

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



***INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KROVIN
TÜRÜNÜN FARKLI EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMA NUR MODANLIOĞLU

BALIKESİR, TEMMUZ - 2012

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



***INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KROVIN
TÜRÜNÜN FARKLI EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYMA NUR MODANLIOĞLU

BALIKESİR, TEMMUZ - 2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şeyma Nur MODANLIOĞLU tarafından hazırlanan “*INULA PEACOCKIANA*(AITCH. & HEMSL.) KROVIN TÜRÜNÜN FARKLI EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13.06.2012 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Tülin Aşkun

Üye
Prof. Dr. Gülendam Tümen

Üye
Yrd. Doç. Dr. Funda Yükrük



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması BAP tarafından 2011/18 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

***INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.) KROVIN TÜRÜNÜN FARKLI
EKSTRELERİNDE ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN
AKTİVİTELERİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ŞEYMA NUR MODANLIOĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. TÜLİN AŞKUN)**

BALIKESİR, TEMMUZ - 2012

Compositae (Asteraceae) familyası, çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biridir. Dünyanın hemen her yerinde yayılış gösterir. Çalışmamızda Van'ın Gevaş ilçesinden toplanan Compositae familyasına ait olan *Inula peacockiana* bitkisine ait petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri, HPLC analizi ile de fenolik madde içeriği belirlendi.

Çalışmamızda antimikrobiyal aktivite tayini için mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı ve minimum bakterisit/fungisit konsantrasyonu belirlendi. En iyi sonuçları aldığımız petrol eteri ekstresi *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* üzerinde 0.1 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit, 3.1 mg/mL konsantrasyon değerinde ise *Fusarium proliferatum* üzerinde fungusit etki gösterdi.

Antibakteriyel aktivite için Gram (+) bakterilerden *Staphylococcus aureus* (ATTC6538P), *Bacillus cereus* (CCM 99) ve Gram (-) bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) kullanıldı. Bitki ekstraları antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis*'in H37Ra (ATCC 25177), H37Rv (ATCC 27294) suşlarına karşı denendi. Antifungal aktivitede, filamentli funguslar olan *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) kullanıldı.

Antioksidan aktivite DPPH metodu kullanılarak yapıldı. Total fenol miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla incelenmiş olup, metanol ekstresinin en yüksek total fenol miktarına sahip olduğu belirlendi (172 mgGA/gr). HPLC analizi sonucunda metanol, aseton ve petrol eteri ekstralarında bulunan fenolik bileşikler tespit edildi ve elde ettiğimiz sonuçlarla tartışıldı.

ANAHTAR KELİMELER: *Inula peacockiana*, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, compositae

ABSTRACT

DETERMINING ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF DIFFERENT SOLVENT EXTRACTS OF *INULA PEACOCKIANA* (AITCH. & HEMSL.)

MSC THESIS

ŞEYMA NUR MODANLIOĞLU

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BİOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. TÜLİN AŞKUN)

BALIKESİR, JULY 2012

Compositae (Asteraceae) is one of the largest family of flowering plants. It grows approximately every country in the World. In our study, the antimicrobial and antioxidant activities of the petroleum ether, acetone and methanol extracts of *Inula peacockiana* which collected in Gevaş county of Van Province – have been determined.

In our study, the antimicrobial activities were examined using microdilution methods, and a minimum bactericide/fungicide concentration was determined. Our best result of its antimicrobial activity, the petroleum ether extract of the plant had a bactericide effect on *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* (0.1 mg/mL), had a fungicide effect on *Fusarium proliferatum* with a concentration of 3.1 mg/mL.

Staphylococcus aureus (ATTC 6538P), *Klebsiella pneumonia* (CCM 2318), *Escherichia coli* (ATCC 11230), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 6897) and *Bacillus cereus* (CCM 99) for antibacterial activity; *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) and (H37Rv) for antimycobacterial activity and for antifungal activity *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) species were used.

The antioxidant activity was carried out using the DPPH method. The amount of total phenol was examined using the Folin- Ciocaltaeu method and it was found that the methanol extract had the highest amount of total phenol (172 mgGA/gr). By means of HPLC analysis, phenolic compounds were determined in the extracts of the plant and the results were discussed.

KEYWORDS: *Inula peacockiana*, antimicrobial activity, antioxidant activity, compositae

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Bitkilerin Tıbbi Açısından Önemi.....	1
1.2 Compositae Familyası	3
1.2.1 Genel Özellikleri.....	3
1.2.2 Kullanım Alanları	5
1.3 <i>Inula</i> L (Andızotu) Cinsi	5
1.3.1 Genel Özellikleri.....	5
1.3.2 Türkiye’ de Yetişen <i>Inula</i> L. Türleri	5
1.3.3 <i>Inula</i> Türlerinin Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları.....	7
1.4 <i>Inula peacockiana</i> (Aitch. & Hemsl.) Krovın.....	9
1.4.1 Morfolojik Özellikleri.....	9
1.4.2 <i>I. peacockiana</i> ’ nın Sistematikteki Yeri	9
1.4.3 Türün Türkiye’ deki Yayılışı	9
1.4.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları	10
2. MATERYAL ve METOT	11
2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanışı.....	11
2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı.....	12
2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar	13
2.4 Kullanılan Besiyerleri.....	20
2.4.1 Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitede Kullanılan Besiyerleri.....	20
2.4.2 Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyerleri	22
2.4.2.1 Middlebrook 7H9 Broth Base (pH 6.6 ± 0.2).....	22
2.4.2.2 Middlebrook 7H10 Agar Base (pH 6.6 ± 0.2)	23
2.5 Kullanılan Antibiyotikler	25
2.6 Serum Fizyolojik Hazırlanışı.....	25
2.7 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı.....	26
2.8 Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltisinin Hazırlanması	26
2.9 Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite.....	26
2.9.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)	26
2.9.2 Minimum Bakterisit ve Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MBK ve MFK)	27
2.10 Antitüberküloz (Antimikobakteriyel) Aktivite.....	28
2.11 Antioksidan aktivite	29
2.11.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) Metodu.....	29
2.11.2 Total Fenol Miktar Tayini.....	29
2.11.2.1 Folin – Ciocaltaeu Yöntemi	29
2.11.3 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	30

2.11.3.1 Alüminyum Klorür (AlCl ₃) Kolorimetrik Metodu.....	30
2.12 HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography)	31
2.12.1 Kullanılan Shimadzu Marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler.....	31
2.13 Likid Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (LC-MS) Analizi.....	32
2.13.1 Kullanılan Agilent Marka LC-MS Sisteminin Özellikleri.....	33
2.13.2 Gradient Programı.....	34
2.14 Kullanılan Cihazlar.....	34
3. BULGULAR	35
3.1 Antibakteriyel, Antitüberküloz ve Antifungal Bulguları.....	35
3.2 Antioksidan Aktivite Bulguları	37
3.2.1 DPPH Yöntemi Bulguları	37
3.2.2 Total Fenol Yöntemi Bulguları.....	37
3.2.1 Total Flavonoid Yöntemi Bulguları.....	37
3.3 HPLC Analizi Bulguları	40
3.4 LC-MS Bulguları.....	40
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
5. KAYNAKLAR.....	45
6. EKLER.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Inula peacockiana</i> ' nın illere göre yayılışı.....	10
Şekil 2.1: <i>Inula peacockiana</i>	11
Şekil 2.2: Bitkinin çeşitli çözücülerde bekletilmesi	12
Şekil 2.3: Döner buharlaştırıcı	13
Şekil 2.4: <i>A. niger</i> ' in SDA besiyerinde 3 nokta ekimi	17
Şekil 2.5: <i>A. flavus</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi	18
Şekil 2.6: <i>A. ochraceus</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi	19
Şekil 2.7: <i>Fusarium proliferatum</i> ' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi	19
Şekil 2.8: HPLC gradient programı	32
Şekil 2.9: LC-MS gradient programı	34
Şekil 3.1: <i>Inula peacockiana</i> ekstralarının MİK sonuçlarına ait fotoğraflar	36
Şekil 3.2: Gallic asit kalibrasyon tablosu	38
Şekil 3.3: Katakol kalibrasyon grafiği	39
Şekil A.1: HPLC standart kromotogramı	58
Şekil A.2: <i>Inula peacockiana</i> petrol eteri ekstresi HPLC Kromotogramı	59
Şekil A.3: <i>Inula peacockiana</i> metanol ekstresi HPLC Kromotogramı	59
Şekil A.4: <i>Inula peacockiana</i> metanol ekstresi HPLC Kromotogramı	60
Şekil B.1: LC-MS standart kromotogramı	60
Şekil B.2: <i>Inula peacockiana</i> aseton ekstresi LC-MS kromotogramı	61
Şekil B.3: <i>Inula peacockiana</i> petrol eteri ekstresi LC-MS kromotogramı	61
Şekil B.4: <i>Inula peacockiana</i> metanol LC-MS kromotogramı	62

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Bitki veri tablosu.....	11
Tablo 3.1: <i>Inula peacockiana</i> petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının MİK ve MBK /MFK değerleri	35
Tablo 3.2: Standart antibiyotiklere karşı bakteri ve fungusların MİK ve MBK/MFK değerleri.....	37
Tablo 3.3: <i>Inula peacockiana</i> ekstralarının ve askorbik asitin % inhibisyon değerleri.....	38
Tablo 3.4: <i>Inula peacockiana</i> bitki ekstralarının total fenol miktarı.....	38
Tablo 3.5: <i>Inula peacockiana</i> ekstralarının total flavonoid miktarları.....	39
Tablo 3.6: HPLC analizi sonucunda ekstralarda bulunan fenolik maddeler....	40
Tablo 3.7: LC-MS analizi sonucunda ekstralarda bulunan fenolik maddeler..	40

KISALTMA LİSTESİ

WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
DMSO	:Dimetilsülfoksit
MİK	:Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	:Minimum Bakterisit Konsantrasyonu
MFK	:Minimum Fungisit Konsantrasyonu
DPPH	:2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HPLC	:Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
UV-Vis	:Ultraviyole Görünür Bölge
LC-MS	:Likit kromatografisi- Kütle Spektrometresi

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında yardım ve önerilerini esirgemeyen desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam sayın Doç. Dr. Tülin AŞKUN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Gülendım TÜMEN'e ve Doç. Dr. Fatih SATIL' a, bitkimin temini sağlayan sayın Mehmet Yavuz PAKSOY' a ve Öğr. Gör. Selami SELVİ' ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

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

Sevincimi ve hüznümü paylaşıp içtenlikle her konuda yardımlarını eksik etmeyen çalışma arkadaşlarıma, tanıdığım için çok mutlu olduğum, desteklerini hep hissettiğim canım arkadaşlarım Didem KARAKUŞ, Zarif Ece CEYLAN, Fulya YÖRÜK ve Hatice AYDENİZ' e, sekiz senedir yanımda olup hayatı daha eğlenceli kılan sevgili dostum Çiğdem YOLDAŞ' a hayatımda oldukları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan desteğini her zaman hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Bitkilerin Tıbbi Açısından Önemi

Bitkiler yıllardır tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de halk arasında çay, baharat ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ülkemizin bitkisel çeşitlilik yönünden oldukça zengin bir flora sahiptir. Bu zenginliğin nedeni, üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması, pek çok cins ve seksiyonun, orijin ve farklılaşım merkezlerinin Anadolu oluşu ile tür endemizminin yüksek oluşudur [1]. Ülkemizde 9000'e yakın doğal bitki türü bulunmaktadır ve bunların % 30'u endemiktir. Buna rağmen bu bitki zenginliğinden yeterince faydalanılamamaktadır [2]. Bitkilerin antimikrobiyal aktivitesi ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana araştırılmaktadır [3, 4]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır [5].

Bilinen tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte olan bakterilerde, ilaç dirençliliği artmakta ve yayılmaktadır [6]. Antibiyotik direnci, son yıllarda küresel bir sorun haline gelmiştir. Bu sorun, bulaşıcı hastalıkların neden olduğu ölümlerin fazla olduğu gelişmekte olan ülkelerde büyük önem taşır [7]. Bu nedenle ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmektedir ve bazı geleneksel kullanıma sahip bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır [6].

Günümüzde, tıbbi bitkiler, daha yavaş iyileşme sağlamasına rağmen yan etkilerinin az olması ve sentetik ilaçlara göre daha az olan mikrobiyal direnç nedeniyle popülerlik kazanmaktadır [8].

Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı araştırılarak bulunmuştur [9]. Diğer taraftan toprağa, suya, havaya ve canlılara olumsuz etkisi olmayan doğal bitki ekstraktlarından elde edilen maddeleri kullanarak patojen funguslara karşı etkili olan bitki türleri ve bu türlerin içerdikleri etken maddelerin belirlenmesi, dünyada tüm

Ülkelerin yoğun bir Şekilde üzerinde çalıŐtıęı biyolojik mücadele yöntemlerinden birisidir [10]. Abascal ve Yarnell [6] ilaçlara alternatif olarak geleneksel antimikrobiyal özellik gösteren bitkilerin kullanılabileceğini belirtmiŐlerdir. Bununla beraber ilaç dirençliliğini azaltabilmek için de antibiyotiklerle bitkilerin kombine kullanılmasına dikkat çekmiŐlerdir.

Antimikrobiyal aktivite bitkinin sahip olduğu alkaloidler, flavonoidler, taninler, terpenoidler gibi sekonder metabolitler sayesinde ortaya çıkmaktadır. Bitkinin temel hayati iŐlevleri ile doğrudan iliŐkisi olmayan sekonder metabolitler yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilir. Sekonder metabolitlerin iŐlevleri tam olarak açıklanamamakla birlikte herbivorlardan, patojenlerden, UV iŐıęı gibi abiyotik çevresel streslerden korunmak için üretildiği düŐünülmektedir [11].

Sekonder metabolitler çok sayıda bileŐięi içeren zengin bir grup olup, bu grup içerisinde yer alan fenolik bileşikler, üstlenmiŐ oldukları roller nedeniyle son derece önemlidir. Fenolik bileŐiklerin, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiler göstererek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde buldukları tespit edilmiştir. Ayrıca fenolik bileŐiklerin, serbest radikaller olarak adlandırılan ve nükleik asitlere, somatik hücrelere ve baęıŐıklık sistemine saldırarak çeşitli zararlara neden olan bileşikleri kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösterdikleri bilinmektedir [12-14].

Sekonder bileŐiklerin önemli bir ögesi olan fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar. Bitkilerde bulunan fenolik asitler, benzoik ve sinnamik asitlerin hidrokillenmiŐ türevleridir [15,16]. Flavonoidler ise, flavinler, flavinoller, flavaninler, flavanoller, izoflavinler ve antosiyaninler olarak altı kategoriye ayrılır [17]. Flavonoidler ve fenolik asitlerin bitkilerde birçok fonksiyonu vardır. Bunlar hücre duvarının destek malzemesidir. Ayrıca tohum dağılımı ve tozlaŐmada kuŐlar ve böcekler için renkli olmaları nedeniyle cezbedicidirler [18]. Bunların dıŐında fenolik bileşikler yaralama, enfeksiyonlar, aŐırı iŐık veya UV iŐınları gibi farklı çevresel stres koŐullarında bitki savunma mekanizmalarında rol oynar [19, 20]. Flavonoidlerin antialerjik, anti-inflamatuar, antiviral ve antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [18, 21]. Ayrıca flavonoidlerin ve fenolik asitlerin, antioksidan [22-25] ve antikanserojen etkileri vardır [26-29].

Sekonder metabolitlerin diğer önemli bileşeni uçucu yağlardır. Uçucu yağ terimi ilk kez 16. yüzyılda Paracelsus von Hohenheim'ın ilaçların etken bileşimini "Quinta essentia" olarak isimlendirmesiyle ortaya çıkmıştır [30]. Uçucu yağlar ya taç yaprak, yaprak, meyve, kabuk, meyve sapı, odunsu doku gibi bitkinin belirli organlarında ya da bitkinin tüm organlarında bazen de bir organın belirli dokularında bulunabilirler. Bu yağlar bitkilerin bağlı bulunduğu familyalara göre salgı tüyünde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde bulunmaktadır [31].

Uçucu yağlar, kompleks karışımlar olduklarından, biyolojik etkileri yönünden de farklılık gösterirler. İçerdikleri etken maddelere göre etkileri değişmekle birlikte pek çok uçucu yağ; antimikrobiyal, antispazmodik, karminatif, koloretik, sedatif, diüretik gibi etkilere sahiptir [32]. Bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının bakterilere olduğu kadar, mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [33].

Uçucu yağların Labiatae, Rosaceae, Compositae, Myrtaceae gibi bazı familyalara ait türlerde bulunduğu, buna karşılık Pinaceae, Cupressaceae familyası üyeleri gibi Gymnospermler'de de reçine ile beraber bulunduğu belirtilmektedir [34].

1.2 Compositae Familyası

1.2.1 Genel Özellikleri

Compositae (Asteraceae) familyası, çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biridir. Dünyanın hemen her yerinde yayılış gösterir. Royal Botanic Garden of Kew'e göre, 1600 cins ve 23.000'den fazla türle ifade edilen Compositae familyasının Türkiye'de doğal olarak yetişen 133 cins ve 430'u endemik olmak üzere 1156 türü bulunmaktadır. Yurdumuzda ise en zengin tür sayısı ile temsil edilmektedir [35].

Compositae familyasına ait bitkiler, tek yıllık ve çok yıllık otsular veya bazen çalılar olan ve bazıları latisifer (süt boruları) içeren bitkilerdir. Yaprakları genellikle

alternat veya karşılıklı, tam kenarlı ve parçalıdır ve nadiren hepsi tabandadır. Çiçekler kapitulum durumunda olup, kapitulum çevresi birçok serili involukrum brakteleri ile örtülmüştür [36, 37]. Çiçeklerin ya erdişi ya da tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorf simetrik olduğu görülür. Ovaryum alt durumlu (inferior), iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllü, meyve tipi akendir, tepesinde bazen bir papus, bazen kaliks artığı bulunur. Familya bitkilerin çoğu Compositae tipi salgı tüyü ve örtü tüyleri taşır [37].

Bu familya çiçek özelliğine göre Tubiliflorae alt familyası ve Liguliflorae alt familyası olmak üzere 2 alt familyaya ayrılır [38].

a-Tubiliflorae alt familyası: Bu familyadaki bitkilerin kapitulumunda dilsi ve tüpsü çiçekler vardır. Çoğunlukla süt borusu bulunmaz. Eczacılıkta kullanılan ve drog veren bitkilerin çoğu bu alt familyadadır.

b-Liguliflorae alt familyası: Kapitulumu oluşturan çiçeklerin hepsi ligulat (dilsi) 'dir. Lateks (süt) boruları bulunur. Uçucu yağa ender rastlanır.

Tubiliflorae alt familyası 11 tribusa 129 subtribusa ayrılır [39]. Bu tribuslar;

- 1- Heliantheae
- 2- Inuleae
- 3- Asteraeae
- 4- Senecioneae
- 5- Calendulae
- 6- Eupatorieae
- 7- Anthemideae
- 8- Arctoteae
- 9- Cardueae (Cynareae)

10- Mutisieae

11- Lactuceae

Inula, Inulae subtribusunda yer alır [35].

1.2.2 Kullanım Alanları

Compositae familyasının ekonomiye büyük oranda katkısı bulunmaktadır. Büyük bir familya olan Compositae 1000' den fazla cinse ait 25000 – 30000 türü içerir. Pek çok türü kauçuk kaynakları, ilaç, yemeklik yağlar, sebze, pestisitler, süs bitkileri gibi çeşitli şekillerde kullanılmıştır. *Aster*, *Inula*, *Xanthium*, *Eupatorium*, *Carpesium*, *Saussurea* ve *Taraxacum* gibi cinsleri ilaç alanında kullanılır [40].

1.3 *Inula* L (Andızotu) Cinsi

1.3.1 Genel Özellikleri

Genellikle çok, bazen bir ya da iki yıllık otsular veya yarıçalılardır. Yaprakları tam veya dişlidir. Kapitula heterogram, radiat veya discimorfudur. İnvolutkrum brakteleri çok serili veya imbrikattır. Çiçek tablası çıplaktır. Akenleri köşeli veya kaburgalı, papus skabroz, barbellat veya plumozdur. Avrasya ve Afrika'da yayılış gösterir ve yaklaşık 100 türü vardır. Ülkemizde ise 27 türü bulunur [35].

1.3.2 Türkiye' de Yetişen *Inula* L. Türleri

Inula acaulis Schott Et Kotschy Ex Boiss.

Inula anatolica Boiss.

Inula aschersoniana Janka

Inula aucherana DC

Inula britannica Linnaeus

Inula conyzae (Griess.) Meikle

Inula crithmoides Linnaeus

Inula discoidea Boiss

Inula ensifolia Linnaeus

Inula fragilis Boiss. & Hausskn

Inula germanica Linnaeus

Inula graveolens (Linnaeus) Desf

Inula helenium Linnaeus

Inula inuloides (Fenzl) Grierson

Inula macrocephala Boiss. & Kotschy ex Boiss.

Inula mariae Bordz.

Inula montbretiana DC.

Inula oculus-christi Linnaeus

Inula orientalis Lam.

Inula peacockiana (Aitch. & Hemsl.) Krovin

Inula salicina Linnaeus

Inula sarana Boiss.

Inula sechmenii Hartvig & Strid

Inula thapsoides (Bieb. ex Willd.) Sprengel

Inula viscidula Boiss. & Kotschy

Inula viscosa (Linnaeus) Aiton

Inula heterolepis Boiss.

1.3.3 *Inula* Türlerinin Kimyasal İçerikleri ve Kullanım Alanları

Inula cinsi tüm dünyada yaygındır ve bu cinse ait birçok tür yerel halk tarafından kullanılmaktadır. Bu cins antikanser, antibakteriyel, sitotoksik ve anti-inflamatuvar özellikleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri ile bilinir. *Inula* türlerinin kimyasal yönden araştırılması ile bu cinse ait birçok önemli biyoaktif bileşen bulunmuştur. Bununla birlikte birçok *Inula* türü henüz fitokimyasal ve biyolojik yönden araştırılmamıştır.

Son yıllarda *Inula* türleri, biyolojik aktiviteleri nedeniyle dikkat çekmiştir. Bu biyolojik değer fitokimyacıları genus *Inula*'nın kimyasal bileşenlerini araştırmaya yönlendirmiştir ve böylece monoterpenoidler, seskuiterpenoidler, diterpenler, flavonoidler ve glikosidazlar gibi birçok biyoaktif bileşen tespit edilmiştir [41-62]. Bütün *Inula* türleri seskiterpen laktonlarca zengindir [63-65].

Inula spp., *I. helenium* L., *I. racemosa* Hooker fil., *I. viscosa* (L.) Aiton, *I. britannica* L. gibi önemli tıbbi değere sahip türleri kapsar [66]. *I. helenium*, geleneksel Çin tıbbında en popüler bitkidir. Balgam söktürücü, öksürük kesici, terletici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Halk arasında zayıflık, midevi rahatsızlıklar ve siyatik tedavisinde kullanılmıştır. 19. yy. boyunca karaciğer problemlerinde, menstrüasyon düzenleyici olarak, cilt hastalıklarında ve anemi tedavisinde bu bitkiden faydalanılmıştır [67]. Ayrıca tüberküloz tedavisinde kullanıldığına yönelik kanıtlar vardır [68, 69]. Son yıllarda yapılan kapsamlı çalışmalarla *I. helenium*'dan elde edilen seskiterpen laktonların çeşitli biyolojik aktiviteleri olduğu ispatlanmıştır [70]. *I. helenium*'un kökleri yüksek düzeylerde alantolakton ve izoalantolakton gibi *eudesmanolide* tipi seskiterpen laktonları içerir. Bu alantolakton ve izoalantolaktonlar kuvvetli fungal ajanlardır [71]. Konishi ve

arkadaşlarının [72] yaptıkları bir çalışmada *I. helenium*' dan izole edilen 7 bileşenin MK-1, HeLa ve B₁₆F₁₀ hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi bulunduğu; 5-epoxyalantolactone ve alantolactone maddelerinin diğerlerinden daha güçlü aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *I. helenium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*' a karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir [73]. *Inula helenium* 'un % 40' lık etanol ekstresi insan lenfoblastoid hücre kültüründe 50-200 g/mL konsantrasyonlarda hücre büyümesini tamamen inhibe etmiştir. [74].

I. helenium' dan elde edilen uçucu yağda alantolakton, 11,13-dihidroalantolakton, izoalantolakton, 11,13-dihidroizoalantolakton, 4,5-dihidro-5,6-dehidroizoalantolakton gibi eudesmonolit yapıları seskiterpen laktonlardan oluşmuş helenin, alantol ve alantik asit ile triterpen bileşikler vardır [68, 71, 75, 76].

I. britannica' dan çeşitli steroidler, terpenoidler (seskiterpen laktonlar, diterpenler ve triterpenoidler), fenolik ve flavonoidler gibi çeşitli kimyasal maddeler izole edilmiştir. Literatüre göre bu bitkiden yaklaşık 102 bileşik izole edilmiş ve saflaştırılmıştır [77]. Je ve arkadaşlarının [78] yaptıkları bir çalışmada *I. britannica* uygulamasının LPS/PA'nın neden olduğu karaciğer hasarı olan farelerde yaşama oranının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca *I. britannica* uygulanması ile farelerin dalak sitokin miktarlarındaki dalgalanmanın azaldığı öne sürülmüştür.

Inula viscosa üzerine yapılan bir çalışmada bitkinin köklerinden elde edilen uçucu yağda monoterpen yapıdaki 10 bileşiğin % 49.6' sı 1,4-dimetilazulen, % 32.1' i kamazulendir [79]. 1,4-dimetilazulen, kamazulen ve ökaliptol, balzemik, antiseptik, antipiretik özelliklerden sorumludur [80]. Bitkinin kurutulmuş dal uçları ve yapraklarından elde edilen uçucu yağda, karvakrol, p-simenol, α -pinen, β -mirsen, γ -terpinen, mentol, timol, linalol, borneol ve karyofilen bulunduğu tespit edilmiştir. [81-85]. Bitkinin yapraklarından hazırlanan çay halk arasında diyabet tedavisinde kullanılmaktadır [86].

Inula graveolens bitkisinden elde edilen uçucu yağ antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca yeşilimsi kahverengi floresans gösterme özelliğine sahiptir. Halk arasında kalp kuvvetlendirici ve balgam söktürücü olarak kullanılır [87].

1.4 *Inula peacockiana* (Aitch. & Hemsl.) Krovın

Sinonimi *Codonocephalum peacockianum* Aitch. & Hemsl.' dir.

1.4.1 Morfolojik Özellikleri

Boyları 2 metreyi bulabilen çok yıllık bitkilerdir. Bazal yapraklar oblong veya ovat, 30 - 50 x 15 - 25 cm, yaprak kenarları dişli ve damarlanma belirgindir. Kapitula disk şeklinde ve çok sayıdadır. Çiçekler sarı ve 10-12 milimetredir [35].

1.4.2 *I. peacockiana*' nın Sistematikteki Yeri

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Asteridae

Order: Asterales

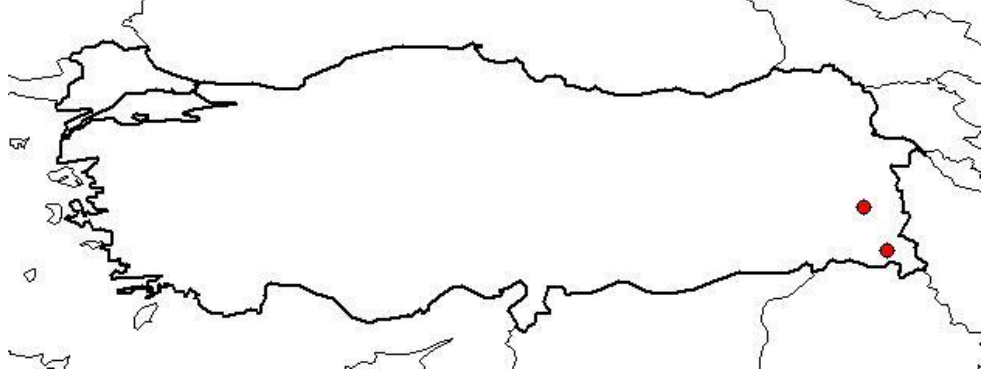
Family: Asteraceae

Genus: *Inula*

Species: *Inula peacockiana* (Aitch. et Hemsl.) Krovın

1.4.3 Türün Türkiye' deki Yayılışı

Inula peacockiana, Türkiye' nin doğusunda Van ve Hakkari vilayetlerinde yayılış gösterir. Bu tür, İran-Turan fito-coğrafik bölgesinin bir elementi olup, doğuda Orta Asya 'ya, Tanrı Dağları 'na kadar yayılır [35].



Şekil 1.1: *Inula peacockiana*' nın illere göre yayılışı

1.4.4 Tür ile İlgili Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bitkiyle ilgili yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bazzaz ve Haririzadeh [88], 2003 yılında İran'da yetişen 306 bitkinin antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. *Inula peacockiana* bitkisinin *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı etkili olduğunu bulmuşlardır. Tosun ve arkadaşlarının [89] 2005 yılında *I. peacockiana*' nın etanol ekstresinin *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bakterisinin antitüberküloz aktivitesini araştırmışlardır. MIC değerini >100 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulup mikroorganizmanın dirençli olduğunu saptamışlardır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Bitki Materyalinin Hazırlanışı

Inula peacockiana 2009 yılında Van' ın Gevaş ilçesinden toplandı. Bitkinin teşhisi Mehmet Yavuz Paksoy tarafından yapıldı. Tablo 2.1' de bitkiye ait veriler yer almaktadır.

Tablo 2.1: Bitki veri tablosu

Bitkinin adı	Toplandığı Yer	Tarih	Herbaryum numarası	Yükseklik
<i>I. peacockiana</i>	Van-Gevaş, Akdamar Adası	08.06.2009	Paksoy770	1680 m



Şekil 2.1: *Inula peacockiana*

2.2 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanışı

Bitki iyice kurutulduktan sonra belli bir miktar tartılarak yaklaşık 20 gün boyunca çözücü içinde bekletildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Bitkinin çeşitli çözücülerde bekletilmesi

Bekleme sürecinin ardından vakumlu döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) cihazı kullanılarak ekstre alım işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.3). Cihazın sıcaklığı, bütün çözücülerin kaynama noktasına bağlı olarak ayarlandı. Elde edilen ekstrede kalan çözücünün uzaklaştırılarak konsantre hale gelmesini sağlamak için kahverengi şişeler içinde çeker ocakta 1 - 2 gün boyunca bekletildi. Konsantre hale gelmiş ekstrede 0.5 gr tartılarak 5 mL DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözülüp son konsantrasyonun 100 mg/mL olması sağlandı. Bu stoktan 2 mL alınıp 0.22 µL' lik membran filtreden geçirilerek steril stok çözelti elde edildi. Elde edilen stok çözelti hemen ya da daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C' de buzdolabında saklandı.



Şekil 2.3: Döner buharlaştırıcı

2.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

Antibakteriyel aktivite için Gram (+) bakterilerden *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. Bitki ekstraktları antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis*' in H37Ra (ATCC 25177) ve H37Rv (ATCC 27294) suşlarına karşı denendi. Antifungal aktivitede, filamentli funguslar olan *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) kullanıldı. Tüm mikroorganizma stokları Balıkesir Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 'nde saklanmaktadır.

Staphylococcus aureus: *Staphylococcus* genusunda bulunan bakteriler Gram boyaması ile Gram pozitif kok görünümündedir. Tekli, ikili, dördü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı (Staphylo: Üzüm salkımı, Coccus: tanesi) benzeri şekiller oluştururlar.

0,8 – 1 µm büyüklükte, hareketsiz, spor oluşturmeyen, çoğunlukla katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz olup, fakültatif anaeropturlar. Daha çok aerop üremeyi tercih ederler. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluştururlar. Çoğu % 7.5 – 10 NaCl içeren basit besiyerlerinde, 18 – 45 °C’ de kolaylıkla ürerler. Basitrasın, furazolidon, lizostafine duyarlı olmakla birlikte lizozime direnç gösterirler [90, 91]. Stafilokoklar birçok besiyerlerinde ürerler. Kanlı agarda β hemoliz yaparlar. *S. aureus*’ a ait koloniler geniş (6 – 8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. Çoğu suşa ait koloniler krem – sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler [92, 93]. *S. aureus*, burun salgıları, boğaz salgıları, insan ve hayvan derisinde bulunmaktadır. Antibiyotik dirençlerini çok çabuk kazanmaktadır.

Klebsiella pneumoniae: Kısa uçları yuvarlak, spor oluşturmeyen, hareketsiz bir bakteridir. 1 – 2 µm boyunda ve 0.5 – 0.8 µm enindedir. Etrafında polisakkarit yapıda geniş bir kapsül bulunur. Gram negatif olup bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar [94, 95].

Klebsiella suşları, buyyon, jeloz, kanlı jeloz, MacConkey, EMB, XLD gibi besiyerlerinde ürerler. Fakültatif anaeropturlar. Optimal üreme ısısı 37 °C ’dir. Optimal üreme ısısından daha düşük sıcaklıklarda kapsül oluşturma şansı daha fazladır. Suşların çoğu geniş kapsül oluşturup, katı besiyerlerinde büyük (3 – 4 mm), mukoid, akıcı koloniler oluşturur (M kolonileri). Dik jeloz veya jelatin besiyerinde yüzeyde yayvan bombeli bir üreme besiyerinin dibine doğru ise dar bir üreme zonu görülür. Buna çivi gibi üreme de denir. Kapsül oluşturmeyen suşlar düzensiz ve R tipi koloniler oluştururken, bazıları daha az kapsül oluşturur ve S tipi koloniler görünümünde olur. 55 °C’ de 30 – 45 dakika ısıtmayla öldürülebilir [96, 97].

K. pneumoniae suşlarının birçoğu hemen bütün şekerler gaz ve asit oluşturarak parçalarlar. Nişastayı en geç 4 gün içerisinde gaz oluşturarak parçalamaları diğer enterik bakterilerden ayırt eder. İndol yapmazlar. Metil kırmızısı deneyi negatif, Voges Proskauer pozitifdir. Tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanırlar. Yani IMVIC testleri ---++’ tir. Üreaz olumlu olup, jelatini eritmezler. KCN’ li besiyerlerinde ürerler ve lizinin dekarboksile ederler [95].

Escherichia coli: *E. coli*, diğer Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler gibi, gram negatif çomak şeklinde sporsuz bir bakteridir. Kapsül oluşturma nadirdir. Buna karşılık birçok suş polisakkarit yapısında M antijeni içeren bir mikrokapsül veya yine polisakkarit yapısında K antijenlerini içeren slime tabaka içerebilir [98]. Peptonlu su, buyyon ve jeloz gibi zenginleştirilmemiş besiyerlerinde fakültatif anaerob olarak ürerler. Optimal üreme 37 °C' de, nötral pH varlığında olur. Ancak 18 – 44.5 °C arasında, pH 5 – 8 sınırlarında da daha yavaş olarak ürer ve 44 °C' de laktozu fermente edebilmesi ve indol oluşturmaya diğer koliform laktozu fermente eden bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılır [94, 99].

Sıvı besiyerlerinde genellikle homojen bulanıklık meydana getirir. Katı besiyerlerinde S şeklindeki suşlar 24 saatte düzgün kenarlı, ortası kalkık, 2 - 3 mm çapında, pigmentsiz koloniler oluşturur [98]. MacConkey besiyerinde laktozu fermente ettiğinden kırmızı renkte, safrayı presipite ettiğinden etrafında zon oluşan koloniler; EMB besiyerinde laktozu fermente ettiğinden metalik röfle veren yeşil – siyah koloniler oluştururlar [94, 99].

E. coli' nin önemli biyokimyasal özellikleri glikozdan asit ve gaz oluşturmaya; laktoz, D – manitol, D – sorbitol, L – arabinoz, L – ramnoz, maltoz, D – ksiloz, trehaloz ve D – mannozu fermente etmesi; adonitol, inositol, sellobioz, eritrol, D – arabitölü fermente etmemesi; nitratı indirgemesi; katalaz, metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz, ONPG deneylerinin pozitif olması; oksidaz VogesProskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25 °C' de DNaz deneylerinin negatif olması; indol oluşturmaya; H₂S ve üreaz oluşturmaması; KCN' de ve tek karbon kaynağı olarak sitratta ürememesi; jelatini hidrolize etmemesi olarak belirtilebilir [94, 98, 99].

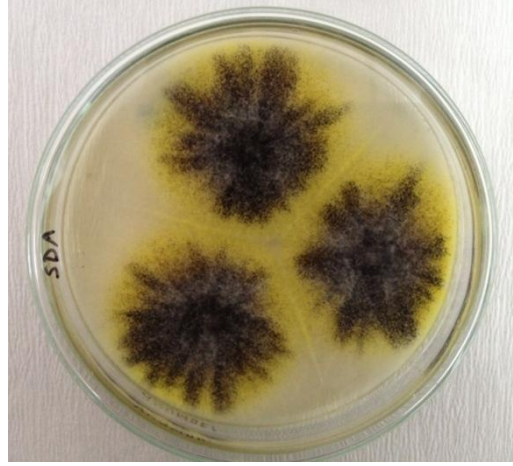
Pseudomonas aeruginosa: Gram negatif, 1.5 – 3 µm boyunda, 0.5 µm eninde, sporsuz veya kapsülsüz basil veya kokobasil şeklindedir. Polar flagellası ile hareketlidir. Zorunlu aéroptur, optimum 37 °C' de ürer ancak 42 °C' de üreyebilirler. İzolasyonları oldukça basit olup, adi besiyerlerde üreyebilirler. Kültürlerinde tatlı üzüm kokusu, 2-aminoasetofenona aittir ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya özgüdür. Yine benzer şekilde piyosiyanın varlığı ve beraberinde 42 °C' de üreyebilme sadece bu bakteriye aittir [100, 101].

Organik üreme faktörlerine ihtiyacı yoktur, izolasyonları oldukça kolaydır. Çoğu izolatlar β hemolitik ve piyosiyanine bağlı olarak yeşil metalik bir parlaklık oluştururlar. Karbonhidratları fermente etmezler, birçok şekeri oksidatif yolla yıkarken, maltozu etkilemez. Nitratı gaz yaparken, sitrat pozitifdir. Katalaz yapar, indol oluşturmazlar [101].

Proteus vulgaris: Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Proteus* bakterileri Gram negatif, 1 – 3 x 0.4 – 0.6 mikron boyutlarında, bazen daha uzun ya da kokobasil görünümünde, sporsuz ve kapsülsüz bakterilerdir. Toprakta, suda ve dışkıyla kontamine materyallerde bulunurlar [102]. İndol, salisin ve eskulin pozitifdir, ayrıca TSI 'de hidrojen sülfür oluştururlar [103].

Bacillus cereus: Bacillaceae familyasına ait bir bakteri olan *Bacillus cereus* toprak ve bitki örtüsü üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. 1 – 1.2 μm ile 3.0 – 5.0 μm arasında hücre boyutuna sahiptir. Genellikle 30 °C civarında optimum gelişme gösterir. Santral veya subterminal yapıda, elipsoidal spora sahip olan bakteri, peritrik flagellaları sayesinde hareketli ve aerobiktir. Hemolisin salgılayan *Bacillus cereus*, lesitinaz, jelatinaz, proteaz, amilaz aktivitesine sahip olup nitratı indirger ve polimiksine dirençlidir. Birçok suşu da % 7.5 tuzda üreyebilir [104].

Aspergillus niger van Tiegh: Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler yavaş gelişir ve 10 – 15 günde oda sıcaklığında 2.5 – 3.0 cm çapına ulaşmaktadır. Oldukça gevşek kompakt beyaz-hafif sarı bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genellikle yığınlar halinde toplanmış konidi yapıları vardır. Tipik olarak karbon siyahına yakın renkte veya bazen koyu kahverengimsi siyah renktedir ve koloni yüzeyini dar bir kenar hariç tamamen kaplamaktadır. Koloni altı genellikle renksiz, bazen merkezde soluk sarıdır. Konidi başları tipik olarak büyük ve siyah, önce globoz, daha sonra radyat veya yaşlandığında iki veya daha fazla gevşek – iyi belirlenmiş sütun halinde yarılmaktadır. Konidiyoforlar değişken uzunlukta, çeper düz, nispeten kalın, renksiz ve özellikle üst kısımda kahverengimsi tonlarda, vesiküller globoz veya globoza yakındır. Sterigmalar iki seri halindedir. Birinci seri yaş ve ırklara göre değişken, kahverengimsi renkte ve bazen bölmelidir. Sekonder sterigmalar çok daha homojen, konidiler olgunlaştıklarında tipik olarak globoz, daha az olarak hafif diskoid, farklı ırklarda biraz değişken büyüklükte, kahverengi görünümde, çeperi belirgin şekilde kalın, düzensiz şekilde pürüzlü veya kısadır [105].



Şekil 2.4: *A. niger*' in SDA besiyerinde 3 nokta ekimi

***Aspergillus flavus* Link:** Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler değişik şekillerde gelişmekte, 10 günde oda sıcaklığında hızla gelişerek 6 – 7 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle ince fakat sıkı yapılı bir misel keçesi oluşturmakta, çoğunlukla düz ancak bazı ırklarında ise radial olarak oluklu ya da beyin kıvrımlıdır. Çoğu ırklarında bol miktarda konidi yapıları gelişir. Genç konidi başları genellikle sarı tonlardadır fakat hızlı bir biçimde parlak koyu sarı – yeşil tonlara kaymakta ve sonunda koyu üzüm yeşili olmaktadır. Koloni altı genellikle renksiz - pembemsi esmer renkte, fazla sklerosyum yapan ırklarda koyu kırmızı – kahverengidir. Kondiyoforlar kalın çeperli, renksiz, kaba şekilde pürüzlü genellikle 1 mm kısadır. Vesiküller gençken uzamış, daha sonraları ise subgloboz veya globoz olmaktadır. Sterigma tek veya iki seri halinde, aynı ırkta tek bir vesikülde her iki durumda görülebilmektedir. Çoğunlukla konidiler olgunlaştıklarında globoz veya subgloboz, belirgin şekilde pürüzlü veya düz çeperli büyüklükleri ırklar arasında değişkendir [106]. *Aspergillus flavus* yağlı tohumlarda aflatoksin denilen mikotoksini üretmektedirler. [107]. Şekil 2.5' de *A. flavus*' un SDA besiyerinde bir haftalık 3 nokta ekimi görülmektedir.



Şekil 2.5: *A. flavus*' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi

Aspergillus ochraceus K. Wilh. : Czapek Dox Agar besiyerinde koloniler sınırlı gelişerek 10 – 14 günde oda sıcaklığında 3 – 4 cm çapına ulaşmaktadır. Genellikle düz veya hafif oluklu, sıkı bir misel keçesi oluşturur. Koloniye karakteristik görünümünü veren açık okr – deve tüyü, bazı ırklarda daha açık ve sarı-okr renklerinde ve bol miktarda konidi yapıları geliştirir. Koloni altı sarımsı – yeşilimsi kahverengi veya kırmızımsı mor tonlardadır. Sklerosyumlar genellikle gelişir ve koloni görünümünü etkileyecek kadar bol miktarda bulunur. Konidi başları gençken globoz, yaşlandığında konidi zincirleri tipik olarak 2 – 3 divergent ve kompakt sütun halinde birleşmektedir. Konidiyoforlar belirgin şekilde donuk sarı – açık kahverengi tonlarında renkli, çeperi kalın ve kaba şekilde pürüzlü, vesiküller globoz, ince çeperli ve renksizdir. Sterigmalar vesikülün bütün yüzeyini kaplamış, iki seri halinde, konidiler globoz-subgloboz, hafif pürüzlü, bazen tamamen düz görünümlüdür. Sklerosyumlar gençken soluk pembe, olgunlaştıklarında şarabımsı mor renkte, düzensiz şekilli, globoz – ovat – silindirik, tek veya belirgin kümeler halinde gelişmektedir [108].



Şekil 2.6: *A. ochraceus*' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi

***Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg** : Patates Dekstroz Agar ve Patates Sukroz Agar besiyerinde oda sıcaklığında 4 günde 3.5 – 5.5 cm büyüklüğüne ulaşır. Havai miselleri yünsü yapıda, beyaz, soluk pembe veya grimsi menekşe rengindedir. Konidiyoforları başlangıçta dallanmamıştır, daha sonra dallanır. Beauvericin, fumonissin, fusarin C, fusoproliferin, fusapiron, moniliformin ve naftokinon pigmentleri gibi toksik metabolitleri üretir. Orkide, incir, pirinç, mısır ve diğer tahıllardan izole edilebilir. Yiyeceklerde çürümelere ve yapraklarda beneklenmelere neden olur [109].



Şekil 2.7: *F. proliferatum*' un SDA besiyerinde 3 nokta ekimi

Mycobacterium tuberculosis: *M. tuberculosis*, 0.2 – 0.5 µm eninde, 1 – 4 µm boyundadır. Tek tek küçük zincirler veya küçük demetler halinde bulunur. Kültürden hazırlanan preparatlarda kokoid veya filamentöz biçimlerde görülebilirler [110, 111]. Asit ve alkole dirençli, ince görünümlü, granüler bir morfolojiye sahiptir. Optimum üreme sıcaklığı 37 °C’ dir. Klinik örneklerden ilk izolasyonlarında üreyebilmesi için zenginleştirilmiş ortamlar gereklidir. Büyüme ve gelişimi için % 5 – 10 CO₂ içeren atmosfer koşulları uygundur. Yavaş ürer ve jenerasyonunu yaklaşık 15 saatte tamamlar. Bakteri, nonmikobakteriyel kontaminantların üremesini engelleyen malaşit yeşili katılmış % 60 homojenize yumurta içeren Löwenstein-Jensen besiyerinde 3 – 6 haftalık inkübasyonda ürer. Kolonileri deve tüyü renginde karnıbahar görünümündedir. Yüksek lipit içerikleri nedeniyle besiyeri yüzeyine sıkıca tutunurlar [112, 113]. *M. tuberculosis* ısıya, güneş ışığına ve UV ışığına oldukça duyarlıdır. 60 °C’ de 20 dakikada, 70 °C’ de 5 dakikada ölür fakat kuruluğa karşı dirençlidir [112-114].

2.4 Kullanılan Besiyerleri

2.4.1 Antifungal ve Antibakteriyel Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

Agar içeren besiyerleri petri ve tüpte olmak üzere 2 tipte hazırlandı. Kaynatma işleminden sonra petride besiyeri hazırlamak için öncelikle 20 dakika 121 °C’ de sterilizasyon işlemi yapıldı ve beg alevi yanında besiyeri 10 mL olacak şekilde petri plaklarına paylaştırıldı. Tüplerde yatık agar hazırlamak için ise besiyeri tüplere 6 mL olacak şekilde paylaştırıldıktan sonra otoklavlanma işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyon işleminden sonra tüpler yatık olarak yerleştirilerek donması sağlandı. Petri ve yatık besiyerleri daha sonra kullanılmak üzere + 4 °C’ de buzdolabında saklandı. Broth besiyerleri kaynatılma işleminden sonra tüplere paylaştırılarak 1.5 atm basınç altında 20 dakika 121 °C’ de steril edildi. Daha sonra kullanılmak üzere + 4 °C’ de buzdolabında saklandı.

Fluka Nütrient agar (pH 6.8±0.2)

Et ekstraktı..... 3.0 g

Pepton 5.0 g

Agar 15.0 g

Distile su..... 1000 mL

Antibakteriyel aktivitede MBK değerini belirleme ve yatık agarda kültüre alma işlemlerinde kullanılmıştır.

Difco™ Nütrient Broth (pH 6.8±0.2)

Pancreatic Digest of Gelatin 5.0 g

Et ekstraktı 3.0 g

Distile su..... 1000 mL

Antibakteriyel aktivitede MİK değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Oxoid Sabouraud dekstroz agar (pH 5.6±0.2)

Pepton 10 gr

Glukoz 40 gr

Agar..... 15 gr

Distile su..... 1000 mL

Antifungal aktivitede MFK değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Merck Sabouraud dekstroz Broth (pH 5.6±0.2)

Dekstroz 20 gr

Pancreatic digest of casein 5 gr

Peptic digest of animal tissue 5 gr

Distile su..... 1000 mL

Antifungal aktivitede MİK değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

Merck Malt ekstrakt agar (pH 7.6±0.2)

Malt ekstraktı	30 gr
Pepton	3 gr
Agar	15 gr
Distile su.....	1000 mL

Antifungal aktivitede yatık agarda fungusların kültüre alınmasında kullanıldı.

2.4.2 Antitüberküloz Aktivitede Kullanılan Besiyerleri

2.4.2.1 Middlebrook 7H9 Broth Base (pH 6.6 ± 0.2)

Antitüberküloz aktivitede *Mycobacterium tuberculosis* kültürü ve pasajı için kullanılan özel besiyeridir. MGIT tüplerin dip kısmına gömülü olan silikon içerisinde oksijene duyarlı floresans sensörleri yer alır. Ortamda bakteri ümeden önce bulunan oksijen varlığı floresansı görmemizi engeller. Ancak bakteri üredikten sonra ortamdaki oksijenin azalması nedeniyle UV ışığında (Wood'un lambası) 365 nm' de floresansın gözlemlenmesine olanak tanır. Böylelikle üremenin olup olmadığı kontrol edilir. Middlebrook 7H9 Broth Base antitüberküloz aktivitede kullanılan suşların pasajlanması ve aktivite tayininde kullanıldı.

Amonyum sülfat	0.5 g
L-Glutamik asit	0.5 g
Sodyum sitrat	0.1 g
Piridoksin	1.0 mg
Biotin.....	0.5 mg

Disodyum fosfat.....	2.5 g
Monopotasyum fosfat.....	1.0 g
Ferrik amonyum sülfat.....	0.04 g
Magnezyum sülfat.....	0.05 g
Kalsiyum klorür	0.5 mg
Çinko sülfat.....	1.0 mg
Bakır sülfat.....	1.0 mg
OADC.....	100,0 mL
Distile su.....	900 mL

2.4.2.2 Middlebrook 7H10 Agar Base (pH 6.6 ± 0.2)

Middlebrook 7H10 Agar, mikobakteri türlerinin gelişimini destekleyen gerekli besinleri sağlamak için oleik asit-albümin ile zenginleştirilmiş, gliserol, dekstroz ve inorganik bileşikleri içeren tanımlanmış bir besiyeridir. Katalaz, besiyerinde bulunma ihtimali olan zehirli peroksitleri parçalar. Malakit yeşili kontamine edici bakterilerin kısmi inhibisyonunu sağlamak için inhibitör ajan olarak rol alır. Daha basit kimyasal formülasyonu sebebiyle, mikobakteriyel türlerin gelişimi için yaygın olarak kullanılan yumurta bazlı besiyerinden daha az kontaminant gelişimi riski taşır [115].

Magnezyum sülfat.....	0.05 g
Ferrik amonyum sülfat.....	0.04 g
Sodyum sitrat	0.4 g
Amonyum sülfat	0.5 g

Monosodyum Glutamat	0,5 g
Disodyum fosfat.....	1.5 g
Monopotasyum fosfat.....	1.5 g
Piridoksin	1.0 mg
Çinko sülfat.....	1.0 mg
Bakır sülfat.....	1.0 mg
Biotin.....	0.5 mg
Kalsiyum klorür	0.5 mg
Malakit Yeşili	0.25 mg
Agar	13.5 g
Gliserol	5.0 mL
OADC.....	100.0 mL

Besiyerlerini zenginleştirici olarak kullanılan OADC' nin içeriği şu şekildedir:

Polioksietilen stearat (POES)	8.5 g
Bovin albümin	50.0 g
Dekstroz	20.0 g
Katalaz.....	0.03 g
Oleik Asit	0.1 g

Besiyerlerinde oluşabilecek kontaminasyonları önlemek amacıyla PANTA antibiyotik karışımı kullanıldı. Liyofilize PANTA şişesi için yaklaşık formül:

Polimiksin B	6.000 ünite
Trimethoprim	600 µg
Amfoterisin B	600 µg
Azlosilin	600 µg
Nalidiksik asit	2.400 µg

2.5 Kullanılan Antibiyotikler

Petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antifungal ve antibakteriyel aktivite sonuçları standart antibiyotik sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Funguslar için standart antibiyotik olarak Fluka marka Amfoterisin B, bakteriler için ise ticari olarak satılan ve sefalosporin grubu bir antibiyotik olan İespor IM 1 gr flakon kullanıldı.

Amfoterisin B (AmB), 1955 yılında Venezuela' nın Orinoco River bölgesinden toplanan topraktan actinomycete *Streptomyces nodosus*' un bir suşundan izole edilen polyen grubuna bağlı doğal bir antibiyotiktir. AmB lipofilik bir moleküldür. Fungal hücre duvarı membranında bulunan ergosterole bağlanarak, por olarak fonksiyon gören oligodendromların oluşumuyla hücre duvar permeabilitesinin bozulmasına yol açarak, potasyum ve diğer intrasellüler moleküllerin, hücre dışına çıkmasıyla fungal hücrenin ölümüne neden olur. Geniş spektrumlu bir etkiye sahiptir [116, 117].

2.6 Serum Fizyolojik Hazırlanışı

9 gr NaCl, 1 litre distile suda çözülerek hazırlandı. Tüplere paylaştırılarak otoklavda 20 dakika 121 °C' de steril edildi. İnokulum süspansiyonunun hazırlanmasında kullanıldı.

2.7 İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanışı

Antibakteriyel aktivitede 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 ise fungus inokulumu 450 nm’ de 0.6 absorbans değeri okunarak ayarlandı.

Antitüberküloz aktivite için Becton ve Dickinson üretici firmasının tavsiyelerine uyularak inokulum, BACTEC MGIT pozitif tüplerden prosedüre göre hazırlandı. Sıvı kültürden inokulum hazırlanırken BACTEC MGIT tüplerinin okunup pozitif çıkmasından sonraki gün, 1. gün olarak kabul edildi. Gün 1 ve gün 2 inokulum olarak kullanılabilirken 3, 4 ve 5. günlerde, kültürlerden 1 mL alınıp 4 mL serum fizyolojik ile sulandırılarak inokulum süspansiyonu hazırlandı.

2.8 Ledanitrotetrazolium violet (INT);2-(4-Iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium klorür Çözeltisinin Hazırlanması

Bakteri ve fungus üremesinin kontrol edilmesinde Fluka marka Ledanitrotetrazolium violet üreme indikatörü kullanıldı. 0.04 gr Ledanitrotetrazolium violet tartılıp 10 mL steril distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Stoğun kontamine olmaması için 2 ml’ lik ependorf tüplerine aktarılarak çalışıldı. Çözelti + 4 °C’ de ışık almayan ortamda saklandı.

2.9 Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite

2.9.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunu Belirleme (MİK)

Bakteriler, yatık Nutrient agarda 24 saat 37 °C ’de, funguslar ise yatık Malt agarda 72 – 96 saat süreyle 28 °C’ de inkübasyona tabii tutularak yetiştirildiler.

Taze kültürlerle inokulum süspansiyonu hazırlandı ve her bir mikroorganizma için well-plate üzerinde üç seri olarak çalışıldı. Besiyeri olarak küfler için Sabouraud Dekstroz Broth, bakteriler için Nutrient Broth kullanıldı. İlk kuyucuk hariç diğer bütün kuyucuklara 100 µl besiyeri konulduktan sonra birinci kuyucuğa 175 µl besiyeri ve 25 µl ekstre konuldu ve 6. kuyucuğa kadar bir önceki kuyucuktan 100 µl ekstre çözeltisi alınarak seri şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltme işlemi bittiğinde kuyucuklardaki son ekstre konsantrasyonu 12.5 mg/mL 'den 0.04 mg/mL' e arasında olacak şekilde hazırlanmış oldu. Seyreltme işleminden sonra negatif kontrol hariç bütün kuyucuklara 20 µl inokulum süspansiyonu aşılandı. İçerisinde bitki ekstresi, besiyeri ve inokulum süspansiyonu bulunan 96 - well plateler, bakteriler için 37 °C' de 24 saat, funguslar için ise 28 °C' de 72 – 96 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresinden sonra, üremenin gerçekleştiği konsantrasyondan yüksek olan bir önceki konsantrasyon MİK değeri olarak alındı [118,119].

MİK değerini saptamada Ledanitrotetrazolium violet (INT); 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, üreme 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.

2.9.2 Minimum Bakterisit ve Fungisit Konsantrasyonunu Belirleme (MBK ve 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 funguslar için Sabouraud Dekstroz Agar, bakteriler için ise Nutrient Agar içeren petri plakların üzerine ekim yapıldı. Yukarıda belirtilen koşullarda inkübasyona tabi

tutulduktan sonra üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri bakterilerde MBK funguslarda MFK değeri olarak bulundu [118].

2.10 Antitüberküloz (Antimikobakteriyel) Aktivite

Bu yöntemde, MGIT (Becton Dickinson) içerisinde modifiye edilmiş 7 ml Middlebrook 7H9 Broth Base kullanıldı. Besiyeri içerisine 15 mL OADC (oleik asit, albumin, dekstroz, katalaz) ile sulandırılmış PANTA antibiyotiğinden 800 µL eklendi. 96 well-plate'lerin ilk kuyucuğuna 175 µL, diğer kuyucuklara 100 µL besiyeri konuldu. Ekstreden ilk kuyucuğa 25 µL konularak konsantrasyonun 12.5 mg/mL olması sağlandı; seri dilüsyonlarla kuyucukların konsantrasyonları 12.5, 6.25, 3.12, 1.52, 0.76, 0.38, 0.19, 0.09 ve 0.04 mg/mL olarak hazırlandı. Ekstreler *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) ve H37Rv (ATCC 27294) suşlarına karşı test edildi. İnokulumdan negatif kontrol hariç her kuyucuğa 20 µL ekildi. 3 seri olarak çalışıldı ve 37 °C' de 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı [120].

MİK sonuçlarını belirlemek için "Presto Blue" büyüme indikatöründen her bir çukurcuğa 15 µL konularak bir gün boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Bu süreçten sonra üreme olmayan çukurcuklar mavi renkte kalırken, üremenin gerçekleştiği çukurcuklar pembe rengini aldı.

Bakteri ve funguslarda olduğu gibi üremenin olduğu çukurcuktan bir önceki çukur konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. Üremenin gerçekleşmediği çukurlardan 20 µL alınarak 80 µL taze besiyeri içeren çukurlara alındı ve tekrar inkübasyona bırakıldı. MBK değeri, üremenin gerçekleşmediği konsantrasyon değeri olarak tespit edildi.

2.11 Antioksidan aktivite

2.11.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) Metodu

DPPH çözeltisinin ekstreyle karışmasından sonra düşen absorbans değeri, ekstrenin antioksidan aktivitesinin olduğunu gösterir. Belirlediğimiz IC50 (inhibisyon konsantrasyonu) değeri, DPPH çözeltisinin absorbansını % 50 düşüren konsantrasyon değeridir.

0.003 gr ekstre örneğinden tartılıp 3 mL metanolde çözülerek 1000 µg/mL konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltiden 25, 50, 100, 200 µg/mL konsantrasyonlarda standart dilüsyonlar hazırlandı. 1.5×10^{-5} M'lık DPPH çözeltisi, 0.0006 gr 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil' in 10 mL metanolde çözülmesiyle hazırlandı. Kör çözeltisi ise 1.5 mL metanol ve 0.5 mL DPPH çözeltisi kullanılarak hazırlandı.

Inula peacockiana bitki türünün petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinden hazırlanmış dilüsyonlardan 1.5 mL alınıp 0.5 mL DPPH çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışımlar 30 dakika karanlık bir odada inkübasyona tabi tutulduktan sonra 517 nm 'de absorbans değerleri UV-vis spektrofotometre ile metanole karşı okundu. Kontrol grubu olarak DPPH çözeltisi kullanıldı [121].

2.11.2 Total Fenol Miktar Tayini

2.11.2.1 Folin – Ciocalteu 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 100 mL distile su içerisinde çözüldü.

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

Ölçüm işlemi: 20 µL bitki ekstresi veya gallik asit, 1.58 mL distile su ve 100 µL Folin – Ciocaltaeu çözeltisi ile karıştırıldı ve 2 dakika sonunda 300 µL sodyum karbonat çözeltisinden konulup 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bekletildikten sonra 765 nm' de absorbans değerleri ölçüldü ve total fenol miktarları eşdeğer gallik asit miktarı olarak verildi [122].

2.11.3 Total Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

2.11.3.1 Alüminyum Klorür (AlCl₃) Kolorimetrik Metodu

Bu metotta referans flavonoid olarak katekol kullanıldı.

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

Bitki ekstralarının hazırlanışı: Petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının her birinden 0.025 gr tartılarak 10 mL % 80 etil alkolde çözüldü. 2500 mg/L' lik konsantrasyonda olan stok çözeltilerden 1250 mg/L ve 500 mg/L 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 içerisinde 150 µL % 10' luk AlCl₃ eklendi. 6. dakikada 1 mL 1 M NaOH eklendikten sonra 1.2 mL su ile çözelti 5 ml' ye tamamlandı ve 510 nm' de UV-Vis spektrofotometre ile ölçüm alındı. Kör çözelti içerisinde ekstre ya da referans çözelti yerine aynı miktarda distile su konuldu. Sonuçlar eşdeğer katekol miktarı olarak verildi [123].

2.12 HPLC Analizi (High Pressure Liquid Chromatography)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak ifade edilir. Kolon kromatografisi çeşitlerinden bir tanesidir. Sıklıkla biyokimya ve analitik kimya alanlarında ayırma, tanımlama ve bileşenlerin miktarını belirleme gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Kolon kromatografisi durgun faz yani paketlenmiş materyal, çözügen 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.

2.12.1 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 Eclipse XDB – C18 (250 x 4.60 mm) 5 mikron

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

Akış Hızı: 0.8 mL / dakika

Kolon sıcaklığı: 300 °C

Enjeksiyon hacmi: 20 mikrolitre

Numunelerden 25 mg tartılıp 1 mL metanolde çözülerek 20 μ L' si cihaza verildi.

Gradient programı:

Pumps		CTO-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						

Şekil 2.8: HPLC Gradient programı

2.13 Likid Kromatografisi - Kütle Spektrometresi (LC-MS) Analizi

LC-MS (high-performance liquid chromatography coupled with tandem spectrometry) tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılan moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi tutulmaktadır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000' dür. Bu nedenle LC-MS tekniği özgün bir test olmasının yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

Standart HPLC tekniğinde madde sadece retansiyon zamanı ile teşhis edilir iken LC-MS/MS teknolojisi ile retansiyon zamanına ek olarak “precursor ve product” iyonlar ile değerlendirilmektedir.

2.13.1 Kullanılan Agilent Marka LC-MS Sisteminin Özellikleri

Analizler Agilent marka LC-MS sistemi (tek kuadrupollu 1200 LC) ile yapıldı.

Gaz sıcaklığı: 350 ° C

Kolon sıcaklığı: 35 ° C

Kurutucu gaz akışı: 12 L/dakika

Nebulizer pressure: 45 psi

Capillary voltage: 3500 V.

Kolon Özellikleri: C-18 (EC-C18 4,6x50mm 2.7um).

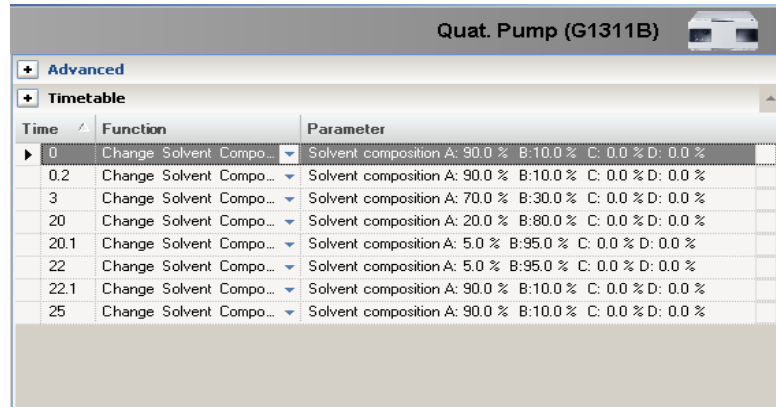
Mobile fazlar: A: Su (5 mM amonyum format + % 0.5 formik asit), B: metanol.

Toplam analiz süresi: 32 dakika.

Enjeksiyon hacmi: 5 µl.

Numuneler 0.5 g tartılıp 5 mL gradient grade metanolde çözüldü. Sartorius (0.22 µm.) membran filtrelerden süzülerek cihaza verildi.

2.13.2 Gradient Programı



The screenshot displays the 'Quat. Pump (G1311B)' software interface. It features a 'Timetable' section with a table of gradient program steps. The table has three columns: 'Time', 'Function', and 'Parameter'. The 'Function' column contains 'Change Solvent Compo...' for all entries. The 'Parameter' column shows the solvent composition percentages for components A, B, C, and D at each time point.

Time	Function	Parameter
0	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 90.0 % B:10.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
0.2	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 90.0 % B:10.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
3	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 70.0 % B:30.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
20	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 20.0 % B:80.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
20.1	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 5.0 % B:95.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
22	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 5.0 % B:95.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
22.1	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 90.0 % B:10.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %
25	Change Solvent Compo...	Solvent composition A: 90.0 % B:10.0 % C: 0.0 % D: 0.0 %

Şekil 2.9: LC-MS gradient programı

2.14 Kullanılan Cihazlar

Ekstrelerin alınması işleminde rotary evaporator kullanıldı. Ekstrelerin antitüberküloz aktivite çalışmaları kapsamında Bilser marka W-lamp hepafiltreli laminaflow kullanıldı. Antioksidan çalışmalar sırasında UVWIN 5.0 UV-VIS spektrofotometre ve kuartz küvetler kullanıldı. Mikroorganizmaların uygun sıcaklıklarda inkübasyonu için Elektro-Mag marka etüv kullanıldı. Çözeltilerin ve inokulumların homojen karışması için Elektro-Mag marka vortex kullanıldı.

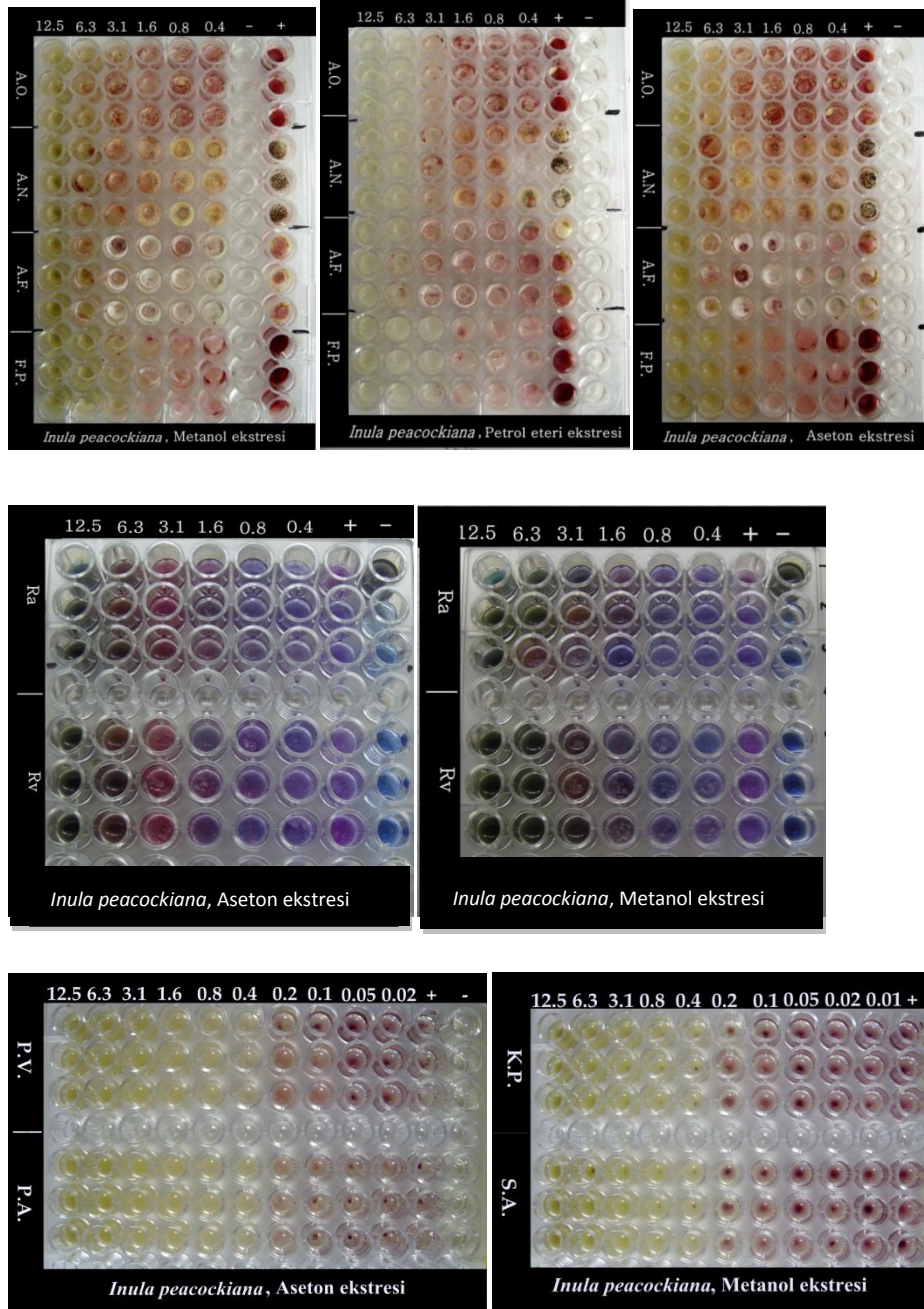
3. BULGULAR

3.1 Antibakteriyel, Antitüberküloz ve Antifungal Bulguları

Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri olarak ifade edilen MİK, bitki metanol, aseton ve petrol eter ekstralarının, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden konsantrasyon değeri olarak, MBK ve MFK değerleri ise bakterisit konsantrasyon değeri olarak mg/mL cinsinden Tablo 3.1’ de verildi. Şekil 3.1’ de ise MİK değerlerine ait fotoğraflar yer almaktadır. Standart ilaçların MİK ve MBK/MFK değerleri ise Tablo 3.2’ de verildi.

Tablo 3.1: *Inula peacockiana* petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının MİK ve MBK /MFK değerleri

	Petrol eteri		Aseton		Metanol	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>Proteus vulgaris</i>	0.1	0.1	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>Bacillus cereus</i>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	0.1	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.1	0.1	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>Esherichia coli</i>	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8
<i>Aspergillus niger</i>	6.25	6.25	12.5	>12.5	12.5	>12.5
<i>Aspergillus flavus</i>	6.25	6.25	6.25	>12.5	12.5	>12.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	6.25	6.25	12.5	>12.5	12.5	>12.5
<i>Fusarium proliferatum</i>	3.1	3.1	6.25	>12.5	6.25	6.25
<i>M. tuberculosis</i> (RA)	0.05	3	12.5	12.5	6.25	6.25
<i>M. tuberculosis</i> (RV)	-	-	12.5	12.5	6.25	6.25



Şekil 3.1: *Inula peacockiana* ekstrelerinin Mik sonuçlarına ait fotoğraflar, A.O.: *Aspergillus ochraceus*, A.N. : *Aspergillus niger*, A.F. : *Aspergillus flavus*, F.P. : *Fusarium proliferatum*, Ra : *Mycobacterium tuberculosis* (Ra), Rv: *Mycobacterium tuberculosis* (Rv), P.V.: *Proteus vulgaris*, P.A.: *Pseudomonas aeruginosa*, K.P.: *Klebsiella pneumoniae*, S.A.: *Staphylococcus aureus* (Konsantrasyon değerleri mg/mL cinsinde)

Tablo 3.2: Standart antibiyotiklere karşı bakteri ve fungusların MİK ve MBK/MFK değerleri

	Standart Antibiyotik ($\mu\text{g/mL}$)	
	MİK	MBK
<i>Proteus vulgaris</i>	0.3	0.3
<i>Bacillus cereus</i>	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.3	0.3
<i>Pseudomas aeuroginosa</i>	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	10
<i>Esherichia coli</i>	0.3	0.3
<i>Aspergillus niger</i>	0.8	0.8
<i>Aspergillus flavus</i>	0.1	0.1
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.8	0.8
<i>Fusarium proliferatum</i>	0.8	0.8

3.2 Antioksidan Aktivite Bulguları

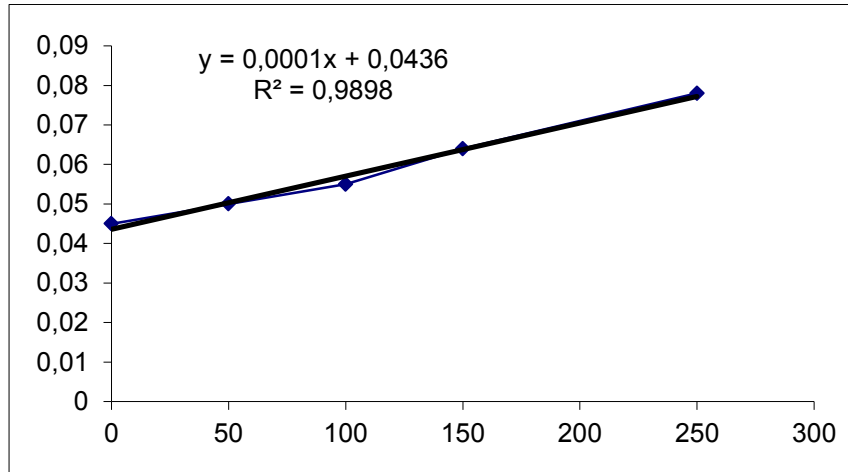
3.2.1 DPPH Yöntemi Bulguları

DPPH çözeltisi ($1,5 \times 10^{-5} \text{M}$) 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 % inhibisyon değerleri tablo 3.3’de verildi.

Tablo 3.3: *Inula peacockiana* ekstrelerinin ve askorbik asitin % inhibisyon değerleri

Konsantrasyon (µg/mL)	Askorbik asit (% inhibisyon)	Metanol ekstresi (% inhibisyon)	Aseton ekstresi (% inhibisyon)	Petrol eteri ekstresi (% inhibisyon)
25	62.35	75.04	76.34	70.70
50	97.01	92.14	82.95	74.08
100	97.21	91.19	91.06	68.05
200	96.91	92.09	89.77	67.86

3.2.2 Total Fenol Yöntemi Bulguları



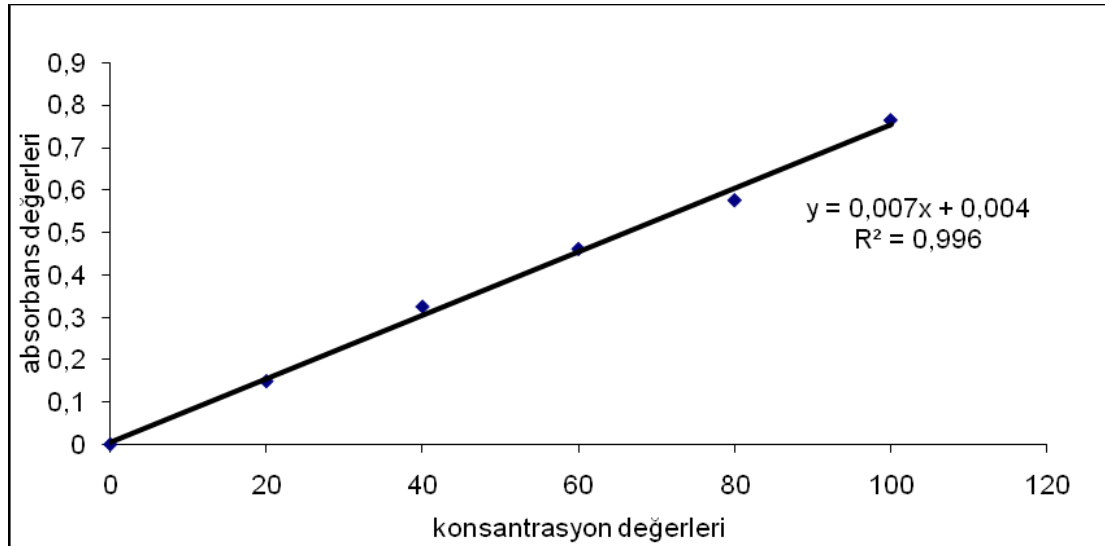
Şekil 3.2: Gallik asit kalibrasyon tablosu

Tablo 3.4: *Inula peacockiana* bitki ekstrelerinin total fenol miktarı

<i>I. peacockiana</i>	Total fenol miktarı (1g/L ekstrede gallik asit)
Petrol eteri	90
Aseton	126
Metanol	172

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 3.3’ de verilen kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin total flavonoid miktarları gram ektrede eşdeğer katekol miktarı olarak tablo 3.5’de verildi.



Şekil 3.3: Katekol kalibrasyon grafiği

Tablo 3.5: *Inula peacockiana* ekstrelerinin total flavonoid miktarları

Bitki ekstreleri	Gram ektrede bulunan eşdeğer katekol miktarı
Petrol eteri	8.94
Aseton	12.27
Metanol	15.75

3.3 HPLC Analizi Bulguları

Tablo 3.6: HPLC analizi sonucunda ekstrelerde bulunan fenolik maddeler

NO	Numuneler	Petrol eteri ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Aseton ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Metanol ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)
1	Chlorogenic acid	*	501,1	3094,7
2	Caffeic acid	*	640,5	502,9
3	Epicatechin	*	*	*
4	Syringic acid	0,8	*	18,5
5	p-coumaric acid	*	*	*
6	Ferulic acid	*	*	*
7	Sinapinic acid	*	*	*
8	o-coumaric acid	*	133,7	166,1
9	Hesperidin	*	*	*
10	Rosmarinic acid	*	*	*
11	Cinnamic acid	*	*	*
12	Karvakrol	*	*	*

3.4 LC-MS Bulguları

Tablo 3.7: LC-MS Analizi sonucunda ekstrelerde bulunan fenolik maddeler

NO	Numuneler	Petrol eteri ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Aseton ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)	Metanol ekstresi ($\mu\text{g}/\text{gram}$)
1	Gallic acid	*	*	*
2	Vitexin	*	*	*
3	Naringin	*	*	*
4	Rutin hidrat	*	*	*
5	Apigenin 7 glikozide	*	*	*
6	Oleuropein	*	*	*

7	Trans-cinnamic acid	*	*	*
8	Quercetin	*	234,13	120,85
9	Naringenin	*	*	*
10	Luteolin	*	105,20	97,58

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *Inula peacockiana* bitki türünün petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ve HPLC sonuçları incelendi.

Mikrodilüsyon metodu sonuçları incelendiğinde en iyi sonuçlar petrol eteri ekstresinde elde edilmiştir. Bu ekstre *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* üzerinde 0.1 mg/mL konsantrasyon değerinde bakterisit ise 3.1 mg/mL konsantrasyon değerinde ise *Fusarium proliferatum* üzerinde fungusit etki gösterdi. Bakteriler için kullandığımız sefalosporin grubu antibiyotik *Proteus vulgaris* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde bakterisit etkisi 0.3 µg/mL' dir. Amphotericin B antibiyotik *Fusarium proliferatum* üzerinde fungusit etkisi ise 0.8 µg/mL' dir. Petrol eteri, aseton ve metanol ekstraları *Bacillus cereus* üzerine aynı konsantrasyon değerinde inhibisyon göstermişlerdir (0.4 mg/mL).

Aşkun ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada antifungal aktivite sonuçlarının antimikobakteriyel aktivite sonuçlarına paralel olabileceğini bulmuşlardır [124]. Çalışmamızda elde ettiğimiz petrol eteri ekstresinde görülen yüksek antifungal ve antimikobakteriyel aktivite bu sonuçla paralellik göstermektedir.

Oskay ve Sarı' nın (2007) [125] yaptıkları bir çalışmada *Inula viscosa*' nın etanol ekstresini disk difüzyon metodu ile denemişler *Proteus vulgaris*' de 28 mm, *Staphylococcus aureus*' da ise 18 mm zon çapı elde etmişlerdir.

Bazzaz ve Haririzadeh (2003), [88] *Inula peacockiana*' nın antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı etkili olduğunu bulmuşlardır.

Antitüberküloz aktivite sonuçlarına göre en iyi sonuçlar petrol eteri ekstresinde elde edilmiştir. *Mycobacterium tuberculosis*' in avirülant suşunda MİK değeri 0.05 mg/mL, MBK değeri ise 3 mg/mL olarak bulunmuştur. Petrol eterinin nonpolar yapısı *Mycobacterium* grubunda bulunan bakterilerin yüksek lipit içeriklerini etkilediği için bu sonuç elde edilmiştir.

Tablo 3.6 ve 3.7’de verilen fenolik madde analiz sonuçları incelendiğinde metanol ekstresinde chlorogenic asit (3094.7µg/gram), caffeic acid (502.9µg/gram), syringic acid (18.5 µg/gram), o-coumaric acid (166.1 µg/gram), quercetin (120.85 µg/gram), luteolin (97.58 µg/gram), aseton ekstresinde chlorogenic acid (501.1 µg/gram), caffeic acid (640.5µg/gram), o-coumaric acid (133.7µg/gram), quercetin (234.13 µg/gram), luteolin (105.20 µg/gram), petrol eteri ekstresinde ise sadece syringic acid (0.8µg/gram) bileşimini içerdiği bulunmuştur.

Çeşitli fenolik maddelerin (kafeik asit, protocatechuic, p-kumarik asit, oleuropein p-hidroksi benzoik, vanillik, syringic, ve quercetin) antifungal ve antibakteriyel aktivitelerinin incelenmiş olduğu bir makalede caffeic ve protocatechuic asitlerinin (0.3 mg/ml) *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerine; syringic acid (0.5 mg/ml)’ in *B. cereus* bakterisine karşı üreme inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur [126].

Antioksidan çalışmaları DPPH, total fenol miktar tayini ve total flavonoid miktar tayini metotları kullanılarak çalışıldı. DPPH yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH.)’ ın elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır [127].

Metanol, aseton, petrol eteri ekstreleri ve askorbik asit % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında en iyi değer metanol ekstresinde görüldü. Aseton 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.

Fenoller hidroksil grupları bulundurduklarından, serbest radikalleri yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bitki bileşenleridir [128]. Aynı zamanda fenolik

bileşikler doğrudan doğruya antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilirler [129]. 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 metanol ekstresi fenol içeriği bakımından daha zengindir. (172 mgGA/gr). Aseton ekstresinin 126 mgGA/gr, petrol eteri ekstresinin ise 90 mg/gr miktarında fenol içerdiği belirlendi.

Flavonoidler, antioksidatif aktivitelerini ksantin oksidaz, lipoksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimleri inhibe ederek, metal iyonları ile şelat oluşturarak, diğer antioksidanlar ile etkileşime girerek, ve süperoksit anyonları, lipid peroksil radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak göstermektedirler [130, 131].

Yaptığımız total flavonoid yöntemi sonuçları DPPH yöntemi sonuçlarını doğrulamaktadır. Metanol ekstresinin en yüksek değerinde flavonoid içerdiği belirlendi ve gram ekstrede bulunan esdeğer katekol miktarı 15.75 mg olarak belirlendi. Aseton ekstresinde 12.27 mgCAT/gr , petrol eterinde ise 8.94 mgCAT/gr olarak belirlendi. Sonuç olarak petrol eteri ekstresi flavonoid açısından diğer ekstrele göre daha fakirdir.

Çalışmamız sonucunda farklı çözenlerle yapılan ekstrelerde farklı sonuçlara rastladık. Bitkimiz üzerinde metanol, aseton 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 aseton ekstrelerinde antioksidan aktivite yüksek değerler vermiştir. Petrol eteri ekstresinde de antimikrobiyal etki diğer ekstrele göre daha yüksek bulundu.

5. KAYNAKLAR

- [1] Tan, A., “Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları”, *Anadolu J. of AARI*, , MARA, İzmir, 2, 50-64, (1992).
- [2] İlçim, A., Dığrak, M. and Bağcı, E., “Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması”, *Tr. J. of Biology*, 22, 119-125 (1998).
- [3] Vonderbank, H., “*Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie*”, 4, 198-207, (1949).
- [4] Dığrak, M., İlçim, A. ve Alma, M.H., “Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*”, *Phytotherapy Research*, 13, 584-587, (1999).
- [5] Kalaycıoğlu, A. ve Öner, C., “Bazı bitki ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin Amest- Salmonella test sistemi ile araştırılması”, *Tr. Botany.*, 18, 117-122, (1994).
- [6] Abascal, K. and Yarnell, E., “*Herbs and Drug Resistance. Potential of Botanical in Drug-Resistant Microbes*”, *Alternative & Complementary Therapies*, 1, 237-241, (2002).
- [7] Solanki, R., “Some Medicinal Plants With Antibacterial Activity”, *Pharmacie Globale (IJCP)* Vol. 01, Issue 04, ISSN 0976-8157, (2010).
- [8] Seyyednejad, S. M., Motamedi, H.; “A review on native medicinal plants in Khuzestan, Iran with antibacterial properties”, *Int J Pharmacol*, 6(50): 551-560, (2010).
- [9] Alzoreky, N.S., Nakahara, K., “Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia”, *International Journal of Food Microbiology*, 80: 223-230, (2003).

- [10] Toroğlu, S., Çenet, M., “Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar”, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 2006
- [11] Bouwmeester, J., Matusova, R., Zhongkui S. and Beale, M.H., "Secondary Metabolite Signalling in Host-Parasitic Plant Interactions," *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 358-364 (2003).
- [12] Zhao, J., Wang, J., Chen, Y. and Agarwal, R., “Anti-tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent”. *Carcinogenesis*, 20, 1737-1745, (1999).
- [13] Göktürk Baydar, N., Özkan G. and Sağdıç, O., “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts”, *Food Control*, 15, 335-339, (2004).
- [14] Khalil, M.Y., Moustafa, A.A. and Naguib, N.Y., “Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition” *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (4), 451-457, (2007).
- [15] Herrmann K., “Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food”, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 28, 315–347, (1989).
- [16] Shahidi F., Naczk M., *Food Phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc., (1995).
- [17] Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T., Cardinali A., “Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects”, *Phytochemistry: Advances in Research*, 23-67 ISBN: 81-308-0034-9, (2006).
- [18] Harborne JB., *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, London, UK: Chapman & Hall, (1994).

- [19] Bennet R.C., Wallsgrave R.M., “Secondary metabolites in plant defence mechanisms”, Tansley, Review No. 72, *New Phytol.*, 127, 617–633, (1994).
- [20] Dixon R.A., Paiva N.L., *Stress-induced phenylpropanoid metabolism*, *Plant Cell*, 7, 1085–1097, (1995).
- [21] Kühnau J., “The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition”, *In: Bourne GH, ed. World Rev Nutr Diet. Basel, Switzerland: S. Karger, Vol 24, p. 117–120, (1976).*
- [22] Osawa T., Ide A., Su J-D., and Namiki M., “Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid”, *J Agric. Food Chem.*, 35, 808–812, (1987).
- [23] Frankel E.N., Kanner J., German J.B., Parks E., and Kinsella J.E., “Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine”, *Lancet*, 341: 454–457, (1993).
- [24] Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G., “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”, *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 933–956, (1996).
- [25] Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. and Glover W., “Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits”, *Food Chem.* 66, 401–436, (1999).
- [26] Hayatsu H., Arimoto S. and Negishi T., “Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis”, *Mutat. Res.*, 202, 429–446, (1988).
- [27] Strube M., Dragsted L.O. and Larsen J.C., “Naturally occurring antitumourigens. I. Plant phenols.” *Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter* 605. Copenhagen, Denmark: Nordic Council of Ministers, (1993).
- [28] Sharma S., Stutzman J.D., Kelloff G.J. and Steele V.E., “Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis”, *Cancer Res.*, 54, 5848–5855, (1994).

- [29] Stavric B., “Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen”, *Clin. Biochem.*, 27, 245–248, (1994).
- [30] Guenther, E., *The Essential Oils*, D. Van Nostrand, New York (1948).
- [31] Ceylan A., *Tıbbi Bitkiler 2 (Uçucu Yağ İçerenler)*, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, İzmir, 481, 188, (1987).
- [32] Maksimović, Z.A., Dordević, S. and Mraović, M., “Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil”, *Fitoterapia*, 76, 112-114, (2005).
- [33] Toroğlu, S., Çenet, M., “Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar”, *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), (2006).
- [34] Bağcı, E., Dığrak, M., “Bazı Göknar türleri uçucu yağlarının in vitro antimikrobiyal etkileri”, *Tr. J. of Biology*, 21: 273-281, (1997).
- [35] Davis, P.H., *Flora of Turkey and the Aegean Island*, V, Edinburgh University Press, s. 54 – 73, (1978).
- [36] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E., *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, E.Ü.F.F. kitaplar serisi no: 116, Bornova-İzmir, (1998).
- [37] Doğan, C., Sorkun, K., “Pollen analysis of honeys from Central, Eastern and Southeastern Anatolia in Turkey”, *Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering Series A*, 28, (1999).
- [38] Karamanoğlu, K., *Farmasötik Botanik*, Sayfa: 397-398, 402, (1972).
- [39] Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters and S.M. Webb, D.A., *Flora of Europaea* 4; tribus 248-49, (1984).
- [40] Wu, Q., Shi, Y. and Jia, Z., “Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family”, *Natural Product Reports*, 23, 699–734, (2006).
- [41] Macro, J. A., Sanz-Cervera, J. F. and Manglano, E., *Phytochemistry* 33, 875, (1993)

- [42] Su, B.-N., Takaishi, Y., Yabuuchi, T., Kusumi, T., Tori, M., Takaoka, et. al., *J. Nat. Prod.*, 64, 466, (2001).
- [43] Zarga, M. H. A., Hamed, E. M., Sabri, S. S., Voelter, W. and Zeller, K. P., *J. Nat. Prod.* 61, 798, (1998).
- [44] Sanz, J. F, Ferrando, C. and Marco, J. A., *Phytochemistry*, 30, 3653, (1991).
- [45] Yang, C., Wang, C.-M. and Jia, Z.-J., *Planta Med.* 69, 662, (2003).
- [46] Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H. and Konoshima, T., *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1370, (2002).
- [47] Oksuz, S., Topcu, G., Krawiec, M. and Watson, W. H., *Phytochemistry*, 46, 1131, (1997).
- [48] Vajs, V., Nevescanin, M., Macura, S., Juranic, N., Menkovic, N. and Milosavijevic, S., *Fitoterapia*, 74, 508, (2003)
- [49] Fu, B., Su, B. N., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M. , Takeda, Y. et. al. *Phytochemistry* 58, 1121, (2001).
- [50] Jeske, F., Huneck, S. and Jakupovic, J., *Phytochemistry*, 41, 1539, (1996)
- [51] Jeske, F., Huneck, S. and Jakupovic, J., *Phytochemistry*, 34, 1647, (1993)
- [52] Su, B.-N., Takaishi, Y., Yabuuchi, T., Kusumi, T., Tori, M. And Takaoka, S., *Tetrahedron Lett.*, 41, 2395, (2000).
- [53] Maoz, M., Kashman and Y., Neeman, I., *Planta Med.*, 65, 281, (1999).
- [54] B.-N. Zhou, N. S. Bai, L. Zelin, and G. A. Cordell, *Phytochemistry*, 36, 721, (1994).
- [55] E. Harvala, N. Aligiannis, A. L. Skaltsounis, H. Pratsinis, G. Lambrinidis, C. Harvala et al., *J. Nat. Prod.*, 65, 1045, (2002).

- [56] A. A. Ahmed, A. El-Hamd, H. Mohamed, O. Tzakou, A. Petropoulou, M. E. Hassan, et al., *Phytochemistry*, 62, 1191, (2003).
- [57] G. Topcu, S. Oksuz, and W. Herz, J. G. DSaz, *Phytochemistry*, 40, 1 71, (1995).
- [58] S. Ma´n~ ez, M. C. Recio, I. Gil, C. Go´mez, R. M. Giner, P. G. Waterman, J. L. RSos, *J. Nat. Prod.*, 62, 601, (1999).
- [59] B.-N. Su, Y. Takaishi, T. Yabuuchi, T. Kusumi, M. Tori, and S. Takaoka, *Tetrahedron Lett.* 41, 1475, (2000).
- [60] B.-N. Su, Y. Takaishi, M. Tori, S. Takaoka, G. Honda, M. Itoch, Y. Takeda, O. K. Kodzhimatov and O. Ashurmetov, *Org. Lett.*, 2, 493, (2000).
- [61] Y. Shao, N.-S. Bal, B.-N. Zhou, *Phytochemistry*, 42, 783, (1996).
- [62] E. J. Park, Y. Kim and J. Kim, *J. Nat. Prod.* 63, 34, (2000).
- [63] Zhou, B.N., Bai, N.S., Lin, L.Z. and Cordell, G.A. Sesquiterpene lactones from *Inula britannica*. *Phytochemistry* 34, 249–252, (1993).
- [64] PARK, E.J., KIM, Y. and KIM, J. “Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*”, *J. Nat. Prod.* 63, 34–36, (2000).
- [65] Bai, N.S., Zhou, B.N., Zhang, L., Sang, S.M., He, K. and Zheng, Q.Y., “Three new sesquiterpene lactones from *Inula britannica*”, In *Oriental Foods and Herbs* (C.-T. Ho, J.K. Lin and Q.Y. Zheng, eds.) 271–278, ACS Symposium Series 859, American Chemical Society, Washington, DC, (2003).
- [66] Stojakowska , A., Kedzia B. and Kisiel, W., “Antimicrobial activity of 10-isobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate”, *Fitoterapia*, 76, 687– 690, (2005).
- [67] Rhee, J.K., Baek, B.I.C. and Ahn, B.Z., “Structural investigation on the effects of the herbs on *Clonorchis sinensis* in rabbits”, *Am. J. Chin. Med.*, 13:1-4, 119-125, (1985).

- [68] Newall, C.A., “*Herbal Medicinals*”, London, The Pharmaceutical Press, 106-107, (1996).
- [69] Mabey, R., “*The New Herbalist*”, New York, Collier Books Macmillan Publishing Company, 48, 51, 276, (1988).
- [70] Huo, Y., Shi, H., Li, W., Wang, M., and Li, X., “HPLC determination and NMR structural elucidation of sesquiterpene lactones in *Inula helenium*” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 942–946, (2010).
- [71] Wichtl, M., “Teedrogen”, Stuttgart, Wissenschaftliche verlagsgesellschaft mbH, 37-39, (1984).
- [72] Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H. and Konoshima, T., *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1370, (2002).
- [73] Stojakowska, A., Kedzia, B. and Kisiel, W., *Fitoterapia*, 76, 687 (2005).
- [74] Sauer, E., Zeybek, N., Zeybek, U. ve Saygıner, B., *İletim Demetli Bitkilerin Tayin Anahtarı*, Bornova, İzmir, VSB, 175, 179-182, (1996).
- [75] Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, V. Band, Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag, 246-252, (1976).
- [76] Ody, P., “*The Complete Medicinal Herbal*”, New York, Dorling Kindersley Limited, 70, 138-139, (1993).
- [77] Khan, A.L.; Gilani, S.A.; Fujii, Y. And Watanabe K.N., “*Monograph on Inula britannica L.*”; Mimatsu Corporation: Tokyo, Japan, 21, (2008).
- [78] Je, K.H.; Han, A.; Lee, H.T.; Mar, W. and Seo, E.K., “The inhibitory principle of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production from *Inula britannica* var. *chinensis*.” *Arch. Pharm. Res.* 27, 83–85, (2004).
- [79] Tanker, M. ve Tanker, N., “*Farmakognazi*”, Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 65, 2, Ankara, s. 269, (1990).

- [80] Lauro, L. and Rolih, C., ‘Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait.’ *Boll-Soc-Ital-Biol-Sper.*, 66,9, 829-834, (1990).
- [81] Miltitzer Berichte über etherische öle, Reichstoffe USW, ausgabe, 27, (1970).
- [82] Miltitzer Berichte über etherische öle, Reichstoffe USW, ausgabe, 29, (1970).
- [83] Riebau, F. M., Berger B. ve Yeğen, O., ‘Chemical composition and fungitoxic properties to Phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey’ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2262-2266, (1995).
- [84] Song, Q.-H., Kobayashi, T., Iijima, K., Hong, T. and Cyong, J. C., *Phytother. Res.* 14, 180, (2000).
- [85] S. Saygi, B. Konuklugil, O. Kutsal, I., T. Uzbay, G. Deniz ve Z. Gören, *Phytother. Res.*, 17, 683, (2003).
- [86] Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J. and Palevitch, D., ‘Plants used for the treatment of diabetes in Israel’, *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 145-151, (1987).
- [87] Schnaubelt, K., ‘*Neue Aromatherapie*’, Pütz, J, Köln, Vgs, ., 39, 43, 67, 74, 87, 131, 135, 145, (1996).
- [88] Fazly Bazzaz, B.S. and Haririzadeh, G., “Screening of Iranian Plants for Antimicrobial Activity”, *Pharmaceutical Biology*, 41, (8), 573–583, (2003).
- [89] Tosun, F., Akyuz Kızılay, C., Sener, B. ve Vural, M., “The Evaluation of Plants from Turkey for in Vitro Antimycobacterial Activity”, *Pharmaceutical Biology*, 43, (1), 58–63, (2005).
- [90] Waldvogel FA., “*Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)*” Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice of Infectious Diseases, New York: Churchill Livingstone; 2, 2069-2092, (2000).

- [91] Cengiz A.T. ve Ustacelebi Ş., “*Staphylococcus*”, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Guneş Kitabevi, Ankara; 339-346, (1999).
- [92] Waldvogel F.A., “*Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)*” Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet’ s Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone; 2, 2069-2092, (2000).
- [93] Unat E,K., “*Gram Pozitif Koklar*”, Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi., Dergah Yayınları, İstanbul; 2. Baskı, 429-484, (1986).
- [94] Erdem B. ve Ustacelebi, Ş., “*Enterobacteriaceae*”, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Guneş Kitabevi, 1. Baskı, 471-515, (1999).
- [95] Bilgehan H., “*Klebsiella*” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, Klinik mikrobiyoloji- Ozel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları,, 10. Baskı, 59-68, (2000).
- [96] Toreci K, Topcu, A., Soyletir, G., Doğanay, M., “*Klebsiella türleri*” İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapcevleri, 1575-1608, (2002).
- [97] Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M., “*İnfeksiyon Hastalığı Etkeni Bakteriler*”, Tıbbi Mikrobiyoloji, Nobel Tıp kitapcevleri, 221-350, (2002).
- [98] Toreci K., Topcu, A., Soyletir, vG., Doğanay, “*Escherichia türleri*” infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapcevleri, cilt 2,: 1564-1574, (2002).
- [99] Bilgehan H., “*Escherichia*” Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, klinik mikrobiyoloji- Ozel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. Baskı, 3-17, (2000).
- [100] Vahaboğlu H. ve Akhan S.C., “*Pseudomonas aeruginosa ve Diğer Pseudomonas türleri*”, Nobel Tıp Kitapevleri,1608- 1616, (2002).

- [101] Erdem B., "Pseudomonaslar" Prof. Dr. Şemsettin Ustacelebi, "*Temel ve Klinik mikrobiyoloji*", Guneş Kitabevi, 1. Baskı, 551-558, (1999).
- [102] Bilgehan H., "*Klinik Mikrobiyoloji*", Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 70-75, (1996).
- [103] Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M, Schreckenberger P.C.and Winn W.C. "*Jr: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*", Lippincott, Philadelphia, 4, 171-252, (1997).
- [104] Granum, P.E., Lund, T., "*Bacillus cereus and its food poisoning toxins*", FEMS Mic. Letters 157, 223-228, (1997).
- [105] Hasenekoglu, M., "*Toprak Mikrofungusları, 1*", Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 309-310, (1991).
- [106] Hasenekoglu, M., "*Toprak Mikrofungusları, 1*", Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 325-326, (1991).
- [107] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., "*Introduction to food- and airborne fungi*", Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, ISBN 90-7031-42-0, 72, (2002).
- [108] Hasenekoglu, M., "*Toprak Mikrofungusları, 1*", Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, 295-296, (1991).
- [109] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., "*Introduction to food- and airborne fungi*", Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht, ISBN 90-7031-42-0, 142, (2002).
- [110] Gedikoglu, S., "Mycobacterium tuberculosis'in hücre yapısı", *İnfeksiyon Derg.*, 11, 13-18, (1998).
- [111] Kocagöz, T., "*Mikobakteri genetiği araştırmalarının, hastalık biyolojisi, tanı ve tedavine getirmekte olduğu önemli gelişmeler*," 2. Ulusal Mikobakteri Sempozyum Kitabı, Ankara, 20-25, (1998).

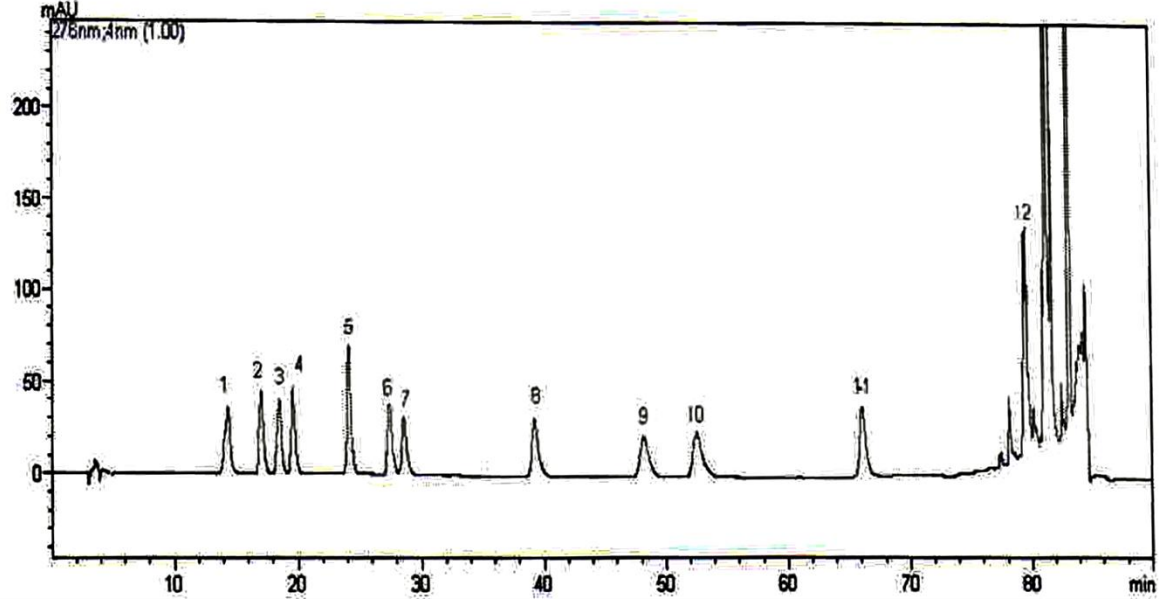
- [112] Mcfadden, J. and Stoker, N., “*Mycobacteria, Ed: MEYERS, R.A.: Molecular Biology and Biotechnology : a comprehensive desk reference*”, VCH Publishers, New York, 582-585, (1995).
- [113] Mchugh, T.T., Newport, L.E. and Gillespie, S.H., “IS6110 Homologs are present in multiply copies in Mycobacteria other than tuberculosis-causing Mycobacteria”, *J Clin Microbiol.*, 35, 1769-1771,(1997).
- [114] Bilgehan. H. “*Klinik Mikrobiyolojik Tanı*”. Barış Yayınları, İzmir, 525-531, (1992).
- [115] Kent, P.T. and Kubica, G.P., “*Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*”, USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta, (1985).
- [116] Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas M.N., “Amphotericin B: side effects and toxicity.”, *Rev Iberoam Micol.*, 26, 223-7, (2009).
- [117] Walsh T.J., Anaissie E.J., Denning D.W., et al. “Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases”, *Society of America. Clin Infect Dis.* 46, 327-60, (2008).
- [118] 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).
- [119] 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).
- [120] Becton, Dickinson and Company Newsletter, “BD Bactec MGIT 960 SIRE kit now FDA-cleared for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*” *LAB O Microbiology News & ideas* ,13, 4-4, (2002).
- [121] Milardovic, S., Ivekovic, D. and Grabaric, B. S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, 68 , 175 – 180, (2006).

- [122] Tunalier, Z., Öztürk ,N., Koçar ,M.,Hüsnü, K. Başer, C., Duman, H., vd., “Bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve Fenolik bileşikler yönünden incelenmesi”, ISBN,975-94077-2-8.
- [123] 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*, 10, 3, 178-182, (2002).
- [124] Askun, T., Tumen, G., & Satil, F. A. “Characterization of the phenolic composition of five plant methanol extracts and their antimicrobial activities.” *Pharmaceutical Biology*, 46(10–11), 688–694. (2008).
- [125] Oskay, M., Sarı, D., “Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants”, *Pharmaceutical Biology*, 45, 3, 176-181, (2007).
- [126] Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A. and Abo-Zaid, M.A., “Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds”, *Microbios*, 93, 374, 43-54, (1998).
- [127] Fukumoto, L. R. and Mazza, G., “Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds”, *J. Agric. Food Chem*, 48, 3597-3604, (2000).
- [128] Disilvestro, R.A., “Flavonoids as Antioxidants. In: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods”, *CRC Press*, ISBN: 0 8493 8734 5, USA, 127-138, (2001).
- [129] Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E., “Intoducing Natural Antioxidants. In Antioxidants in food” *CRC Press*, ISBN 1 85573 463, USA, (2001).
- [130] El Kalamouni, C., Raynaud, C. and Talou, T., “Screening of antioxidant and antimicrobial activities of Midi-Pyrenees aromatic plants”, *Cheminè Technologija*, 3 (52), (2009).
- [131] Dulger, B., Ceylan, M., Alitsaous, M. ve Uğurlu, E., “*Artemisia absinthium* L. (Pelin)’un Antimikrobiale Aktivitesi” , *Tr. J. Biology*, 23, 377-384, (1999).

EKLER

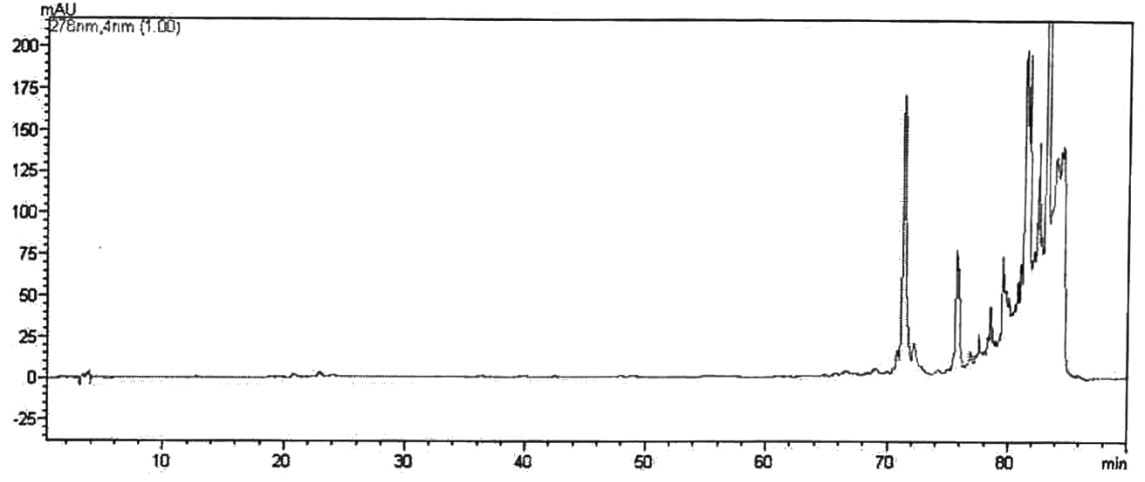
6. EKLER

EK A

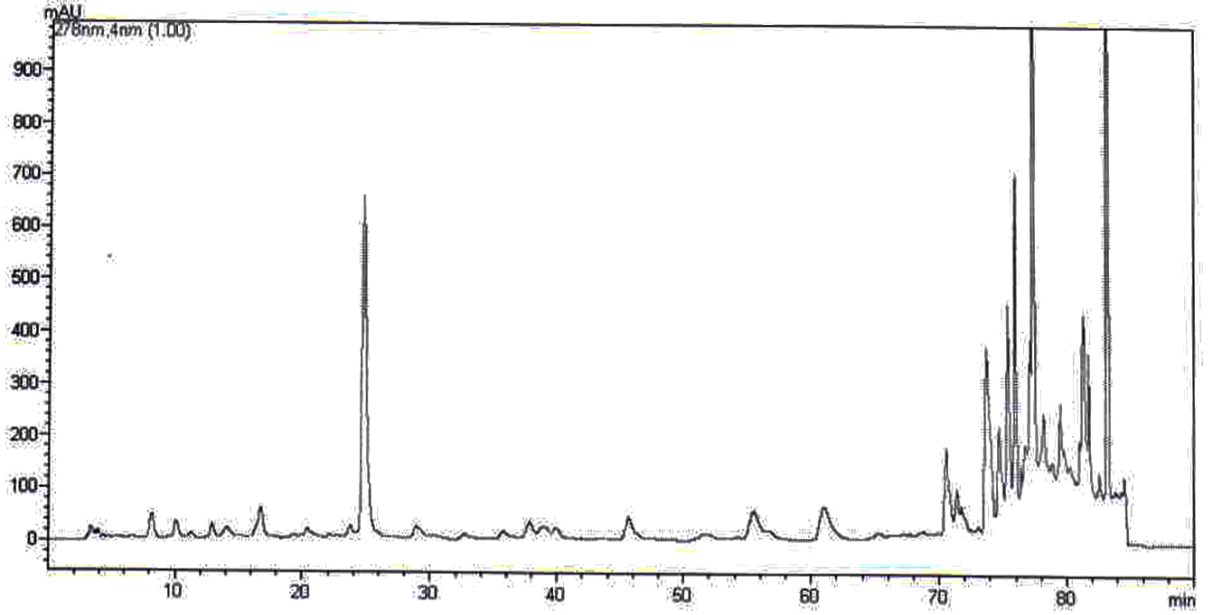


Şekil A.1: HPLC standart kromotogramı

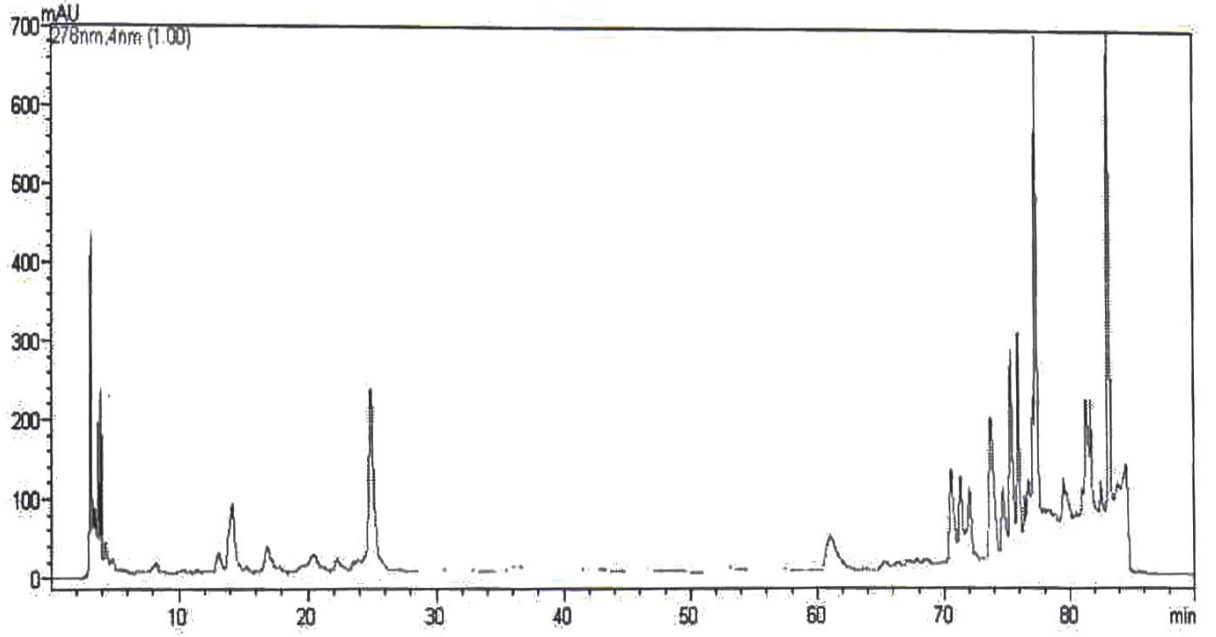
Standartlar: 1; chlorogenic acid, 2; caffeic acid, 3; epicatechin, 4; syringic acid, 5; p-coumaric acid, 6; ferulic acid, 7; sinapinic acid, 8; o-coumaric acid, 9; hesperidin, 10; rosmarinic acid, 11; cinnamic acid, 12; karvakrol



Şekil A.2: *Inula peacockiana* petrol eteri ekstresi HPLC Kromotogramı

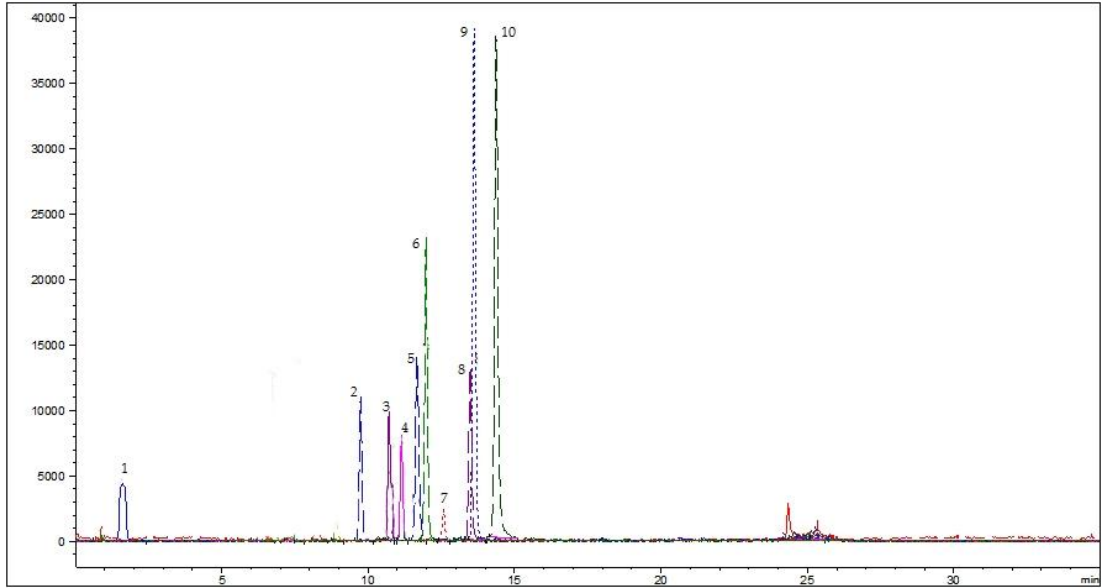


Şekil A.3: *Inula peacockiana* aseton ekstresi HPLC kromotogramı



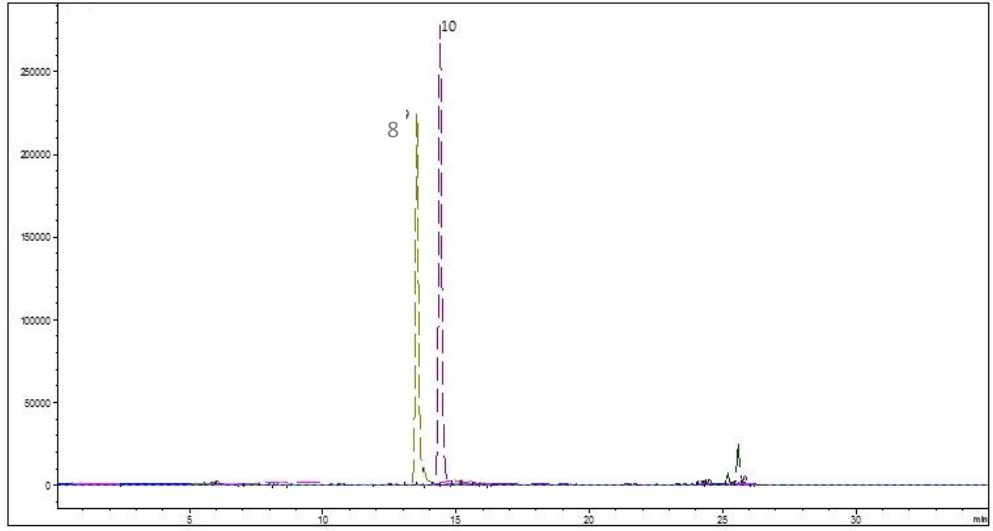
Şekil A.4: *Inula peacockiana* metanol ekstresi HPLC kromotogramı

EK B

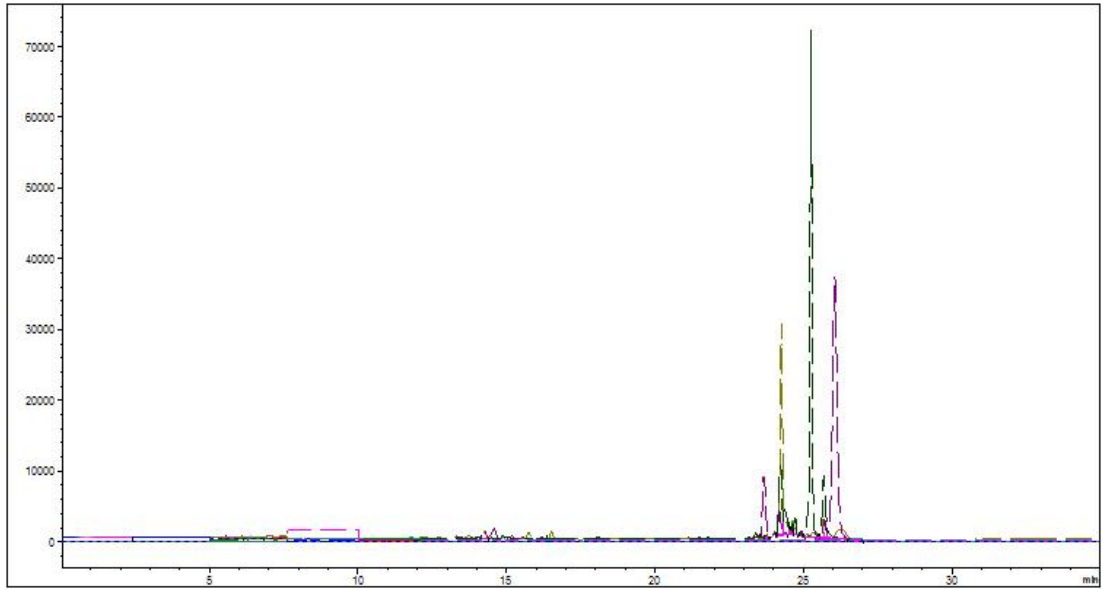


Şekil B.1: LC-MS standart kromotogramı

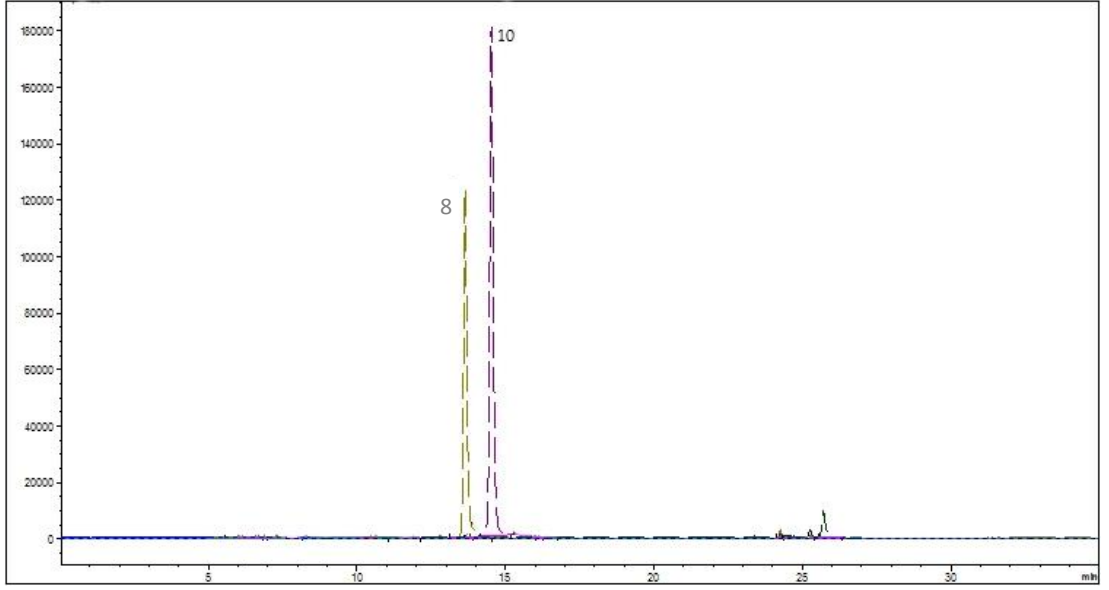
Standartlar: 1, Gallic acid (R.T. 1,6); 2, Vitexin (R.T. 9,72); 3, Naringin (R.T. 10,69); 4, Rutin Hidrat (R.T. 10,76); 5, Apigenin 7 glukozide (R.T. 11,65); 6, Oleupein (R.T. 11,96); 7, Trans-cinnamic acid (R.T. 12,57), 8, Quercetin (R.T. 13,47); 9, Naringenin (R.T. 13,613); 10 Luteolin (R.T. 14,36) (R.T.=Retantion time)



Şekil B.2: *Inula peacockiana* aseton ekstresi LC-MS kromotogramı



Şekil B.3: *Inula peacockiana* petrol eteri ekstresi LC-MS kromotogramı



Şekil B.4: *Inula peacockiana* metanol ekstresi LC-MS kromotogramı