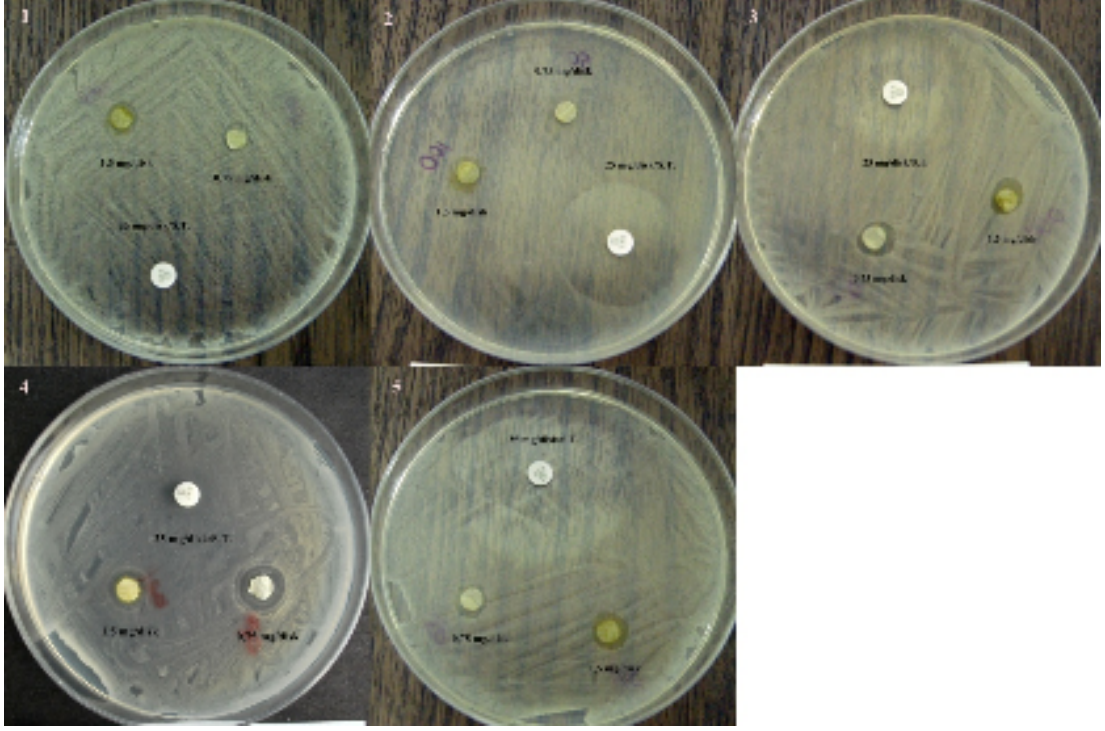
Şekil 3.4 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* metanol ve etanol ekstresinin MİK sonuçlarına ait fotoğraflar (A.O.: *Aspergillus ochraceus*, A.N.: *Aspergillus niger*, A.F.: *Aspergillus flavus*, F.P.: *Fusarium proliferatum*) (Konsantrasyon 12.5-0.4 mg/mL)



Şekil 3.5 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* metanol ektresinin disk difüzyon sonuçları
1) *B. cereus* 2) *P. aeruginosa*

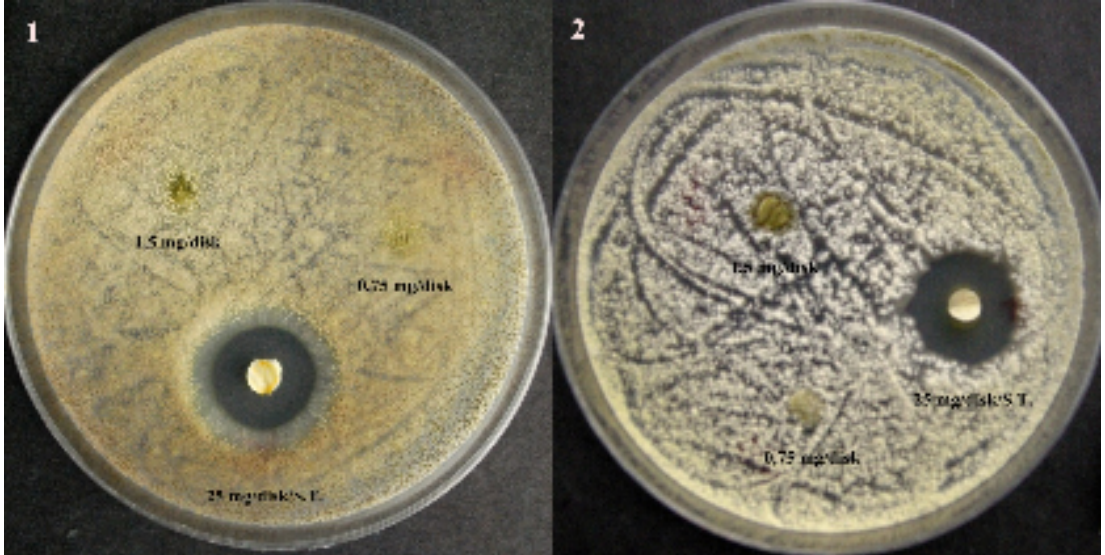


Şekil 3.6 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* etanol ektresinin disk difüzyon sonuçları
1) *B. cereus* 2) *K. pneumonia* 3) *P. aeruginosa*



Şekil 3.7 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* petrol eteri ektresinin disk difüzyon sonuçları

- 1) *B. cereus* 2) *E. coli* 3) *K. pneumonia* 4) *P. aeruginosa* 5) *P. vulgaris*



Şekil 3.8 *C. nepeta* subsp. *glandulosa* etanol ektresinin küf örneklerinde disk difüzyon sonuçları 1) *A. niger* 2) *A. flavus*

3.2 Antioksidan Aktivite Bulguları

3.2.1 DPPH Yöntemi Bulguları

DPPH çözeltisi ($1,5 \times 10^{-5} M$) ve ekstrelerle hazırlanan karışımlar 30 dakika karanlık odada inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sürecinden sonra karışımların UV-Vis spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. DPPH absorbansını % 50 düşüren konsantrasyon değeri olarak ifade edilen ekstrelere ait IC_{50} ve % inhibisyon değerleri sırasıyla çizelge 3.7 ve 3.8’de verildi.

Çizelge 3.7 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* bitki ekstrelerinin ve askorbik asitin IC_{50} değerleri

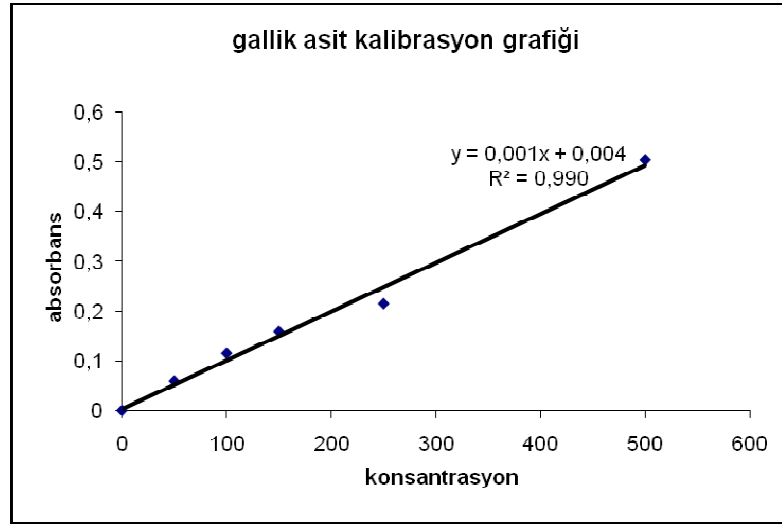
<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	$IC_{50}(\mu g/mL)$
Metanol	4.78±0.2
Etanol	10.19±0.1
Petrol eter	63.5±1.25
Askorbik asit	8.9±0.1

Çizelge 3.8 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* bitki ekstrelerinin ve askorbik asitin % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon ($\mu g/mL$)	Askorbik asit (%inhibisyon)	Metanol ekstresi (%inhibisyon)	Etanol ekstresi (%inhibisyon)	Petrol eteri ekstresi (%inhibisyon)
25	62.35	61.95	55.37	44.52
50	97.01	66.33	73.80	51.79
100	97.21	94.82	95.31	46.41
200	96.91	94.52	94.42	61.05

3.2.2 Total Fenol Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde referans fenolik madde olarak gallik asit kullanıldı. Gallik asit %10' luk etanolde çözülerek çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler elde edildi ve UV-Vis spektrofotometrede 765 nm' de ölçüldü. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden ekstrelerin total fenol miktarları gram ekstrede eşdeğer gallik asit miktarı cinsinden çizelge 3.9' da verildi.



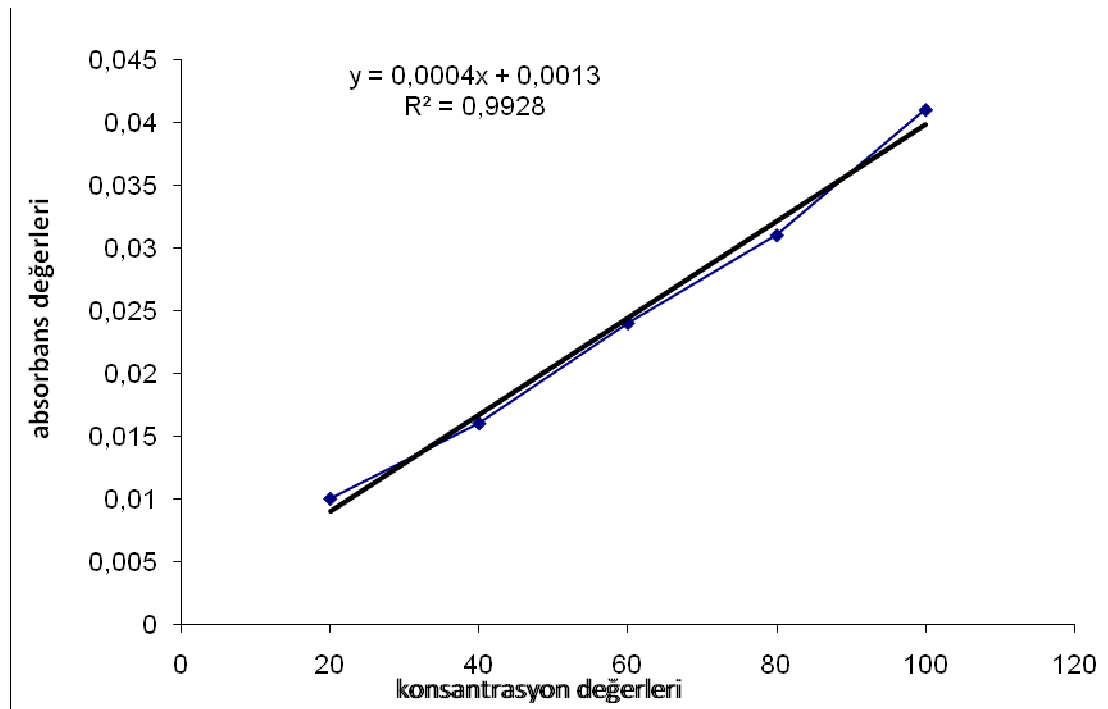
Şekil 3.9 Gallik asit kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.9 *Calamintha nepeta* subsp.*glandulosa* bitki ekstrelerinin total fenol miktarları

<i>Calamintha nepeta</i> subsp. <i>glandulosa</i>	Total fenol miktarları (1gr/L ekstrede gallik asit)
Metanol ekstresi	178.66
Etanol ekstresi	187.33
Petrol eteri ekstresi	-

3.2.3 Total Flavonoid Yöntemi Bulguları

Bu yöntemde referans flavonoid olarak katekol kullanıldı. Katekol, %80 etanolde çözülerek 20, 40, 60, 80, 100 mg/L konsantrasyonlarda dilüsyonları elde edildi. Dilüsyonların UV-Vis spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbansları okunarak Şekil 3.10’ da verilen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin total flavonoid miktarları gram ektrede eşdeğer katekol miktarı olarak çizelge 3.11’de verildi.



Şekil 3.10 Katekol kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.10 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* ekstrelerinin total flavonoid miktarları

Bitki ekstreleri	Gram ektrede bulunan eşdeğer mg katekol miktarı
Metanol	21.7
Etanol	18.7
Petrol eteri	-

3.3 HPLC Bulguları

Çizelge 3.11 Metanol, etanol ve petrol eteri ekstresinde bulunan fenolik maddeler

NO	Numuneler ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Metanol ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Etanol ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Petrol eteri ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)
1	Gallic Acid	70.9	134.8	*
2	Catechin	*	*	*
3	Chlorogenic acid	1271.6	1080.6	*
4	Caffeic acid	599.7	204.9	*
5	Epicatechin	*	*	*
6	Syringic acid	*	378.4	*
7	P-coumaric acid	*	80.7	*
8	Ferulic acid	*	*	*
9	Rutin	*	*	*
10	Hesperidin	*	*	*
11	Apigenin-7-glucoside	1006.4	849.6	*
12	Rosmarinic acid	7689.7	5146.2	*
13	Quercetin	*	*	*
14	Naringenin	*	*	*
15	Luteolin	579.1	1032.9	*
16	Apigenin	*	*	*
17	Acacetin	*	*	*

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamızda *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* bitki türünün metanol, etanol ve petrol eteri ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ve HPLC sonuçları incelendi.

Disk difüzyon metodu sonuçları incelendiğinde metanol ve petrol eteri ekstresi tüm bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluştururken, etanol ekstresi *P. vulgaris* (10.5±1.29 mm), *B. cereus* (8.75±0.95 mm), *P. aeruginosa* (7±0.81 mm), *E. coli* (24.18±0.5 mm) zon oluşturdu. *S. aureus* ve *K. pneumonia* üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadı. Küflerden *A. flavus* üzerinde sadece petrol eteri ekstresi inhibisyon zonu oluşturdu (6.75±0.95 mm). *A. niger* üzerinde ise yalnızca etanol ekstresi inhibisyon zonu oluşturdu (6.75±0.5 mm). *A. ochraceus* ve *F. proliferatum* üzerine ise üç ekstrede inhibisyon zonu oluşturdu.

Etanol ekstresi *E. coli* üzerinde metanol ekstresine oranla iki kat, petrol eteri ekstresine oranla ise üç kat daha fazla inhibisyon zonu oluşturdu (etanol ekstresi: 24.18±0.5 mm, metanol ekstresi: 10.5±0.57 mm, petrol eteri ekstresi: 8±0.81 mm).

Candida albicans mayası ise metanol ekstresinde 6.5±0.57 mm, etanol ekstresinde 7±0.81 mm, petrol eteri ekstresinde ise 17.5±1.29 mm çapında inhibisyon zonu oluşturdu. En etkili sonuç petrol eteri ekstresinde görüldü.

Mikrodilüsyon metodu sonuçları incelendiğinde metanol ekstresinde *E. coli* üzerinde bakterisit etki gösterdi (MBK: 12.5 mg/mL). *A. ochraceus* ve *F. proliferatum* üzerinde fungusit (MFK: 12.5 mg/mL) etki gösterdi.

Etanol ekstresi *P. vulgaris* üzerinde bakterisit etki gösterdi (MBK:12.5 mg/mL). *F. proliferatum* üzerinde fungusit (MFK:1.6 mg/mL) etki gösterdi.

Petrol eteri ekstresi *P. vulgaris* ve *E. coli* üzerinde bakterisit etki gösterdi (MBK: 12.5 mg/mL). *F. proferilatam* üzerinde 1.6 mg/mL ve *A. ochraceus* üzerinde 6.3 mg/mL konsantrasyon değerinde fungusit etki gösterdi. *Candida albicans* metanol, etanol ve petrol ekstralarında en iyi sonucu petrol eteri ekstresinde 12.5 mg/mL konsantrasyon değerinde inhibisyon gösterdi.

Çizelge 3.12’de verilen fenolik madde analiz sonuçları incelendiğinde metanol ekstresinin chlorogenic asit (1271.6 µg/gram), apigenin-7glucoside (1006.4 µg/gram), rosmarinic acid (7689.7 µg/gram), luteolin (579.1 µg/gram), gallik asit (70.9 µg/gram), caffeic acid (599.7 µg/gram), etanol ekstresinin chlorogenic acid (1080.6 µg/gram), caffeic acid (204.9 µg/gram), syringic (378.4 µg/gram), p-coumaric acid (80.7 µg/gram), gallic acid (134.8 µg/gram), apigenin-7glucoside (849.6 µg/gram), rosmarinic acid (5146.2 µg/gram), luteolin (1032.9 µg/gram), petrol eteri ekstresinde ise çalışılan standartlardan hiçbiri bulunamadı.

Antioksidan çalışmaları DPPH, total fenol miktar tayini ve total flavonoid miktar tayini metodları kullanılarak çalışıldı. DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH.)’in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır [44].

DPPH metoduyla yaptığımız çalışma sonucunda metanol ekstresinin en düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu belirlendi. Metanol ekstresinin kontrol grubu olan askorbik asitten (8,9±0,1 µg/mL) daha düşük değerde (4.78±0.2 µg/mL) IC₅₀ değeri göstermiş olduğu bulundu. Etanol ekstresi de askorbik aside yakın değerde IC₅₀ değeri gösterdi (10,19±0,1 µg/mL). Bunun sonucunda çalışmamızda metanol ve etanol ekstresinin serbest radikal süpürücü etkisinin yüksek olduğu görüldü. Petrol eteri ekstresinde ise 63,5±1,25 µg/mL konsantrasyonda IC₅₀ değeri görüldü. Böylece petrol eteri ekstresinin serbest radikal süpürücü etkisinin daha düşük olduğu saptandı. Ekstrele ait IC₅₀ değerleri çizelge 3.7’de verildi.

Metanol, etanol, petrol eteri ekstreleri ve askorbik asit % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında 200 µg/mL konsantrasyonda en iyi değer metanol ekstresinde görüldü. Etanol ekstresi de askorbik aside yakın değerler verdi. Ancak petrol eteri ekstresi askorbik asitten tüm konsantrasyonlarda daha düşük %inhibisyon gösterdi. Buna bağlı olarak petrol eteri ekstresinde anti-radikalik aktivite saptanamadı.

Calamintha incana ile yapılan bir çalışmada DPPH methodu kullanılmış metanol ekstresinin IC₅₀ değeri 23.1 ± 1.1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç bizim sonucumuzla kıyaslandığında *C. nepeta* subsp. *glandulosa* bitkisinde daha düşük IC₅₀ değeri bulundu. Özütlerin serbest radikal giderim aktivitesinin, zt içerisindeki antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini verebilmelerine ve bu bileşenlerin yapısal konformasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir [45-46]. 517’nm de dalga boyu maksimuma sahip olan DPPH. serbest radikali, kararlı diamagnetik bir molekül olabilmek için antioksidan moleküllerden bir elektron yada hidrojen radikalini kolaylıkla alabilmektedir [47].

Fenoller hidroksil grupları bulundurduklarından, serbest radikalleri yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bitki bileşenleridir [48]. Aynı zamanda fenolik bileşikler doğrudan doğruya antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilirler [49]. Polifenolik bileşikler, potansiyel bir antioksidan olduğu için antioksidan aktivite belirlemede, toplam fenolik madde miktarlarının bilinmesi önemlidir.

Total fenol yöntemi sonuçlarında gallik asit referans madde olarak kullanılıp sonuçlar gr/L ekstrede mg gallik asit eşdeğer miktarı olarak verildi. Ekstreler kıyaslandığında etanol ekstresi fenol bakımından diğer ekstrelerden daha zengindir (187.33 mgGA/gr). Metanol ekstresinde 178.66 mgGA/gr miktarında fenol içerdiği belirlendi. Petrol eteri ekstresinde tespit edilemeyecek kadar az miktarda fenolik madde bulunmaktadır.

Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile selat olusturarak, diğer antioksidanlar ile etkilesime girerek, ve süperoksit anyonları, lipid peroksil

radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler [50-51].

Yaptığımız total flavonoid yöntemi sonuçları DPPH yöntemi sonuçlarını doğrulamaktadır. Metanol ekstresinin en yüksek değerinde flavonoid içerdiği belirlendi ve gram ekstrede bulunan eşdeğer katekol miktarı 21.7 mg olarak belirlendi. Etanol ekstresinde 18.7 mgCAT/gr , petrol eterinde ise 9.7 mgCAT/gr olarak belirlendi. Sonuç olarak petrol eteri ekstresi flavonoid açısından diğer ekstrele göre daha fakirdir.

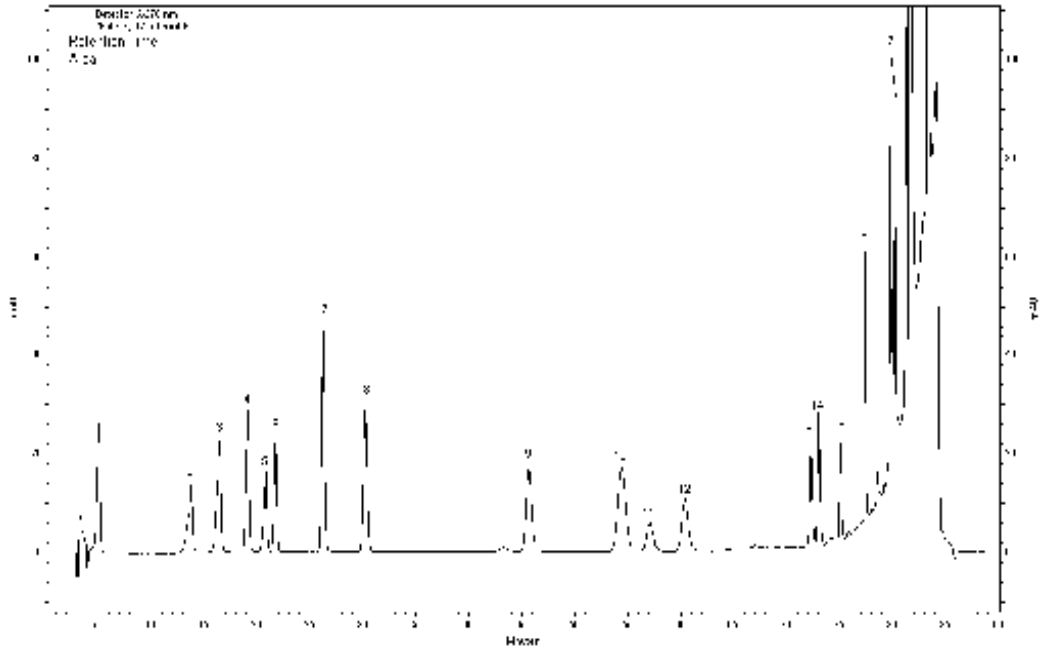
Kalamouni ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada *Calamintha grandiflora* türünün uçucu yağlarını disk difüzyon metodu ile denemişler en iyi zon çapını *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* üzerinde tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile kıyaslandığında kullandığımız test mikroorganizmalarından *B. cereus* üzerinde yaklaşık aynı değerlerde zon çapı verdiği görüldü [52].

Dülger ve ark. (1999), çeşitli bitki yağlarının ve ekstrelerinin antimikrobiyal etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir. Bitkinin sahip olduğu kimyasal kompozisyonundan, kullanılan mikroorganizma türünden, bitki ekstraksiyonu yapılıyorsa ekstraksiyonda kullanılan maddeden ve yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanabileceği belirtmişlerdir [53] Mikroorganizmaların çeşitli kemoterapotik maddelere karşı duyarlılıklarının suştan suşa bile farklılık gösterdiği uzun zamandan beri bilinmektedir [54].

Aşkun ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada Lamiaceae familyasına dahil olan *Origanum munitiflorum* (sütçüler kekiği) ve *Tymbra spicata* L. var. *spicata* (Karakekik) bitki türleri ile yapılan antimikobakteriyal aktivite çalışmalarında elde edilen yüksek aktivite sonuçlarını bitkilerin içerisinde bulunan rosmarinik asitin zengin olmasına bağlamışlardır [55]. Bitkimizde görülen yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktivitede içeriğinde bulunan rosmarinik asitle ilişkilendirilebilir.

Çalışmamız sonucunda farklı çözümlerle yapılan ekstrelerde farklı sonuçlara rastladık. Bitkimiz üzerinde metanol, etanol ve petrol eteri ekstreleri ile ilgili biyolojik aktivite ve antioksidan aktivite çalışmalarına rastlanmadığından çalışmamızın literatüre katkıda bulunacaktır. HPLC sonuçları ile içeriğindeki fenolik maddeler tespit edildi. Bitkinin metanol ve etanol ekstrelerinde antioksidan aktivite yüksek değerler vermiştir. Bu yüzden bitkimizin antioksidan aktivite açısından zengin olduğu belirlendi. Petrol eteri ekstresinde de antimikrobiyal etki diğer ekstrelere göre daha yüksek bulundu.

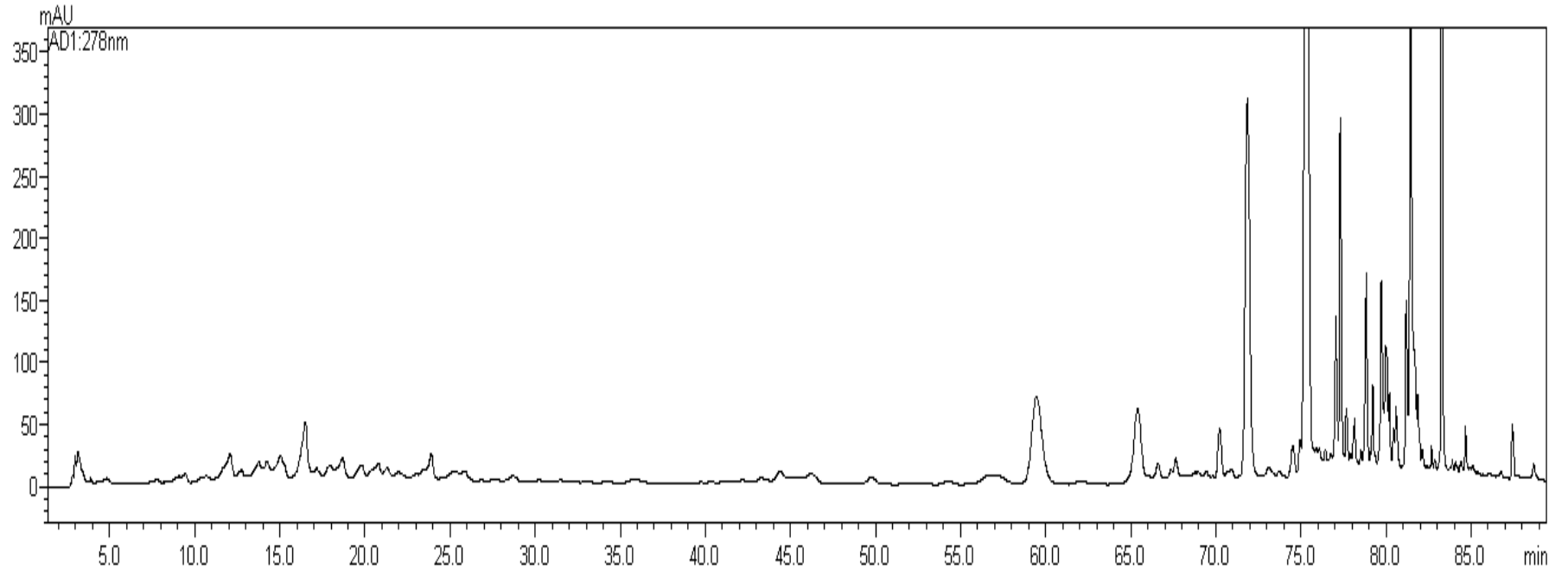
5.EKLER



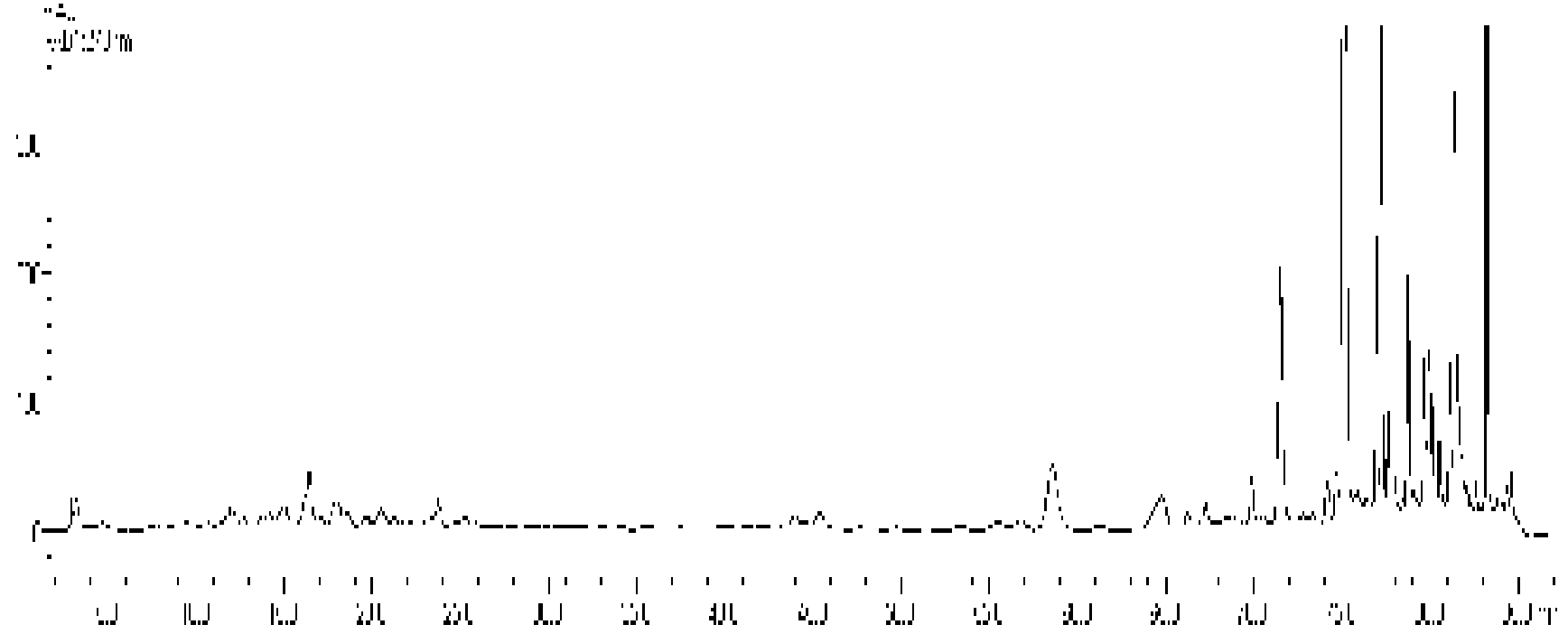
Şekil A.1 HPLC Standart kromatogramı

Standart kromatogram

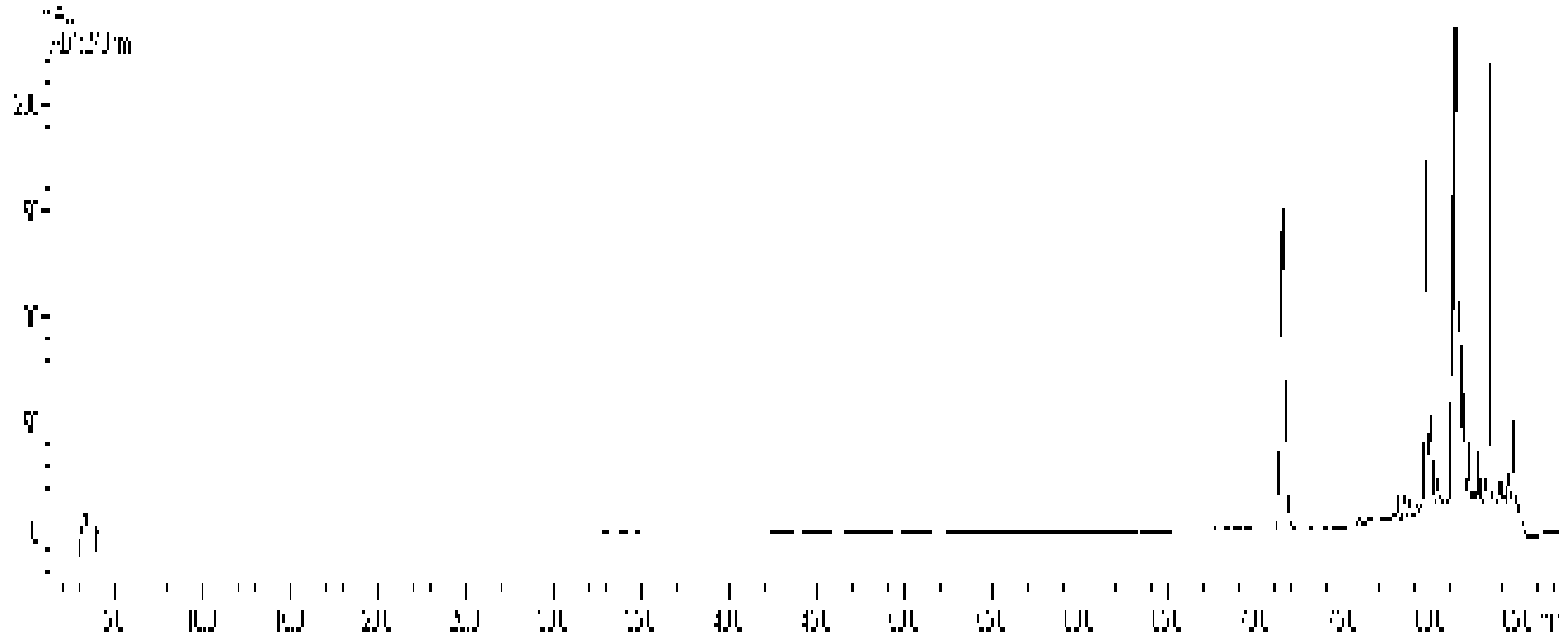
Standartlar: 1; Gallic acid, 2; catechin, 3; chlorogenic acid, 4; caffeic acid, 5; epicatechin, 6; syringic acid, 7; p-coumaric acid, 8; ferulic acid, 9; rutin, 10; hesperidin, 11; apigenin-7-glucoside, 12; rosmarinic acid, 13; quercetin, 14; naringenin, 15; luteolin, 16; apigenin, 17; acecetin



Şekil A.2 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* metanol ekstresi HPLC Kromatogramı



Şekil A.3 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* etanol ekstresi HPLC Kromatogramı



Şekil A.4 *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* petrol eteri ekstresi HPLC Kromatogramı

5. KAYNAKLAR

[1] Başer, K. H. C., ‘‘Essential Oils of Anatolian Labiateae: A. Profile’’, *Acta Horticulturae* (1993) 333: 217-237.

[2] Kocabaş, Y. Z. and Karaman, S., ‘‘Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey), Pakistan’’, *J. Biol. Sci.*, (2001) 4, 1221-1223.

[3] Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., *Flora Of Turkey and The East Aegen Island*, Edinburg, (1988) 10: 29-58.

[4] Dirmenci, T., ‘‘Türkiye’ de Yetişen Nepeta L. (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar’’, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, (2003).

[5] Werker, E., Ravid, U., Putievsky, E., ‘‘Structure of Glandular Hairs and Identification of the Main Components of Their Secreted Material in Some Species of the Labiateae’’, *Isr. J. Bot.*, (1985) 34(1):31-45.

[6] Karadoğan, T., ‘‘Göller Yöresinde Lamiaceae familyasına dahil bitki türlerinin tespiti ve aromatik değerlerinin belirlenmesi’’, Tübitak Proje NO: Togtag- 2599 , Isparta, (2003), 1-25.

[7] Alan, S., Ocak, A., ‘‘Taxonomical and morphological studies on the genus *Calamintha* Miller (Lamiaceae) in Turkey’’, *Biological Diversity and Conservation*, (2009) 125-143.

[8] Sarer, E., Pancali, S.S., ‘‘Composition of the essential oil from *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball.’’, *Flavour and Fragrance Journal*, (1998). 13, 31-32.

- [9] Kitic, D., Zlatkovic, B., ;Palic, R., Jovanovic, T., Rist, M., “Fatty acid of some plants of the genus *Calamintha*”, *Chemistry of natural compounds*, (2009) 45(2), 231-233.
- [10] Garbari,F., Jarvis, C. E.&Pagni, A.M : “Typification of *Melissa calamintha* L., *M. nepeta* L., and *Thymus glandulosus* Req. (Lamiaceae), with Some Systematic Observations – Taxon” (1991) 40: 499-504.
- [11] Davis, P., H.,(ed), “Flora Of Turkey And East Aegean Islands”, Vol. 7, Edinb. Un. Press., Edinburgh, (2000).
- [12] Panizzi L., Flamini G., Cioni PL, Morelli I., “Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae.”, *J. Ethnopharmacol*, (1993) 39(3):167-170.
- [13] Souleles, C., Argyriadou, N., Philianos, S., “Constituents of the essential oil of *Calamintha nepeta*”, *Journal of Natural Products*, (1987) 50(3): 510-511.
- [14] Kitic, D., Palic, R., Stojanovic, G., Ristic, M., ve Jovanovic, T., “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) P. W. Ball from Montenegro” *J. Essent. Oil Res.*, (2002) 14, 150.
- [15] Flamini, G., Cioni, PL., Puleio, R., Morelli, I., Panizzi, L., “Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi”, *Phytotherapy research*, (1999) 13(4):349-351.
- [16] Adams, M., Berset, C., Kessler, M., Hamburger, M., “Medicinal Herbs for the Treatment of Rheumatic Disorders a Survey of European Herbals from the 16th, 17th Century”, *Journal of Ethnopharmacology*,(2008) 121(3):343-59.
- [17] Peter, D., Marin et all, “Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*”, *Phytochemistry*, (2001) 58(6), 943–947.

- [18] Alan, S., Kürkçüoğlu, M., Başer, C., “Composition of Essential Oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi Subsp. *nepeta* and *Calamintha nepeta* (L.) Savi Subsp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball”, *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 22 , (2010).
- [19] Kokkalou, E., Stefanou, E., “The volatile oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.). Ball endemic to Greece”, *Flav. Fragr. J.*, (1990) 5, 23–26.
- [20] Baldovini, N., Ristorcelli D., Tomi, F., Casanova J., “Infraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France)” *Flav. Fragr. J.* (2000) 15, 50–54.
- [21] Bown D., *The Herb Society of America Encyclopedia Of Herbs & Their Uses*, Dorling Kindersley, New York, (1995) 97, 252.
- [22] Baytop, T., *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Yay. No. 3255, Ecz. Fak. Yay. No. 40, İstanbul, (1999) 304, 371.
- [23] Baytop, T., *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*, Türk Dil Kurumu Yay., No: 578, Ankara, (1994).
- [24] Sklection du Reader's Digest, “Secrets et vertus des plantes medicinales," Paris, Bmelles, Montfi, Zurich (1977) p. 91.
- [25] H.L. De Pooter et al., *Pbytorbnistry*, 25, 69 1 (1986).
- [26] Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., Bonsignore, L., “A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited”, *Journal of Ethnopharmacology*, (2008) 4(1):24.
- [27] Guarreraa, P.M., Forti, G., Marignoli, S., “Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy)”, *Journal of Ethnopharmacology*, (2005) 96: 429–444.

[28] Guarrera, M.P., ‘‘Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy’’, *Fitoterapia*, (2003) 74: 515-544.

[29] Mimica-Dukic, N., Couladis, M., Tzakou, O., Jancic R., Slavkovska, V., ‘‘Essential Oils of *Calamintha sylvestica* Bromf. and *Calamintha vardarensis* Silic.’’ *J. Essent. Oil Res.*, (2004) 16, 219–222.

[30] Kaynak, G. Daşkın R. Yılmaz, Ö., Bursa Bitkileri, Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa, (2007).

[31] Souleles, C., Argyriadou, N., Philianos.S., ‘‘Constituents of the essential oil *Calamintha nepeta*’’, *J. Nat. Prod.*, (1987) 50 (3), pp 510–511.

[32] TÜBİVES, <http://www.eski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=18000&id=Calamintha%20nepeta>

[33] Rahman, A., Kang, S. C., ‘‘In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb’’, *Food Chemistry*, (2009) 116, 670–675.

[34] Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., ‘‘Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma’’, *Türk nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon dergisi*, (1997) 3-4: 9295

[35] Akdeniz, F., Gökçe, G., Güneş, F., Akgöl, S., Yucayurt, G., *Rhododendron ponticum* ve *Laurocerasus officinalis* Bitkilerinin Çeşitli Kısımlarından Elde Edilen Süperkritik ve Akışkan Ekstratlarının Fenolik Bileşikler Açısından Analiz ve Antioksidan Aktivitelerinin Tayini (Tübitak Proje No: 106T296).

[36] Singh, R.P., Sharad, S., Kapur, S., ‘‘Free radicals and Oxidative stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of dietary Antioksidants’’, *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, (2004) 5(3), 218-25.

- [37] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, IV. Ed., Approved Standard M7-A4, Wayne, P.A. (1997).
- [38] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard M27-A, Wayne, P.A. (1997).
- [39] Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B.S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, (2006) 68, 175–180.
- [40] Tunalier, Z., Öztürk, N., Koşar M., Başer, K.H.C., Duman, H.,ve Kırimer, N., “Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs, Eskişehir, (2002).
- [41] Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., “Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, (2002) 10(3), 178-182.
- [42] Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.H., “Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*” *Helvetica Chimica Acta*, (1997) 80, 1144-1152.
- [43] Shimada, K. K., Fujikawa, K. Y., Nakamura, T., “Antioxidative properties of xanthan on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin”, *J. Agric. Food Chem*, (1992) 40, 945-948.
- [44] Fukumoto, L. R., Mazza, G., “ Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, *J. Agric. Food Chem*, (2000) 48, 3597-3604.

- [45] Soares, J. R., Dins, T. C. P., Cunha, A. P. & Almeida, L. M., “Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*”, *Free Radical Research*, (1997) 26, 469–478.
- [46] Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E., “Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, (1989) 37, 2016–2021.
- [47] Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C., “Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat)”, *Lebnesmittel-Wissenschaft und Technologie*, (1999) 32, 269–277.
- [48] Disilvestro, R.A., *Flavonoids as Antioxidants*. In: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Edit.: R.E.C. Wildman, CRC Press, ISBN: 0 8493 8734 5, USA, (2001), p:127-138.
- [49] Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., *Introducing Natural Antioxidants*. In *Antioxidants in food*. Edit.: J Pokorny, N Yanishlieva and M Gordon, CRC Press, ISBN 1 85573 463, USA, (2001).
- [50] El Kalamouni, C., Raynaud, C., Talou, T., “Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenées aromatic plants”, *Cheminé Technologija*, (2009). Nr. 3 (52).
- [51] Dülger, B., Ceylan, M., Alıtsaous, M., Uğurlu, E., “*Artemisia absinthium* L. (Pelin)’un Antimikrobial Aktivitesi”, *Tr. J. Biology*, (1999) 23: 377-384.
- [52] Gürgen, A.R., “Türkiye’nin Önemli Eterik Yağları Üzerine Araştırmalar”, *Yüksek Ziraat Enstitüsü dergisi*, Ankara, (1946) 6(2): 301-303.

[53] Askun, T, Tumen, G., Satil, F., Ates M., “In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria”, *Food Chemistry*, (2009) 116, 289–294.