





**T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ACHILLEA MARITIMA* (L.) EHREND. VE  
Y.P.GUO (ASTERACEAE) BİTKİSİNDEN  
ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN  
ANTİOKSİDAN, SİTOTOKSİK VE  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**SELÇUK BİLGİ**

**TEZ DANIŞMANI  
DR. ÖĞR. ÜYESİ AHMET BEYATLI**

**FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI  
FARMAKOGNOZİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
EYLÜL/2022**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin planlanmasında, ilerlemesinde ve tezin her adımında tecrübe, bilgi ve zamanını paylaşan; tüm zor anlarda desteğini veren değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BEYATLI' ya,

Tez çalışmamın ve hayatımın tüm anlarında desteğini ve tecrübesini aktararak yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Saliha ŞAHİN' e,

Deneyimlerini paylaşarak ve laboratuvar ortamının kullanımını sağlayarak çalışmada önemli yeri olan değerli hocam Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ' a,

Mikrobiyoloji çalışmalarımıza verdiği destek, aktardığı bilgiler ve laboratuvarını kullanıma sunan Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU' na,

Toksisite çalışmalarında vermiş olduğu değerli katkılarından ötürü Dr. Öğr. Üyesi Aydın TAHMASEBİFAR' a

Laboratuvar çalışmalarında desteğini hiç eksik etmeyen Arş. Gör. Duygu MISIRLI' ya,

Tüm hayatım boyunca bana her türlü konuda destek olan aileme,  
Sevgi, teşekkür ve saygılarımı iletiyorum.

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminin 2021/044 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                               |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR.....                                                                                 | iv   |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                             | v    |
| TABLolar LİSTESİ.....                                                                         | vii  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                                                        | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                 | x    |
| ÖZET .....                                                                                    | xi   |
| ABSTRACT.....                                                                                 | xiii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                        | 3    |
| 2.1. BOTANİK BİLGİLER.....                                                                    | 3    |
| 2.1.1. Papatyagiller (Asteraceae) Familyasının Botanik Özellikleri .....                      | 3    |
| 2.1.2. <i>Achillea</i> L. Cinsinin Botanik Özellikleri .....                                  | 4    |
| 2.1.3. <i>Achillea maritima</i> (L.) Ehrend. ve Y. P. Guo Türüne Ait Botanik Özellikler ..... | 4    |
| 2.1.4. Bitkinin Sistematikteki Yeri .....                                                     | 5    |
| 2.1.5. Bitkinin Sinonimleri .....                                                             | 5    |
| 2.2. <i>ACHILLEA</i> L. TÜRLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR .....                              | 6    |
| 2.2.1. Etnobotanik Çalışmalar .....                                                           | 6    |
| 2.2.2. Fitokimyasal Çalışmalar .....                                                          | 7    |
| 2.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....                                                   | 8    |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                       | 12   |
| 3.1. GEREÇ.....                                                                               | 12   |
| 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler .....                                                     | 12   |
| 3.1.2. Bitkinin Toplanması ve Teşhisi.....                                                    | 12   |
| 3.2. YÖNTEM.....                                                                              | 13   |
| 3.2.1. Ekstrakt Hazırlanması .....                                                            | 13   |
| 3.2.3. Antioksidan Aktivite .....                                                             | 14   |
| 3.2.4. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Miktar Tayini.....                                       | 15   |
| 3.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....                                                    | 16   |
| 3.2.6. MTT Sitotoksikite Testi.....                                                           | 16   |
| 3.2.7. Brine Shrimp Toksikite Testi.....                                                      | 17   |
| 4. BULGULAR.....                                                                              | 18   |
| 4.1. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI.....                                                      | 18   |

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi .....   | 18 |
| 4.1.2. ABTS Yöntemi .....                             | 20 |
| 4.1.3. FRAP Yöntemi .....                             | 21 |
| 4.2. FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ..... | 22 |
| 4.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE SONUÇLARI .....          | 28 |
| 4.4. MTT SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI .....                | 28 |
| 4.5. BRİNE SHRİMP TOKSİSİTE SONUÇLARI.....            | 29 |
| 5. TARTIŞMA .....                                     | 30 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....                          | 34 |
| KAYNAKLAR .....                                       | 35 |



## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tablo 2.1:</b> <i>A. maritima</i> sınıflandırması.....                                                               | 5   |
| <b>Tablo 3.1:</b> HPLC-DAD gradient hareketli faz programı .....                                                        | 155 |
| <b>Tablo 4.1:</b> <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının DPPH yöntemindeki antioksidan aktiviteleri ..... | 19  |
| <b>Tablo 4.2:</b> <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının ABTS yöntemindeki antioksidan aktiviteleri ..... | 20  |
| <b>Tablo 4.3:</b> <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının FRAP yöntemindeki antioksidan aktiviteleri ..... | 212 |
| <b>Tablo 4.4:</b> Standart fenolik bileşiklerin validasyon parametreleri .....                                          | 233 |
| <b>Tablo 4.5:</b> <i>A. maritima</i> ekstraktlarındaki fenolik madde miktarları (mg/g ekstrakt).....                    | 277 |
| <b>Tablo 4.6:</b> <i>A. maritima</i> ekstraktlarının farklı suşlara karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) .....  | 288 |
| <b>Tablo 4.7:</b> <i>A. maritima</i> ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi (İK <sub>50</sub> ).....                     | 288 |
| <b>Tablo 4.8:</b> Brine shrimp toksisite sonuçları .....                                                                | 29  |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 2.1: <i>Achillea maritima</i> (L.) Ehrend. ve Y. P. Guo biyocoğrafik yayılışı (15) .....                                                                                                                                                                  | 5   |
| Şekil 3.1: <i>A. maritima</i> doğal ortamında.....                                                                                                                                                                                                              | 13  |
| Şekil 4.1: DPPH yöntemi için kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                                           | 18  |
| Şekil 4.2: <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının DPPH yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması .....                                                                                                                                    | 19  |
| Şekil 4.3: ABTS yöntemi için kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                                           | 20  |
| Şekil 4.4: <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının ABTS yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması .....                                                                                                                                    | 211 |
| Şekil 4.5: FRAP yöntemi için kalibrasyon grafiği.....                                                                                                                                                                                                           | 21  |
| Şekil 4.6: <i>A. maritima</i> bitkisinin farklı ekstraktlarının FRAP yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması .....                                                                                                                                    | 222 |
| Şekil 4.7: Etanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 2: rutin, 3: p-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 6: resveratrol, 7: luteolin, 8: apigenin, 9: kamferol).....                                                             | 244 |
| Şekil 4.8: Hekzan ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: p-kumarik asit, 4: ferulik asit, 8: apigenin).....                                                                                                                                                     | 244 |
| Şekil 4.9: Kloroform ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: p-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 7: luteolin, 9: kamferol, 10: protokatekuik asit, 11: epigallokateşin gallat, 12: epikateşin gallat, 13: naringenin, 14: klorojenik asit)..... | 255 |
| Şekil 4.10: Etil asetat ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 3: p-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 6: resveratrol, 13: naringenin, 14: klorojenik asit, 15: kamferol glikozit) .....                                           | 255 |
| Şekil 4.11: Butanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: p-kumarik asit, 4: ferulik asit, 14: klorojenik asit) .....                                                                                                                                          | 266 |

**Şekil 4.12:** Su fazının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 2: rutin, 3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 6: resveratrol, 10: protokatekuik asit, 14: klorojenik asit, 16: vanilik asit).....266





## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                         |                                                          |
|-------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>ABTS</b>             | : 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)   |
| <b>BST</b>              | : Brine Shrimp toksisite testi                           |
| <b><i>B. cereus</i></b> | : <i>Basillus cereus</i>                                 |
| <b>CUPRAC</b>           | : Bakır (II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite |
| <b>DPPH</b>             | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                           |
| <b><i>E. coli</i></b>   | : <i>Escherichia coli</i>                                |
| <b>FRAP</b>             | : Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç                |
| <b>GAE</b>              | : Gallik asit eşdeğeri                                   |
| <b>GC</b>               | : Gaz kromatografisi                                     |
| <b>GC/MS</b>            | : Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi                |
| <b>GI50</b>             | : Hücre proliferasyonunun maksimum inhibisyonunun %50'si |

için gerekli konsantrasyon

|                    |                                                                |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>HPLC-DAD</b>    | : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi                      |
| <b>ICP-MS</b>      | : İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi                |
| <b>İK50</b>        | : Hücrelerin %50'sinin büyümesini inhibe eden konsantrasyon    |
| <b>LC-ES/MS</b>    | : Sıvı kromatografisi-elektrosprey/kütle spektrometresi        |
| <b>LC-ES/MS/MS</b> | : Sıvı kromatografisi-elektrosprey/tandem kütle spektrometresi |
| <b>LC/MS</b>       | : Sıvı kromatografisi/kütle spektrometresi                     |
| <b>LC50</b>        | : Hava veya suda canlıların %50' sini öldüren konsantrasyon    |
| <b>mAU</b>         | : Mili absorbans birimi                                        |
| <b>MİK</b>         | : Minimum inhibisyon konsantrasyonu                            |
| <b>MTT</b>         | : 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür        |

**ACHILLEA MARITIMA (L.) EHREND. VE Y.P.GUO  
(ASTERACEAE) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN  
EKSTRAKTLARIN ANTİOKSİDAN, SİTOTOKSİK VE  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ÖZET**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı *Achillea maritima* (L.) Ehrend. ve Y.P. Guo bitkisinden elde edilen ekstrakt fraksiyonlarının (etanol, hekzan, kloroform, etil asetat, butanol, su fazı) biyolojik aktivitelerini (antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik) incelemek ve içerdiği bileşikler HPLC-DAD cihazı ile analiz etmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Ekstraktların antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleri kullanılarak tayin edilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteleri broth dilüsyon yöntemini kullanılarak MİK değerleri tespit edilmiştir. Sitotoksik aktivite MTT, toksik aktivite Brine shrimp yöntemiyle analiz edilmiştir. Ekstraktların içerdiği fenolik bileşikler HPLC-DAD cihazı ile kromatografik olarak tayin edilmiştir.

**Bulgular:** *A. maritima* bitkisinin antioksidan aktivite sonuçları (604,15±11,57 mg troloks eş değeri/g ekstrakt DPPH yöntemi, 347,65±8,98 mg troloks eş değeri/g ekstrakt ABTS yöntemi, 486,31±9,99 mg troloks eş değeri/g ekstrakt FRAP yöntemi) en fazla etil asetat ekstraktında bulunmuştur. Ayrıca fenolik madde tayininde de ferulik asit majör fenolik madde (47,97±0,07 mg/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Etanol ve kloroform fazları bakteri ve mayaya karşı 2500 µg/mL, hekzan fazı ise *S. aureus*, *E. fecalis* ve *P. aeruginosa*'ya karşı sırasıyla 19, 39, 156 µg/mL MİK değerleri göstermiştir. Etil asetat fazı ise her bakteriye özgü etkili bulunmuştur. Butanol fazı Gram negatif çomak bakterilere karşı (MİK 625 µg/mL ve 39 µg/mL) Gram pozitiflere göre (MİK 1250 µg/mL) daha etkili bulunmuştur. Su fazı ise tüm suşlara karşı stabil bir MİK (625 µg/mL) değerine sahip olmuştur. MTT testinde ekstraktların K562 ve Saos hücre hatlarında farklı seviyede sitotoksikite gösterdiği (240-820 µg/mL), ekstraktların çoğu NIH-3T3 hücresi üzerinde toksik olmadığı görülmüştür. *A. maritima* bitkisinin sitotoksik açıdan en fazla hücre canlılığı etil asetat, butanol ve su fazı ekstraktlarında bulunmuştur.

**Sonuç:** *A. maritima* bitkisinin farklı çözücü ekstraktlarının antioksidan aktivite sonuçlarında etil asetat ekstraktı en yüksek bulunmuştur. Fenolik madde içeriği de değeri olan bir bitkidir. Ayrıca, kullanılan ekstraktların farklı fazları seçilen mikroorganizma ve hücre hatlarına karşı etkili olmuştur. Bulunan sonuçla gelecekte *A. maritima* yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** *Achillea maritima*, Biyoaktivite, Antioksidan, Antimikrobiyal, Sitotoksisite, HPLC



**STUDY OF ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND  
ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS OBTAINED  
FROM *ACHILLEA MARITIMA* (L.) EHREND. VE Y.P.GUO  
(ASTERACEAE)**

**ABSTRACT**

**Aim:** The aim of this study is to examine the biological activities (antioxidant, antimicrobial, cytotoxic) of the extract fractions (ethanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, remaining water phase) obtained from *Achillea maritima* (L.) Ehrend. and Y.P. Guo and to analyze the compounds contained in it with HPLC-DAD.

**Materials and Methods:** The antioxidant activities of the extracts were determined using DPPH, ABTS and FRAP methods. Antimicrobial activities were analyzed by determination of MIC values by using the broth dilution method. Cytotoxic activity was analyzed by MTT, toxic activity by Brine shrimp method. The phenolic compounds contained in the extracts were determined chromatographically by HPLC-DAD.

**Results:** Antioxidant activity results of *A. maritima* (604.15±11.57 mg trolox equivalent/ g extract for DPPH method, 347.65±8.98 mg trolox equivalent/g extract for ABTS method, 486.31±9.99 mg trolox equivalent / g extract for FRAP method) were found in ethyl acetate extract the most. In addition, in the determination of phenolic acid, ferulic acid was determined as the major phenolic substance (47.97±0.07 mg/g extract). The ethanol and chloroform phases showed MIC values of 2500 µg/mL against bacteria and yeast, and the hexane phase showed MIC values of 19, 39, 156 µg/mL against *S. aureus*, *E. fecalis* and *P. aeruginosa*, respectively. Ethyl acetate phase, has a various activity against each bacteria. Butanol phase was found to be more effective against Gram-negative (MIC 625 µg/mL and 39 µg/mL) than Gram-positive ones (MIC 1250 µg/mL). The water phase had a stable MIC (625 µg/mL) against all strains. In the MTT test, the extracts showed different levels of cytotoxicity (240-820 µg/mL) in K562 and Saos cell lines, while the extracts were

non-toxic against NIH-3T3 cells. The highest cytotoxic cell viability of *A. maritima* was found in ethyl acetate, butanol and water phase extracts.

**Conclusion:** Ethyl acetate extract was found to be the highest in antioxidant activity results of different solvent extracts of *A. maritima* plant. In addition, its phenolic content is a valuable plant. In addition, different phases of the extracts used were effective against the selected microorganism and cell lines. The result will be a guide for future studies on *A. maritima*.

**Key Words:** *Achillea maritima*, Bioactivity, Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity, HPLC

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tarih öncesi çağdan bu yana, on dokuzuncu yüzyılda sentetik ilaçlar geliştirilinceye kadar bitkiler neredeyse tüm tıbbi tedavilerin temeli olmuştur (1). Geleneksel kullanımlarının yanı sıra modern yöntemlerde de etkili şekilde kullanılmaktadırlar. Konuyla ilgili araştırmalar doğal ürünlerin ilaç olarak kullanım potansiyelini gözler önüne sermiştir (2). Birçok insan dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde halen modern tıptan daha etkili olduğuna inandıkları bitki temelli halk tıbbını kullanmaktadır. Aromatik bitkiler veya şifalı otlar artık birçok ülkede popüler ve yaygın hale gelmiştir çünkü farklı hastalıkların tedavisi için daha az yan etkiye sahip, maliyeti uygun, tıbbi olarak daha etkili ve minimum düzeyde hastalık direncine sahip seçici aktif bileşiklerin izlenmesine ihtiyaç vardır. Ancak tıbbi bitkilerin ve baharatların tüketim miktarları düşünüldüğünde aktif bileşenlerini ve etki mekanizmalarını anlamak ve araştırmak konuları oldukça sınırlı seviyede kalmaktadır (3).

Araştırmacılar uzun yıllardır bakteri, mantar, virüs ve parazitlerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklara karşı yeni geniş spektrumlu antibiyotikler geliştirmeye çalışmaktadırlar. Bu geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı, ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sentetik maddelere dayalı antibiyotik keşif yöntemleri, direncin temeline ayak uyduramamaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek için yeni stratejiler oldukça önemlidir. Bitki sekonder metabolitleri (fitokimyasallar), tek başına kullanıldıklarında antimikrobiyal olarak ve diğer antimikrobiyal maddelerin sinerjistleri veya güçlendiricileri olarak potansiyellerini zaten göstermiştir. Bitki ekstraktlarının onaylanmış yöntemlerle taranması, bulaşıcı hastalıklara karşı potansiyel olarak faydalı moleküllerin tanımlanması açısından birincil bir keşif kaynağıdır (4,5).

Son yıllarda bitkilerde bulunan antioksidanların insan sağlığının korunmasında rol oynaması nedeniyle bitki kaynaklı besinlerin ve tıbbi bitkilerin antioksidan özelliklerine olan ilgi artmıştır. Ayrıca, antioksidan özelliklere sahip bitki özleri, sentetik antioksidanlara “doğal” bir alternatif olarak kabul edildikleri için gıda endüstrisi için giderek daha çekici hale gelmiştir. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan geleneksel tıbbi bitkilerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi, yeni doğal antioksidan kaynaklarının arayışında önemli bir husus olmuştur (6).

Papatyagiller (Asteraceae) familyası çiçekli bitkilerin en geniş yayılış gösteren familyası olup, dünya üzerinde yaklaşık 23.000 türü bünyesinde barındırmaktadır. Türkiye florasının büyük bir kısmı bu familyanın bitkilerinden oluşmaktadır (7). Bu familya cinslerinden *Achillea* mitolojik bir geçmişe sahiptir. Cinsin adı, Truva kahramanı Achilles tarafından yara iyileştirici bir çare olarak eski kullanımından gelmektedir (8).

*Achillea* L., Avrasya üzerinden Kuzey Amerika'ya uzanan uzantıları ile Güney Batı Asya ve Güney Doğu Avrupa merkezli 110-140 türle dünyada temsil edilmektedir. Bu cinsin ana habitatları İran, Türkiye, Sırbistan ve Avrupa'nın doğu bölgelerinin farklı bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Cins Türkiye'de 24'ü endemik olmak üzere 54 taksona ait 48 tür ile temsil edilmektedir (9).

Bu yüksek lisans çalışmasında *Achillea maritima* (L.) Ehrend ve Y.P. Guo bitkisinin toprak üstü kısımlarının muhtelif çözücülerle hazırlanan ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen ekstraktlarda bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD cihazı ile tayin edilmiştir. Ayrıca, ekstraktların Brine Shrimp yöntemiyle toksik etkisi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile *Achillea maritima* (L.) Ehrend ve Y.P. Guo bitkisinin ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. BOTANİK BİLGİLER

#### 2.1.1. Papatyagiller (Asteraceae) Familyasının Botanik Özellikleri

Asteraceae tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık otsu ya da bazen çalı, nadiren küçük ya da orta büyüklükte ağaç şeklinde, tüysüz ya da çoğu zaman çeşitli şekillerde salgılı ya da salgısız tüylü bitkilerdir. Dokular latisferli ya da latisfersizdir. Yapraklar alternat ya da bazen karşılıklı, nadiren dairesel, stipulasız (nadiren stipulalı), basit ve tamdır. Çiçekleri birçok sık baş şeklinde olup, birçok sayıda sapsız çiçeklerin çiçek tablası üzerine dizilip, hemen hemen her zaman birkaç sıralı fillariden (involukral brakte) oluşan koruyucu bir involukrum tarafından çevrilen kapitulum şeklinde kümelenmiştir. Kapitulum bazen ikincil bir kapitulum benzeri baş şeklinde kümelenmiştir (yalancı baş). Reseptakulum çıplak ya da palealı, uzun tüylü ya da kılçıklıdır. Çiçekler epigin, sinpetal, tam ya da bazıları dişi ya da nötr ya da işlev bakımından erkektir. Kaliks ovaryumun ucunda papus denilen tüyler, kıllar, pullar ya da kılçıklar ya da devamlı korona (taç) ile temsil edilmektedir ve bazen papus tamamen yoktur. Korolla tüp şeklinde (huni şeklinde ya da tabanda silindirik, üste doğru çan şeklinde), filiform, dilsel ya da nadiren iki dudaklı, genellikle 3 ya da 5 dişlidir. Stamenler, filamentler korolla tüpüne bağlı, anterler kenarlarından birleşerek stilusu silindir şeklinde sarar (singenezis), nadiren serbest; iç yüzeylerinden açılmaktadır. Ovaryum alt durumlu, tek gözlü, tabanda bir adet anatrop ovüllü; stilus genellikle yukarı doğru 2 kola bölünmüş, çoğu zaman disk çiçeklerin stiluları anterlerdeki poleni yakalayacak şekilde fırça tüylüdür. Meyve, genellikle kalıcı ya da düşücü papuslu, papus sapsız ya da gaga benzeri bir uzantının (rostrum) ucundan çıkar. Kapitulumlar ya homogam ya da heterogamdır. Bazen kapitulumlar tek eşeylidir. Bu durumda, bir kapitulumda yalnız dişi (pistillat) ya da erkek çiçek (staminat) bulunur (7,10).

Asteraceae familyasına ait türler Dünya üzerinde birçok noktada yayılış göstermektedir. Asteraceae familyası 23.000'den fazla türü kapsayan yaklaşık 1600



cins altında sınıflandırılmış çok sayıda çiçekli bitki içerir. Türkiye’de ise Asteraceae 136 cins ve 1345 tür ile temsil edilmektedir. Veriler bu familyayı hem tür hem de cins bakımından floramızın en zengin familyası olarak kılmaktadır (11). *Achillea* cinsi, bu ailenin en iyi bilinen cinslerinden biridir (12).

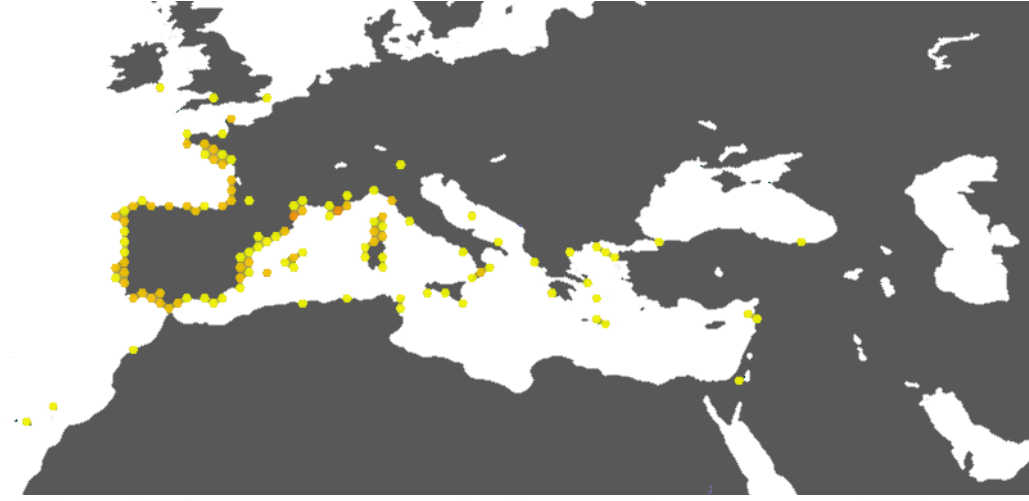
### 2.1.2. *Achillea* L. Cinsinin Botanik Özellikleri

Çok yıllık otsu ya da yarı çalimsı bitki, kalın ya da ince odunsu rizomlu olup, rizomlar bazen sürünücüdür. Gövde dik ya da yükselici, silindirik ya da köşeli, düz, boyuna çizgili ya da derin olukludur. Kapitulum heterogam, ışınsal, saplı ya da sapsız, küçük ya da orta büyüklükte, genellikle uç kısımda korimbus şeklinde düzenlenmiş, çok nadiren tek, bazen basit şemsiye şeklindedir. İnvolukrum oblong-silindirik, ovoid, yarı küremsi ya da genişçe yarı küremsidir. Fillariler 3-4 sıralı, dıştakiler içtekilere göre daha küçük, dar ya da genişçe şeffaf kenarlıdır. Çiçekler beyaz ya da sarı, bazen pembe; dilsli çiçekler dişi, tek bir daire halinde, laminanın uç kısmı loblu; tüpsü çiçekler hermafrodit, düzenli 5-dişli, korolla tüpü basık, tabanı akenin tepesini saran bir torba şeklindedir. Reseptakulum düz ya da konveks, palealı, palea lanseolat ya da oblong, zarsı, paleanın ucuna kadar uzamayan orta damarlıdır. Aken oblong, oblanseolat ya da oblong-obovat, tüysüz, lineolat, lineat ya da sukrobikulat, sırttan basık, kanatsız, ucu nispeten daha geniş, bazen kalın dudak şeklinde kanatlı, kahverengimsi-beyazdır. Yapısında papus bulunmaz (13).

*Achillea* türleri genelde ülkemizde civanperçemi adı ile anılmasına rağmen farklı bölgelerde akbaşı, barsam otu, binbiryaprak otu, marsama otu, kandil çiçeği ve baytaran adlarıyla da bilinmektedirler (13).

### 2.1.3. *Achillea maritima* (L.) Ehrend. ve Y. P. Guo Türüne Ait Botanik Özellikler

*A. maritima* (L.) Ehrend. ve Y. P. Guo 40-50 cm yüksekliğe ulaşabilen gür bir bitkidir. Rizomatöz ve büyük keçeli kümeler oluşturur. Saplar 15-25 cm yükselen yoğun yapraklıdır. Yapraklar dikdörtgen-mızrak şeklinde 10-20 x 3-7-5 mm, subakut apeks, sapsız, tabanda yarı geniş, kenarlar belli belirsiz tırtıklı yapıdadır. Çiçekler, birkaç saplı, küçük ve yarı küresel çiçek başlarından, oval-geniş beyaz pamuklu pullara sahiptir. Antesis Haziran ve Eylül ayları arasındadır (7,14). Şekil 2.1’ de görüldüğü gibi bu tür farklı bölgelerde yayılış göstermektedir.



**Şekil 2.1:** *Achillea maritima* (L.) Ehrend. ve Y. P. Guo biyocoğrafik yayılımı (15)

#### 2.1.4. Bitkinin Sistematikteki Yeri

*A. maritima* türünün sistematik sınıflandırması Tablo 2.1’de verilmiştir. (6).

**Tablo 2.1:** *A. maritima* sınıflandırması

|                |                         |
|----------------|-------------------------|
| <b>Alem</b>    | Plantae                 |
| <b>Bölüm</b>   | Magnoliophyta           |
| <b>Sınıf</b>   | Magnoliopsida           |
| <b>Takım</b>   | Asterales               |
| <b>Familya</b> | Asteraceae              |
| <b>Cins</b>    | <i>Achillea</i> (L.)    |
| <b>Tür</b>     | <i>A. maritima</i> (L.) |

#### 2.1.5. Bitkinin Sinonimleri

Bitkinin sinonimleri şu şekilde sıralanmıştır (16):

- *Dicoma candidissima* Desf.
- *Diotis maritima* (L.) Desf. ex Cass.

## 2.2. ACHILLEA L. TÜRLERİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.2.1. Etnobotanik Çalışmalar

*Achillea* cinsi Dünya genelinde büyük yayılıma sahip antik dönemlerden beri kullanılan tıbbi bitkilerdir. Bu cins türlerinin fitokimyasal çalışmaları barındırdıkları birçok bileşiğin büyük oranda biyoaktif olduğunu göstermiştir. *Achillea* türlerinin geneli tedavi edici etkilere sahiptir (17).

İsviçre Alplerinde yetişen bitkiler üzerine yapılan etnobotanik çalışmalarda *A. millefolium*'un endokrin sistem ve gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında etkili olduğu bildirilmiştir (18). İspanya'nın İber yarımadasında yapılan bir etnobotanik çalışmada *A. millefolium*'un boğaz ağrısında, sindirim bozukluklarında ve yaralarda kullanıldığı bildirilmiştir (19). Brezilya'da Atlantik ormanları bölgesinde yapılan bir etnobotanik çalışmada *A. millefolium*'un ateş, pnömoni, mide rahatsızlıkları ve gripte etkili olduğu; ayrıca antibiyotik ve sedatif olarak kullanıldığı kayıtlara geçmiştir (20).

Ülkemizde yapılan çalışmalara bakacak olursak *A. millefolium* L. subsp. *millefolium*, Adana Pozantı bölgesinde hazımsızlığa ve mide hastalıklarına iyi geldiği, sinir yatıştırıcı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. İdrar yolları için yararlı olduğu, yaralarda, ülserde, dolamada, cilt yarık ve çatlaklarını iyileştirmede kullanıldığı bildirilmiştir (21). Adıyaman çevresinde vücudun genel iltihabı ve şeker hastalıklarında, pankreas tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Çayı içilerek soğuk algınlığını giderdiği de bildirilmiştir (22). Ağrı civarlarında baş ağrısı, boğaz hastalıkları, romatizma ve mide ülserinde kullanıldığı bildirilmiştir (23).

*A. teretifolia* türünün, Afyonkarahisar etrafında sindirim, cilt ve akne hastalıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (24). *A. aleppica*, Ankara Haymana civarında dekoksiyon şeklinde ishali durdurmada kullanıldığı bilinmektedir (25). *A. biebersteinii*, Bingöl çevresinde antiinflamatuvar olarak ve romatizma, hepatit, sinüzit, diş ağrısı, adet ağrısı gibi rahatsızlıklarda kullanılmaktadır (26). *A. tenuifolia*, hiperkolesterol, diyabet, astım, bronşit ve öksürük rahatsızlıklarında infüzyon formunda kullanıldığı bildirilmiştir (27).

*Dicoma* spp. Güney Afrika'da kullanılan en yaygın etnomedikal bitki türlerinden biridir (28). *Diotis maritima* ise İspanyol geleneksel tıbbında temizleyici ajan olarak

kullanılmıştır (29). Ayrıca *O. maritimus*'un böcek kovuculuğu gösterdiği bilinmektedir ve geleneksel olarak bu amaçlar için kullanılmıştır (26).

### 2.2.2. Fitokimyasal Çalışmalar

*A. millefolium* L. çiçek salkımlarının ve üst yaprakların farklı ekstraktları, toplam polifenolik içerikleri ve antioksidan aktiviteleri için DPPH, ABTS, FRAP ve CUPRAC yöntemleri ile yapılan çalışmada ekstraktların toplam fenolik madde içeriğinin  $2,74 \pm 0,01$  ve  $7,92 \pm 0,09$  mg GAE/g kuru ağırlık aralığında olduğu bildirilmiştir. *A. millefolium* özlerinin kolayca erişilebilir doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği, aynı zamanda olası bir gıda takviyesi olarak veya ilaç endüstrisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (30).

Orta ve Doğu Anadolu'da endemik bir tür olan *A. schischkinii*'deki on iki elementin konsantrasyonları ICP-MS tekniği ile analiz edildiği çalışmada ana elementler olarak Zn (50,6 ppm), Mn (23,0 ppm) ve Cu (12,7 ppm) bulunmuş, ayrıca kateşin (20,8 µg/mg ekstrakt), trans-ferulik asit (18.3 µg/mg ekstrakt) ve gallik asit (11,2 µg/mg ekstrakt) HPLC kullanılarak majör fenolik bileşikler olarak karakterize edildiği bildirilmiştir (31).

*A. ligustica* çiçekli üst kısımlarının etanolik ekstraktlarının değerlendirildiği çalışmada fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için LC-ES/MS and LC-ES/MS/MS sonuçlarında 6-hidroksikamferol-3,6,4-trimetil eter, apigenin-6-C-glikozit-8-C-arabinosid, luteolin ve apigenin en bol bulunan flavonoidler olduğu bildirilmiştir. *A. ligustica*'da ilk kez apigenin-6-C-glikozit-8-C-arabinosid ile en fazla temsili olan C-glikosil flavonlar tespit edilmiştir. Ekstraktların radikal süpürücü aktivitesinin DPPH testi ile belirlendiği ve 4,18 ile 12,3 mM arasında değiştiği bildirilmiştir (32).

Ülkemizde endemik bir tür olan *A. cappadocica* bitkisi ile yapılan biyolojik aktivite çalışmasında metanol ve su ekstraktlarının, 100 µg/mL'de tokoferol ve BHT'ninkinden daha yüksek ABTS katyon radikal süpürme aktivitesi gösterdiği, aseton ve metanol ekstraktlarının, orta düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir (33).

*A. biserrata*'nın ardışık ekstraksiyonu yapılarak hekzan, kloroform ve su ekstraktları üzerinde yapılan testlerde toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri

sırasıyla %3,39 ve %1,12 ile su ekstraktında en yüksek olduğu bildirilmiştir. Metanol ekstraktının HPLC analizlerinde protokatekuik asit (177,83 µg/g kuru bitki) ve klorojenik asit (164,78 µg/g kuru bitki) gibi antioksidan fenolik bileşiklerin varlığı bildirilmiştir (34).

*A. nobilis* bitkisinde yapılan HPLC analizlerinde aktif fenolik bileşikler, etil asetat ekstraktında dikaffeoilkinik asit, luteolin-7-O-glikozit, orientin, viteksin, luteolin, kuersetin-metil-eter, isoramnetin-glikozit, etanol ekstraktında klorojenik asit, luteolin-7-O-glikozit, kuersetin-metil-eter, luteolin, orientin, viteksin, dikaffeoilkinik asit, apigenin-6,8-di-C-glikozit bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda *Achillea nobilis*'te dikaffeoilkinik asit, isoramnetin-glikozit, klorojenik asit ve apigenin-6,8-di-C-glikozit bileşiklerinin ilk kez analiz edildiği bildirilmiştir (35).

*A. cretica* bitki ekstraktlarında yapılan LC/MS çalışmalarında 7 flavonoid ve 2 fenolik asit içeren dokuz polifenolik bileşik tanımlandığı bildirilmiştir (36). *A. odorata* bitkisinde Folin Ciocalteu yöntemine göre metanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı 448,8±1,04 mg gallik asit eşdeğeri /g olarak bulunmuştur (37).

### 2.2.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

**2.2.3.1. Antioksidan aktivite:** *A. nobilis* bitkisinde farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktların antioksidan etkisi; maserasyon yöntemiyle elde edilen etanol (İK50: 6 µg/mL), Soxhlet yöntemiyle elde edilen etanol (İK50: 10 µg/mL), ultrasonik ekstraksiyon ile elde edilen etanol-su (İK50: 10,5 µg/mL) ekstraktlarının güçlü serbest radikal süpürme aktivitesi sergilediği bildirilmiştir (35).

*A. odorata* bitki ekstraktının 100 ve 200 µg/mL'de DPPH radikallerini doza bağlı bir şekilde söndürdüğü (sırasıyla 53,39 µg/mL ve 75,1734 µg/mL), α-tokoferolden daha iyi olan yüksek bir aktivite sergilediği (sırasıyla 65,24 µg/mL ve 88,34 µg/mL) bildirilmiştir (37). *A. cucullata* bitkisi etanol ekstraktının, 132,55 ± 0,026 µg/mL İK50 değeri ile DPPH radikal süpürme aktivitesi sergilediği bildirilmiştir (38). *A. schischkinii* ve *A. teretifolia* Wild. metanol ekstraktının DPPH yöntemiyle analizlerinde 100 µg dozlarda %68 ve %69,2 aktivite gösterdiği bulunmuştur (39).

İran'da endemik olarak bulunan *Achillea* türlerinin metanolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin DPPH yöntemine göre değerlendirildiği çalışmada; *A. aucherii*

en yüksek İK50'yi (844 µg/mL) gösterirken, *A. kellalensis* ve *A. pachycephalla* sırasıyla 518 µg/mL ve 248 µg/mL'ye sahip olduğu bildirilmiştir (40). *A. tenuifolia* metanol ekstraktının (100 µg/mL) DPPH inhibisyonunun kapsamının, 10 µg/mL E vitamini ile aynı aktiviteyi gösterdiği, 300 ve 400 µg/mL'de etil asetat ekstraktının DPPH inhibisyonunun benzer olduğu ve önemli ölçüde daha düşük radikal süpürme sergilediği bildirilmiştir (41).

**2.2.3.2. Antimikrobiyal etki:** *O. maritimus* çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ, iki gram pozitif ve altı gram negatif bakteri suşuna karşı antimikrobiyal aktivite açısından incelenmiştir. En duyarlı bakteri sırasıyla *Salmonella typhi* ve *Enterobacter cloacae* bulunmuştur (42). *O. maritimus* bitkisinin uçucu yağları ile yapılan bir başka çalışmada gıda kaynaklı patojen *Campylobacter jejuni* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (43).

*A. nobilis* bitkisinde yapılan antibakteriyel etki çalışmasında mikrodilüsyon yöntemine göre aktivite gösteren ekstraktlardan Soxhlet yöntemiyle elde edilen etil asetat (MIC:>3,1 µg/mL) ve kloroform (MIC:>3,87 µg/mL) ekstraktları *S. aureus*'a karşı en güçlü aktiviteyi gösterdiği; ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen kloroform ekstraktı, maserasyon yöntemiyle elde edilen hekzan ve Soxhlet yöntemiyle elde edilen etanol ekstraktları, *S. aureus*'a karşı benzer antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir (MIC:>5 µg/mL) (35).

*A. biebersteinii*, *A. fragrantissima*, *A. santolina* ve *A. millefolium* bitkileri hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal etkilerine bakılan çalışmada; uçucu yağların ve bunların ana fraksiyonlarının gıda kaynaklı bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Mikroorganizma ve test edilen fitokimyasallara bağlı olarak bitkisel yağların aktivitesinde farklılıklar olduğu, gram pozitif bakteriler gram negatif bakterilere göre daha duyarlıyken, *S. aureus* en duyarlı gram pozitif bakteri olduğu bildirilmiştir. Gram negatif türler ile ilgili olarak, tüm tedavilerde en duyarlı olan *E. coli* olduğu, *A. biebersteinii* ve *A. fragrantissima* yağları en aktif doğal antimikrobiyal özelliğinde olup, inhibisyon zonlarının çapı (15,5 ve 21,5 mm) ile (14,0 ve 19,7 mm) arasında değiştiği bildirilmiştir (44).

*A. fragrantissima* bitkisinin sulu ve hidro-alkolik ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyusu difüzyon yöntemi ile değerlendirildiğinde hidro-alkolik

ekstraktın, inhibitör etkiden ziyade *S. pneumoniae* ve *B. cereus*'a karşı bakterisidal aktivite sergilediği bildirilmiştir (45).

**2.2.3.3. Sitotoksik etki:** *O. maritimus* uçucu yağlarıyla yapılan çalışmada 1,25 ve 0,64 µL/mL'lik uçucu yağ konsantrasyonları ile MTT azalması sırasıyla %18,6 ve %72,3'e düşmüştür. Bununla birlikte, yağın 0,32 ve 0,16 µL/mL'lik konsantrasyonları, sırasıyla %94,2 ve %98,9 değerleriyle makrofajlarda sitotoksosite göstermediği bildirilmiştir (46).

Kumul bitkilerinden (*Crithmum maritimum*, *Seseli tortuosum*, *Artemisia campestris*, *Juniperus phoenicea*, *O. maritimus*, ve *Eryngium maritimum*) elde edilen ikincil metabolitlerin (uçucu yağlar) kanser hücrelerinde sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada *S. tortuosum* ve *O. maritimus*'tan ekstrakte edilen uçucu yağın, test edilen diğer türlerle karşılaştırıldığında her iki hücre hattı için en düşük İK50 değerlerine sahip olduğu tanımlanmıştır (47).

*A. odorata*' da hücresel çoğalma, 72 saat boyunca değişen konsantrasyonlarda bitki ekstraktı ve pozitif kontrol (kolşisin) ile muamele edilmiş MCF-7, Hep2 ve WEHI hücreleri kullanılarak MTT yöntemi ile yapılan çalışmada *A. odorata* polifenoller, test edilen üç kanser hücre hattının tümüne karşı aktif olduğu ve incelenen üç hücre hattı için doza bağlı bir şekilde hücresel proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ekstrakt, WEHI ve Hep2 hücre hatları üzerinde iyi bir antiproliferatif aktivite gösterdiği bildirilmiştir (37).

*A. eriophora* bitkisinde yapılan MTT sitotoksosite çalışmalarında, bitki ekstraktı konsantrasyonun artırılmasıyla hücre canlılığı yüzdesinin azaldığını ve böylece İK50, GI50 ve LC50 değerlerinin sırasıyla  $18,73 \pm 0,22$ ,  $7,52 \pm 0,15$  ve  $56,73 \pm 0,18$  µg/mL olarak belirlendiği bildirilmiştir (48).

**2.2.3.4. Toksisite çalışmaları:** *A. talagonica* ve *A. tenuifolia* türü için 6 fraksiyonun (etil asetat, metanol ve sulu metanol (%50) ekstraktı) sitotoksik aktivitesinin değerlendirildiği çalışmada, hem *A. talagonica* hem de *A. tenuifolia*'nın etil asetat ve metanol ekstraktlarının, *Artemia salina*'nın aktif larvalarının ileri hareketini etkisiz hale getirebileceğini gösterdiği, bitkilerin sulu metanol (%50) ekstraktlarının minimum öldürücü konsantrasyonlarının yüksek olduğu ve türlerin yüksek polariteli ekstraktlarının düşük sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Biyolojik öldürücülüğün daha polar çözücüler kullanılarak fraksiyonlama ile azaltılabileceği bildirilmiştir (49).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler

**3.1.1.1. Mor ötesi-görünür bölge (UV/VIS) spektrofotometresi:** Çalışmada Varian marka Cary-50 Conc model UV/VIS spektrofotometre kullanılmıştır. Ölçümler 1 cm kuvarz hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**3.1.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-diod serili dedektör (HPLC-DAD):** *Achillea maritima* türünde bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizinde, Agilent 1200 HPLC system (Waldbronn, Almanya) model kullanılmıştır.

**3.1.1.3. Döner buharlaştırıcı:** Çalışmada çözücülerin uzaklaştırılması işleminde döner buharlaştırıcı Heidolph Hei-VAP Value Digital (Almanya) model kullanılmıştır.

**3.1.1.4. Analitik terazi:** Deneysel çalışmalar sırasında çözelti hazırlama işlemleri için Radwag AS 220/C/2 marka analitik terazi kullanılmıştır.

**3.1.1.5. Saf su cihazı:** Analizler sırasında kullanılan su, ELGA marka Purelab Option DV 25 model saf su cihazından (su saflığı 18,2 MΩ×cm) sağlanmıştır.

##### 3.1.2. Bitkinin Toplanması ve Teşhisi

*A. maritima* (L.) Ehrend. ve Y.P. Guo, doğal olarak yayılış gösterdiği İstanbul ili Şile ilçesinde denize yaklaşık 50 metre mesafede kumul alanda 41°11'03,6"N 29°30'27,7"E noktasından toplanmıştır. Bitki örneklerinin teşhisi İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Doç. Dr. İlker GENÇ tarafından yapılmıştır. Herbaryum

örnekleri İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda (ISTE 117218) numarasıyla saklanmaktadır.



**Şekil 3.1:** *A. maritima* doğal ortamında

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Ekstrakt Hazırlanması

Solvent bölümlemesindeki farklılıklar nedeniyle, doğal bileşikler sıvı-sıvı ekstraksiyon yoluyla çekilebilir ve gruplar halinde ayrılabilir. Ekstraksiyon, sulu ve organik çözücüler arasında gerçekleştirilir. Çözücü ekstraksiyonu ve bölümleme olarak da bilinen sıvı-sıvı ekstraksiyonu, genellikle su (polar) ve organik solvent (polar olmayan) olmak üzere iki farklı karışmaz sıvıda göreceli çözünürlüklerine dayalı olarak bileşikler veya metal komplekslerini ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bir veya daha fazla türün bir sıvıdan başka bir sıvı faza, genellikle sulu halden organik maddeye bir geçişi vardır. Sulu fazdan organik faza geçiş, kimyasal potansiyel tarafından

yürütülür, çözünenleri ve çözücülerini oluşturan kimyasal bileşenlerin genel sistemi daha kararlı bir konfigürasyondadır (50).

Gölgede kurutulmuş bitki örnekleri öğütüldükten sonra 250 g bitki materyali %80 (%v/v) etanolde 72 saat bekletildi. Daha sonra filtre kâğıdından süzöldü ve çözücü döner buharlaştırıcıda 40°C’de uzaklaştırıldı. Kalan kısma 60 mL deiyonize su eklendi ve karışım hekzan, kloroform, etil asetat ve butanol gibi farklı organik çözücülerle arka arkaya ekstrakte edildi (51). Spektroskopik ve kromatografik analizler için her bir ekstrakt kalıntısından 0,1 g alınarak 10 mL metanol içerisinde çözümlere hazırlanmıştır.

### 3.2.3. Antioksidan Aktivite

**3.2.3.1. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi:** DPPH (1,1-difenil 2-pikril hidrazil) antioksidan kapasite tayini çalışmalarında standart madde olarak troloks kullanılmıştır (52). Farklı derişimlerdeki troloks çözeltileri kullanılarak kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Analiz tüplerine 0,1 mL örnek/standart, 0,18 mL 1 mM DPPH (metanol ile hazırlanmış) çözeltisi eklenerek toplam hacim 3 mL olacak şekilde metanol eklenmiştir. Analiz tüpleri 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletilerek 515 nm’de absorbansları ölçölmüştür (Aörnek). Ölçömler sonucunda örnekler için % inhibisyon değıerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Standartın kalibrasyon grafiğınden yararlanarak ekstraktların antioksidan aktivite değıerleri “mg troloks eş değıeri/g ekstrakt” şeklinde hesaplanmıştır.

**3.2.3.2. ABTS yöntemi:** ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)) antioksidan aktivite tayini (53,56) çalışmalarında standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Su içerisinde 0,746 mM ABTS ve 0,245 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> olacak şekilde karıştırmıştır. 24-48 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra ABTS çözeltisi 1:10 oranında seyreltilmiştir. Analiz tüplerine 0,1 mL örnek/standart, 3,9 mL etanol ve 1 mL seyreltilmiş ABTS çözeltisi eklenip, 6 dk sonra 734 nm’de absorbansları ölçölmüştür (Aörnek). Ölçömler sonucunda örnekler için % inhibisyon değıerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ekstraktların antioksidan aktivite değerleri “mg troloks eş değeri/g ekstrakt” şeklinde hesaplanmıştır.

**3.2.3.3. FRAP yöntemi:**  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferriktripiridiltiazin) kompleksinin asidik ortamda antioksidanların varlığıyla  $\text{Fe}^{2+}$  ye indirgenmesine dayanan FRAP yöntemiyle antioksidan aktivite tayininde standart olarak troloks kullanılmıştır (55). Analiz tüplerine 0,1 mL örnek/standart ve 2,9 mL FRAP reaktifi eklenerek 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletildikten sonra örnek/standartların 593 nm’de absorbansları okunmuştur. Elde edilen doğru denklemi kullanılarak ekstraktların antioksidan kapasite değerleri mg troloks eş değeri/g ekstrakt cinsinden belirlenmiştir.

#### 3.2.4. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Miktar Tayini

Hazırlanan ekstraktlarda bulunan fenolik maddelerin kantitatif tayinleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyod array dedektör cihazı (HPLC-DAD) kullanılmıştır. HPLC-DAD ile fenolik bileşik analizinde kolon olarak XBridge C18 (4.6x250 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters) kolon ile 10  $\mu\text{L}$  enjeksiyon hacmi ve 0,5 mL/dk akış hızı ile çalışılmıştır. Analiz sırasında %1’lik sulu formik asit (A) ve asetonitrilden (B) oluşan gradient hareketli faz programı uygulanmıştır. HPLC-DAD için çalışma koşulları Tablo 3.1’de verilmiştir. Ekstraktların pik alanı değerleri standartlar kullanılarak çizilen doğru denkleminde yerine konularak *A. maritima* ‘da bulunan fenolik maddeler mg/g ekstrakt cinsinden hesaplanmıştır.

**Tablo 3.1:** HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

| Zaman (dk) | Hareketli faz bileşimi |       |
|------------|------------------------|-------|
|            | A                      | B     |
| 0          | %90                    | %10   |
| 10         | %87                    | %13   |
| 20         | %58,5                  | %41,5 |
| 25         | %30                    | %70   |
| 35         | %90                    | %10   |
| 36         | %90                    | %10   |

### 3.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

**3.2.5.1. Mikroorganizmalar:** Bu çalışmada beş referans suş kullanılmıştır; iki Gram pozitif kok suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299), iki Gram negatif basil suşu (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ve bir maya (*Candida albicans* ATCC 90028). Tüm suşlar İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

**3.2.5.2. Minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi:** Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), gece boyunca inkübasyondan sonra bir mikroorganizmanın görünür büyümesini tamamen engelleyen en düşük bitki ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. MİK, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarifine uygun şekilde broth dilüsyon yöntemiyle belirlendi (56). Tüm bakteri suşları triptik soy agar (OXOID, Türkiye) besiyeri üzerinde kültürlendi, maya hücreleri ise Sabouraud dekstroz agar (OXOID, Türkiye) üzerinde kültürlendi ve 35°C'de 24-48 saat aerobik olarak inkübe edildi. Daha sonra bakteri kültürleri steril salin (%0,85 NaCl) içinde süspanse edildi ve 0,5 McFarland bulanıklığına ( $1,5 \times 10^8$  cfu/mL) ayarlandı. U tabanlı, 96 kuyucuklu mikropiplara negatif kontroller (yalnızca bitki ekstraktı içeren besiyeri), pozitif kontroller (yalnızca bakteri içeren besiyeri) ve bitki ekstraktları (5000-90 µg/mL) son inokulum konsantrasyonu  $1 \times 10^5$  cfu/mL olacak şekilde konulmuştur. Mueller Hinton Broth (OXOID, Türkiye) ve RPMI 1640 (Thermo Fischer Scientific, Türkiye), sırasıyla bakteri ve maya hücreleri için bitki ekstraktı seri seyreltmelerinin hazırlanmasında kullanıldı. İnoküle edilen tüm plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi ve MİK değerleri saptanmıştır.

### 3.2.6. MTT Sitotoksisite Testi

Bu çalışmada, ATCC'den (American Type Culture Collection) elde edilen NIH-3T3 (fare embriyonik fibroblast), K562 (kronik myeloid lösemi) ve Saos (İnsan osteosarkoma) hücre serileri kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının 3 gün uygulanması sonucunda hücrelerde meydana gelen sitotoksik etki, MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (57). MTT testi doğal ve sentetik moleküllerin sitotoksitesini anlamada (ilk basamak tarama testi) yaygın kullanılan hassas, ucuz ve güvenilir bir testtir. Bu amaçla hazırlanan ekstraktların

DMSO'da (10 mg/mL) stok çözeltileri hazırlandıktan sonra istenilen konsantrasyonlarda (5000 - 2500 - 1250 - 625 - 312,5 - 156,25 µg/mL) medyum ile seyreltilmiş ve kullanılan hücreler ile 3 gün %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde kültür yapılmıştır. Süre sonunda 10 µl MTT (5 mg/mL) ilave edildikten 4 saat sonra formazan kristalleri izopropil alkolde çözülerek ELISA okuyucuda 570 nm'de pleytdeki kuyuların absorbanları ölçülmüştür. Her deney üç kez tekrarlanmıştır. Doz/cevap eğrileri hazırlanarak, bileşiklerin İK50'si hesaplandı.

### 3.2.7. Brine Shrimp Toksisite Testi

Tuzlu su karidesi ölümcüllüğü deneyi (BSLA), Mc Laughlin ve ark (58) tarafından tıbbi türlerin bitki özlerinin sitotoksik olup olmadığını belirlemek için geliştirilen bir yöntemdir.

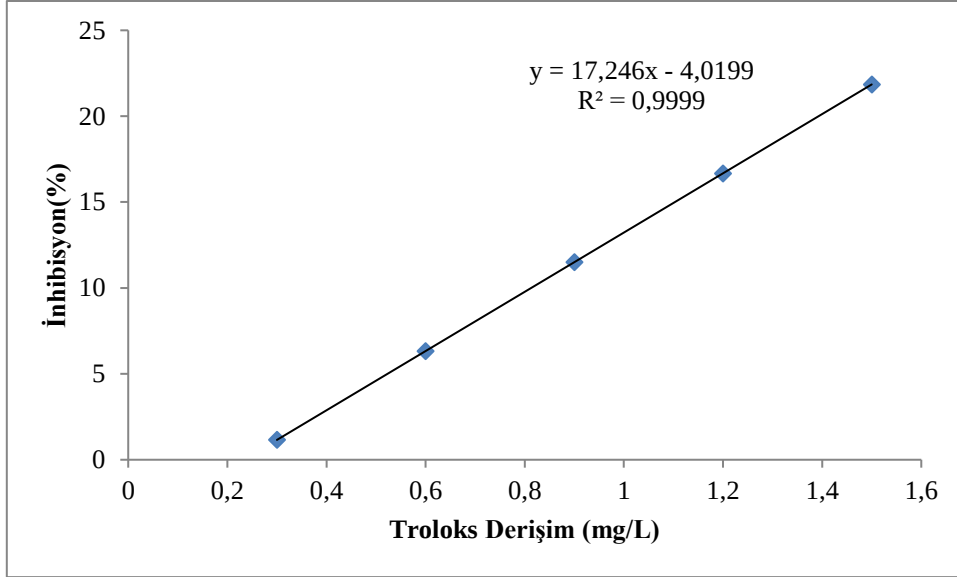
Tuzlu su karidesinin (*Artemia* sp., Artemiidae) yumurtaları 36 saat tuzlu su (%1 NaCl) içeren bir kültür kabında inkübe edildi. Nitrat, fosfat ve silikat içermeyen deniz tuzu ve damıtılmış sudan (35 g/L) 25°C'de sabit aydınlatma altında hazırlanmıştır. Tuzlu su çözeltisi, bir akvaryum hava pompası ile inkübasyon sırasında sürekli olarak havalandırıldı. 48 saat sonra *Artemia* larvaları kültür kabından toplandı. Bitki ekstraktları stok çözeltilerden 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 ve 1000 (µg/mL) olacak şekilde hazırlandı. 2 mm çapında uçlu plastik bir pipet kullanılarak her şişeye on tuzlu su karides larvası yerleştirilir. Larvalar, kabuklarının altına hava hapsederek onları öldürmekten kaçınmak için solüsyon yüzeyinin altına bırakılır. Hayatta kalanlar 24 saat sonra stereomikroskop altında sayılır. Doz-ölüm deneme sonuçları Polo-PC probit paket programı yardımıyla analiz edilerek, LC50 değerleri belirlenmiştir. Tüm deneyler, üç kez yapıldı. 249 µg/mL'nin altındaki LC50 değerleri yüksek derecede toksik, 250-499 µg/mL orta toksik ve 500-1000 µg/mL hafif toksik olarak kabul edildi. 1000 µg/mL'nin üzerindeki değerler toksik değil olarak kabul edildi (59).

## 4. BULGULAR

### 4.1. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI

#### 4.1.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Yöntemi

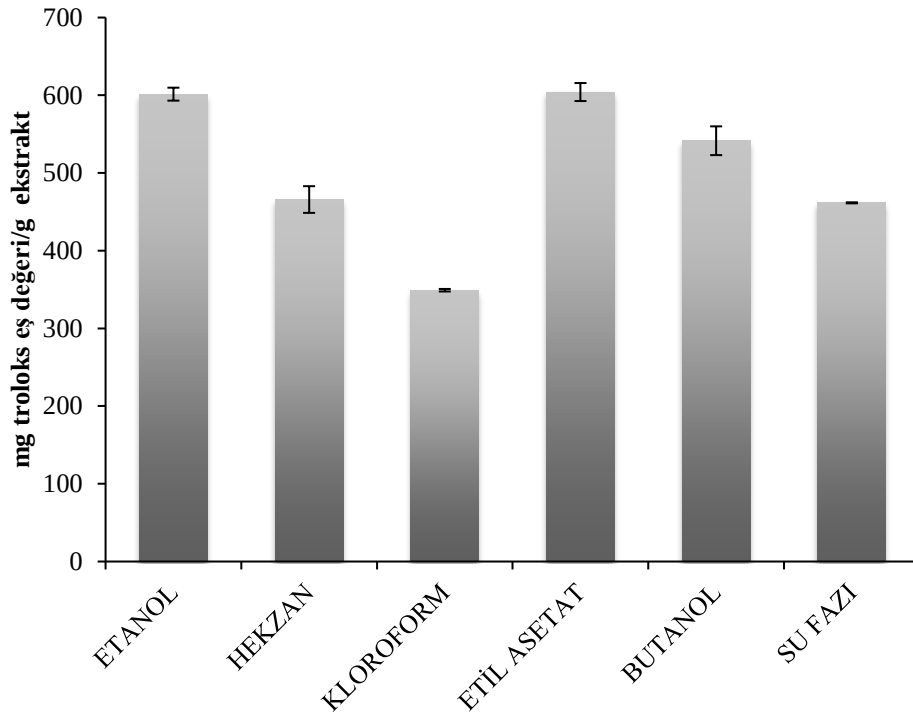
*A. maritima* bitkisinin DPPH yöntemi ile yapılan antioksidan aktivite sonuçları Tablo 4.1 ve Şekil 4.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir. DPPH analizine ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1: DPPH yöntemi için kalibrasyon grafiği

**Tablo 4.1:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının DPPH yöntemindeki antioksidan aktiviteleri

| Ekstrakt    | mg troloks eş değeri/g ekstrakt $\pm$ standart sapma |
|-------------|------------------------------------------------------|
| Etanol      | 601,41 $\pm$ 8,34                                    |
| Hekzan      | 465,82 $\pm$ 17,18                                   |
| Kloroform   | 349,11 $\pm$ 1,63                                    |
| Etil asetat | 604,15 $\pm$ 11,57                                   |
| Butanol     | 541,49 $\pm$ 18,49                                   |
| Su fazı     | 461,57 $\pm$ 0,68                                    |

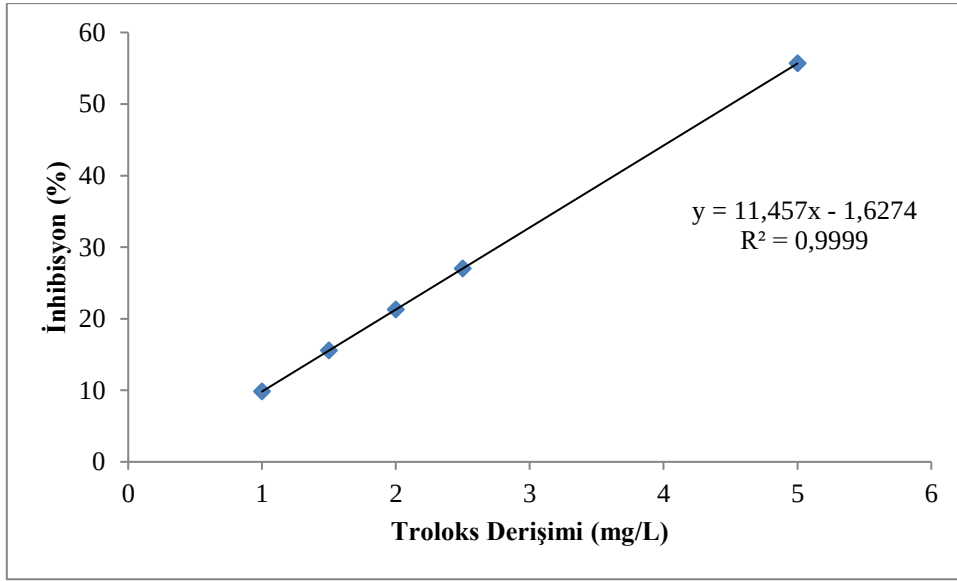


**Şekil 4.2:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının DPPH yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması



#### 4.1.2. ABTS Yöntemi

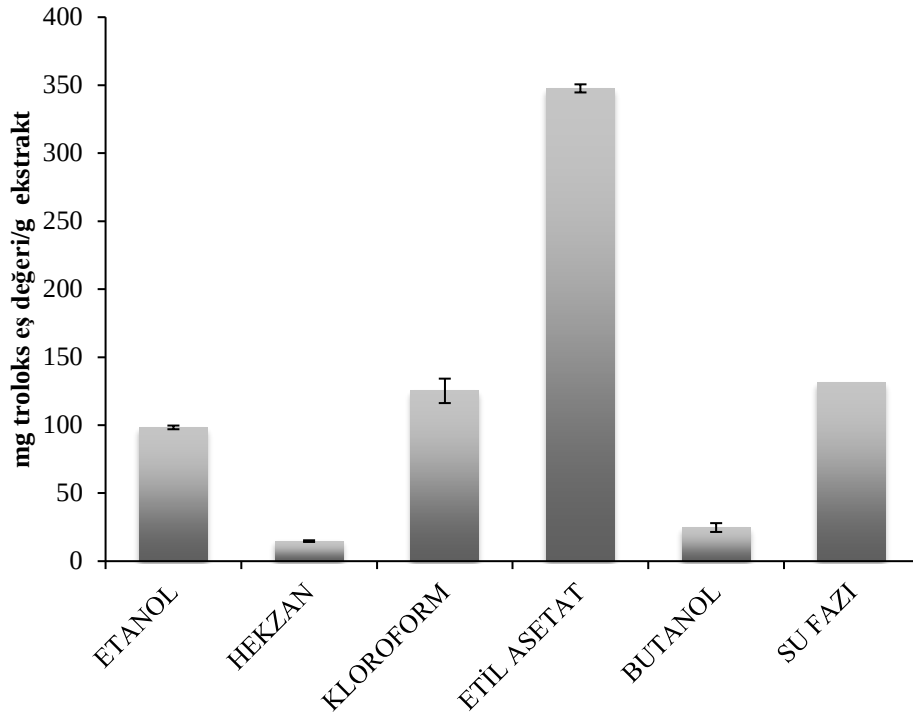
*A. maritima* bitkisinin ABTS yöntemi ile yapılan antioksidan aktivite sonuçları Tablo 4.2 ve Şekil 4.4’de ayrıntılı olarak verilmiştir. ABTS analizine ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3: ABTS yöntemi için kalibrasyon grafiği

**Tablo 4.2:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının ABTS yöntemindeki antioksidan aktiviteleri

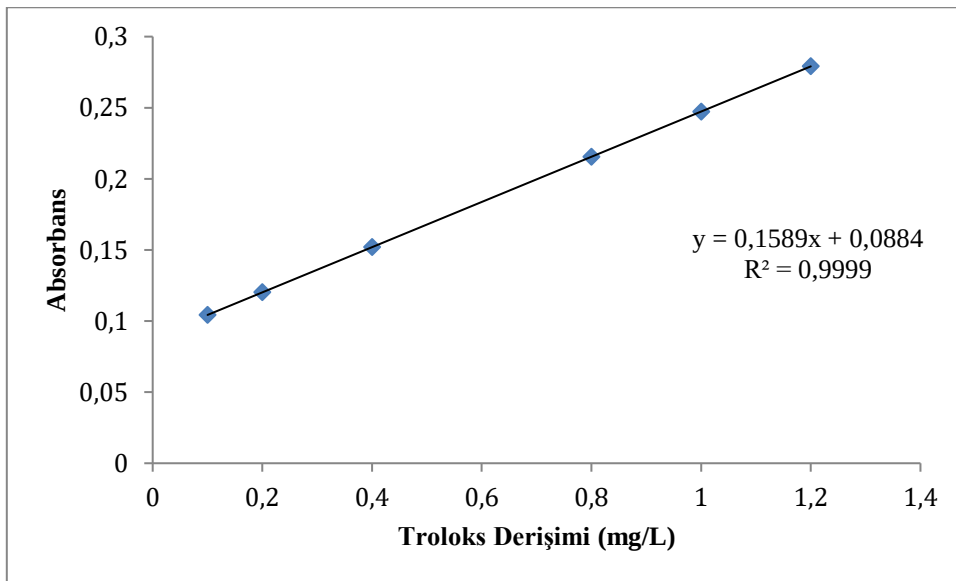
| Ekstrakt    | mg troloks eş değeri/g ekstrakt ± standart sapma |
|-------------|--------------------------------------------------|
| Etanol      | 98,36 ±1,35                                      |
| Hekzan      | 14,73 ±0,62                                      |
| Kloroform   | 125,23 ±6,23                                     |
| Etil asetat | 347,65 ±8,98                                     |
| Butanol     | 24,72 ±2,98                                      |
| Su fazı     | 131,37 ±3,24                                     |



**Şekil 4.4:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının ABTS yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması

#### 4.1.3. FRAP Yöntemi

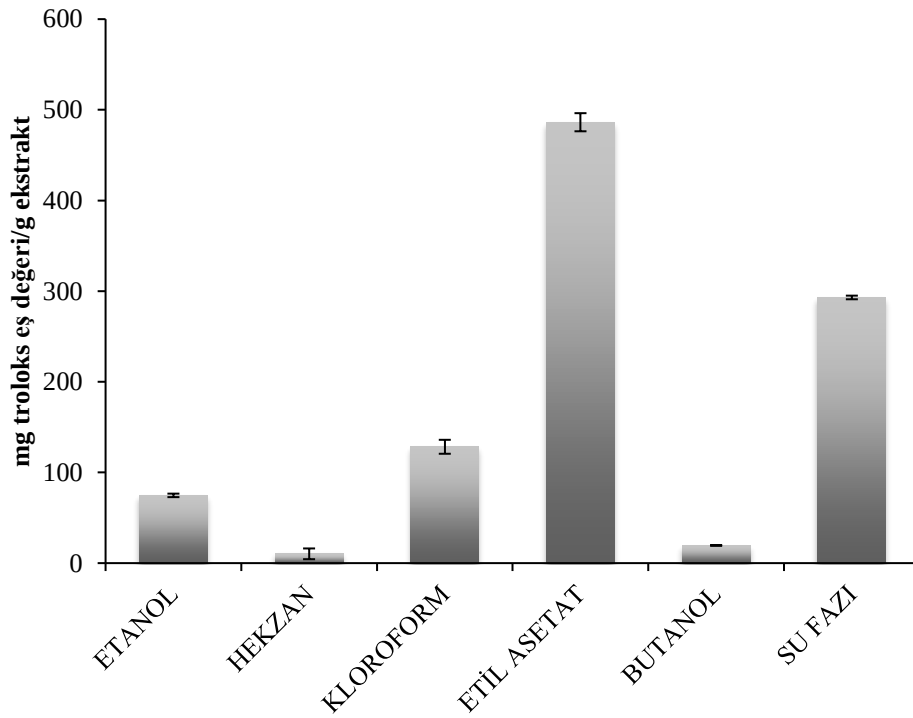
*A. maritima* bitkisinin FRAP yöntemi ile yapılan antioksidan aktivite sonuçları Tablo 4.3 ve Şekil 4.6’da ayrıntılı olarak verilmiştir. FRAP analizine ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.5’te verilmiştir.



**Şekil 4.5:** FRAP yöntemi için kalibrasyon grafiği

**Tablo 4.3:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının FRAP yöntemindeki antioksidan aktiviteleri

| Ekstrakt    | mg troloks eş değeri/g ekstrakt $\pm$ standart sapma |
|-------------|------------------------------------------------------|
| Etanol      | 74,70 $\pm$ 1,92                                     |
| Hekzan      | 10,24 $\pm$ 5,93                                     |
| Kloroform   | 128,31 $\pm$ 7,68                                    |
| Etil asetat | 486,31 $\pm$ 9,99                                    |
| Butanol     | 19,50 $\pm$ 0,48                                     |
| Su fazı     | 293,02 $\pm$ 2,00                                    |



**Şekil 4.6:** *A. maritima* bitkisinin farklı ekstraktlarının FRAP yöntemindeki antioksidan aktivite karşılaştırması

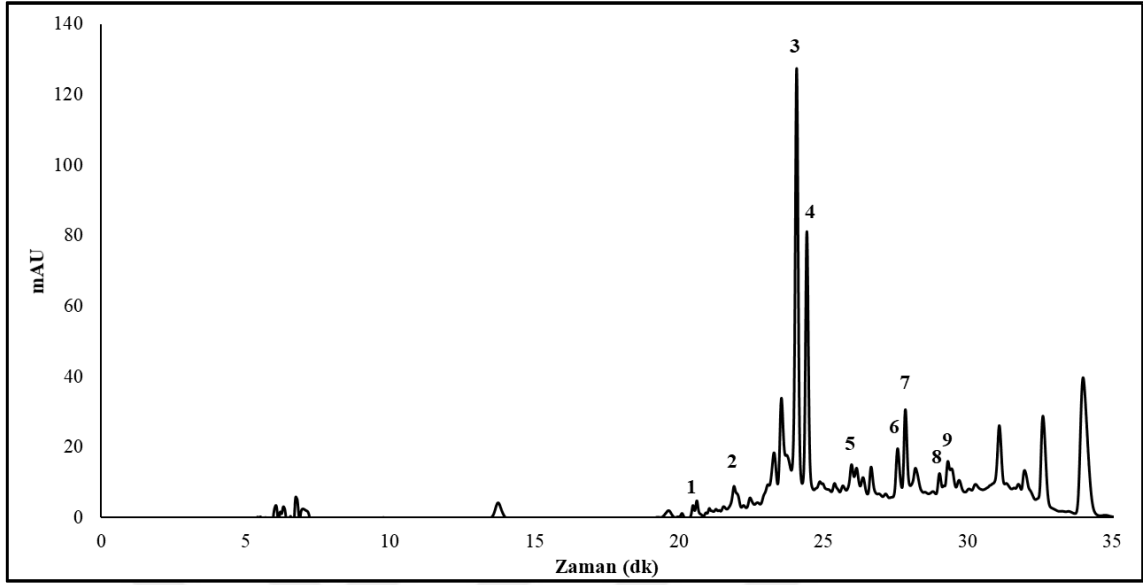
#### 4.2. FENOLİK BİLEŞİKLERİN HPLC İLE MİKTAR TAYİNİ

*A. maritima* bitkisinden hazırlanan ekstraktlarda bulunan fenolik bileşikler HPLC-DAD cihazı ile kalitatif ve kantitatif tayin edilmiştir. Kromatografik tayinin validasyon parametreleri (Tablo 4.4), 280 nm’de alınan ekstrakt kromatogramları (Şekil 4.7-4.12) ve ekstraktta bulunan fenolik madde miktarları (Tablo 4.5) ayrıntılı olarak

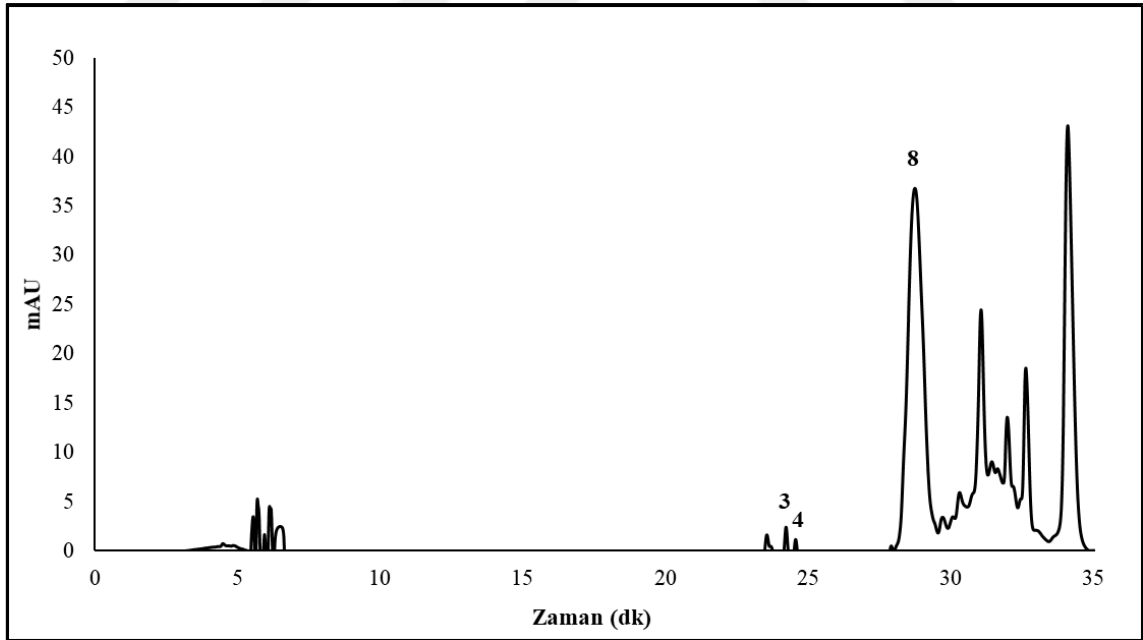
verilmiştir. Şekil 4.7-4.12’de verilen kromatogramlardaki standart fenoliklerin sıralaması Tablo 4.4’e göre yapılmıştır.

**Tablo 4.4:** Standart fenolik bileşiklerin validasyon parametreleri

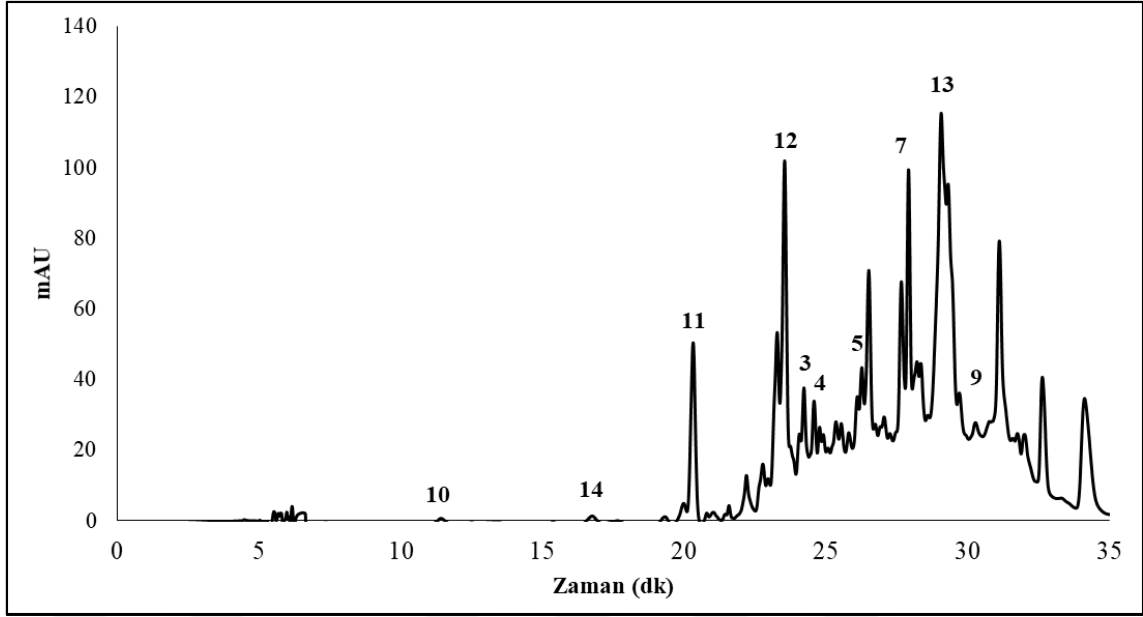
| Sıralama | Fenolik Bileşikler     | Kalibrasyon Eşitliği      | Regresyon katsayısı (R <sup>2</sup> ) |
|----------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 1        | Kafeik asit            | $y = 111,0825x - 8,8965$  | 0,9982                                |
| 2        | Rutin                  | $y = 37,5017x - 4,9297$   | 0,9976                                |
| 3        | <i>p</i> -kumarik asit | $y = 130,7578x + 11,8809$ | 0,9997                                |
| 4        | Ferulik asit           | $y = 107,5075x - 2,3255$  | 0,9988                                |
| 5        | Rosmarinik asit        | $y = 50,4342x - 21,8842$  | 0,9982                                |
| 6        | Resveratrol            | $y = 135,3697x - 24,0625$ | 0,9992                                |
| 7        | Luteolin               | $y = 63,2430x - 1,2038$   | 0,9997                                |
| 8        | Apigenin               | $y = 138,6645x - 14,2679$ | 0,9999                                |
| 9        | Kamferol               | $y = 78,3573x - 16,9318$  | 0,9983                                |
| 10       | Protokatekuik asit     | $y = 65,8074x + 5,7423$   | 0,9997                                |
| 11       | Epigallokateşin gallat | $y = 15,5587x + 0,0902$   | 0,9988                                |
| 12       | Epikateşin gallat      | $y = 30,5643x + 6,1300$   | 0,9900                                |
| 13       | Naringenin             | $y = 71,7026x + 11,1796$  | 0,9987                                |
| 14       | Klorojenik asit        | $y = 47,2881x - 3,3150$   | 0,9939                                |
| 15       | Kamferol-3-glikozit    | $y = 57,6594x + 3,9351$   | 0,9998                                |
| 16       | Vanilik asit           | $y = 74,4184x + 5,6058$   | 0,9988                                |



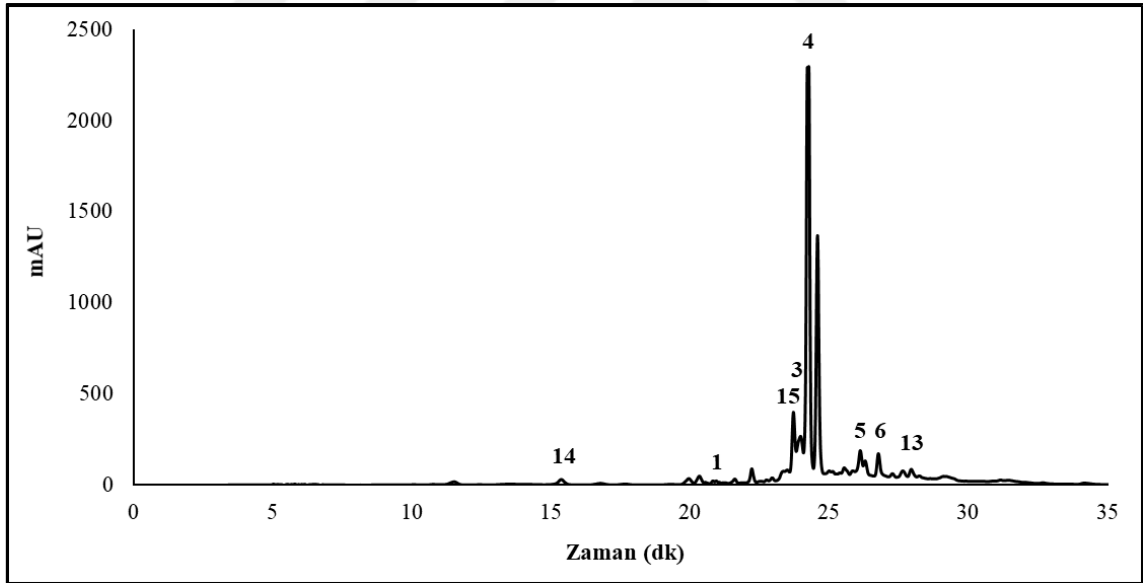
**Şekil 4.7:** Etanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 2: rutin, 3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 6: resveratrol, 7: luteolin, 8: apigenin, 9: kamferol)



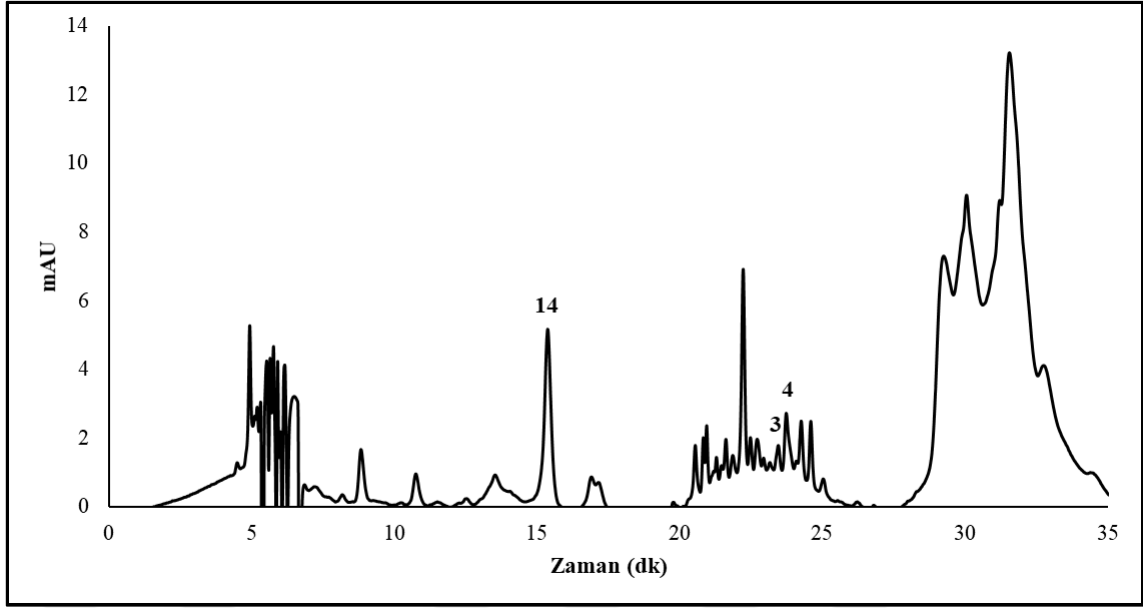
**Şekil 4.8:** Hekzan ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 8: apigenin)



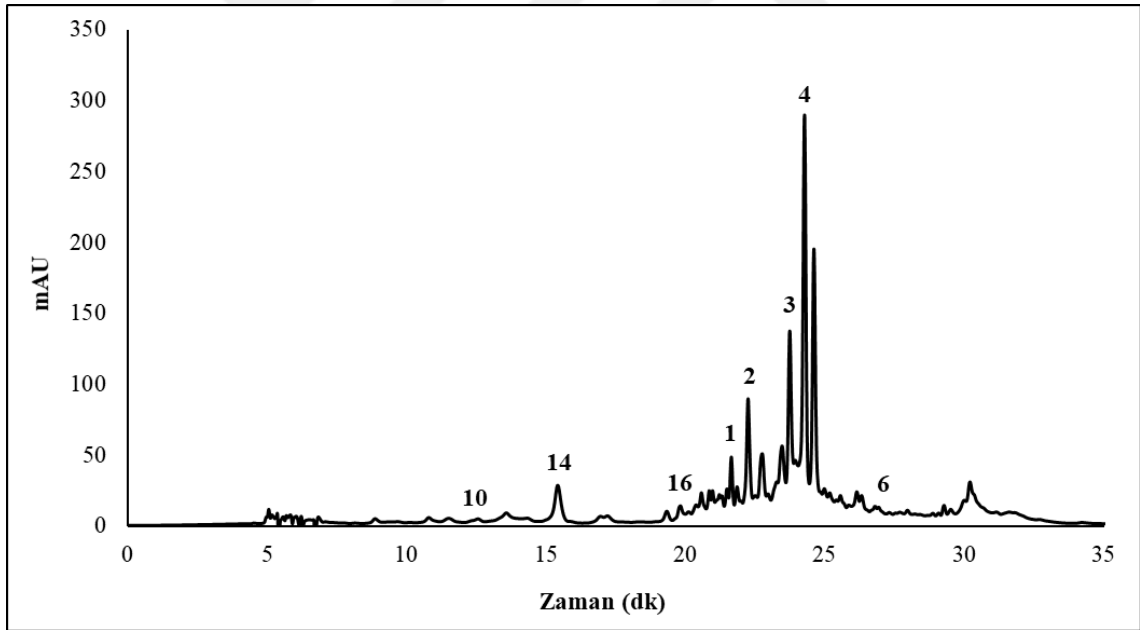
**Şekil 4.9:** Kloroform ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 7: luteolin, 9: kamferol, 10: protokatekuik asit, 11: epigallokateşin gallat, 12: epikateşin gallat, 13: naringenin, 14: klorojenik asit)



**Şekil 4.10:** Etil asetat ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 5: rosmarinik asit, 6: resveratrol, 13: naringenin, 14: klorojenik asit, 15: kamferol glikozit)



**Şekil 4.11:** Butanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 14: klorojenik asit)



**Şekil 4.12:** Su fazının HPLC-DAD kromatogramı (1: kafeik asit, 2: rutin, 3: *p*-kumarik asit, 4: ferulik asit, 6: resveratrol, 10: protokatekuik asit, 14: klorojenik asit, 16: vanilik asit)

**Tablo 4.5:** *A. maritima* ekstraktlarındaki fenolik madde miktarları (mg/g ekstrakt)

| Fenolik Bileşik        | Etanol     | Hekzan     | Kloroform   | Etil asetat | Butanol    | Su fazı     |
|------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| Protokatekuik asit     | te         | te         | 0,14 ±0,02  | 2,59 ±0,01  | te         | 0,58 ±0,02  |
| Vanilik asit           | te         | te         | te          | te          | te         | 0,38 ±0,01  |
| Epigallokateşin gallat | te         | te         | 13,45 ±0,01 | 18,91 ±0,19 | te         | te          |
| Epikateşin gallat      | te         | te         | 13,38 ±0,04 | te          | te         | te          |
| Naringenin             | te         | te         | 12,03 ±0,29 | 9,24 ±0,02  | te         | te          |
| Klorojenik asit        | te         | te         | 0,15 ±0,01  | 5,45 ±0,33  | 2,19 ±0,08 | 8,19 ±0,04  |
| Kafeik asit            | 0,79 ±0,01 | te         | te          | 1,61 ±0,06  | Te         | 0,48 ±0,01  |
| <i>p</i> -kumarik asit | 0,38 ±0,01 | te         | 0,43 ±0,01  | 10,12 ±0,06 | 0,01 ±0,01 | 5,51 ±0,04  |
| Ferulik asit           | 5,05 ±0,01 | 0,14 ±0,01 | 1,39 ±0,01  | 47,97 ±0,07 | 0,17 ±0,01 | 11,05 ±0,01 |
| Rosmarinik asit        | 3,12 ±0,01 | te         | 3,56 ±0,01  | 16,84 ±0,08 | te         | te          |
| Resveratrol            | 0,34 ±0,01 | te         | te          | 1,81 ±0,02  | te         | 0,20 ±0,01  |
| Rutin                  | 1,04 ±0,01 | te         | te          | te          | te         | 6,52 ±0,05  |
| Kamferol-3-glikozit    | te         | 0,01 ±0,01 | te          | 40,38 ±0,01 | te         | te          |
| Luteolin               | 1,29 ±0,02 | te         | 2,76 ±0,01  | te          | te         | te          |
| Kamferol               | 0,42 ±0,01 | te         | 1,04 ±0,01  | te          | te         | te          |
| Apigenin               | 0,42 ±0,01 | 3,13 ±0,01 | te          | te          | te         | te          |

Ortalama ± standart sapma, te: tespit edilemedi



### 4.3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE SONUÇLARI

Elde edilen farklı *A. maritima* ekstraktlarının farklı suşlara karşı tespit edilen MİK değerleri Tablo 4.6’da verilmiştir.

**Tablo 4.6:** *A. maritima* ekstraktlarının farklı suşlara karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)

| Mikroorganizmalar |             | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|-------------------|-------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| MİK<br>µg/mL      | Etanol      | 2500             | 2500               | 2500           | 2500                 | 2500               |
|                   | Hekzan      | 19               | 312                | 156            | 39                   | <9                 |
|                   | Kloroform   | 2500             | 2500               | 2500           | 2500                 | 2500               |
|                   | Etil Asetat | 1250             | 78                 | 625            | 156                  | 9                  |
|                   | Butanol     | 1250             | 39                 | 625            | 1250                 | <9                 |
|                   | Su fazı     | 625              | 625                | 625            | 625                  | 625                |

### 4.4. MTT SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI

*A. maritima*’nın ekstraktlarının kullanılan hücre hatlarında tespit edilen İK50 değerleri Tablo 4.7’de sunulmuştur.

**Tablo 4.7:** *A. maritima* ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi (İK50)

| Ekstrakt    | İK50 (µg/mL) |            |            |
|-------------|--------------|------------|------------|
|             | NIH-3T3      | K562       | Saos       |
| Etanol      | 1200         | <b>240</b> | <b>280</b> |
| Hekzan      | >2500        | 750        | 560        |
| Kloroform   | 1900         | <b>210</b> | <b>240</b> |
| Etil asetat | 1800         | <b>470</b> | <b>360</b> |
| Butanol     | >2500        | 820        | 780        |
| Su fazı     | >2500        | 700        | 790        |

#### 4.5. BRİNE SHRİMP TOKSİSİTE SONUÇLARI

Tuzlu su karidesi (*Artemia* sp., Artemiidae) üzerine hazırlanan ekstraktların toksisite sonuçları LC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) olarak Tablo 4.8’de verilmiştir.

**Tablo 4.8:** Brine shrimp toksisite sonuçları

| Ekstrakt    | LC50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Toksisite Derecesi |
|-------------|---------------------------|--------------------|
| Etanol      | 281                       | Orta Toksik        |
| Hekzan      | 342                       | Orta Toksik        |
| Kloroform   | 328                       | Orta Toksik        |
| Etil asetat | 2426                      | Toksik Değil       |
| Butanol     | 1622                      | Toksik Değil       |
| Su fazı     | 5703                      | Toksik Değil       |

## 5. TARTIŞMA

Toplanan *A. maritima* bitkisinin ekstratlarının antioksidan aktivite sonuçları DPPH, ABTS ve FRAP gibi üç farklı yöntem ile belirlenmiştir. DPPH yöntemine göre ekstraktların antioksidan aktivite sonuçları sırasıyla etil asetat> etanol> butanol> hekzan> su> kloroform, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre etil asetat> su> kloroform> etanol> butanol> hekzan şeklinde bulunmuştur. Genel olarak karşılaştırıldığında antioksidan aktivite sonuçlarında en etkili ekstrakt etil asetat çözücüsüyle elde edilen ekstraktır. DPPH yöntemiyle bulunan antioksidan aktivite sonuçları literatür ile karşılaştırıldığında; yapılan bir çalışmada antioksidan aktivite değeri  $132,55 \pm 0,026$   $\mu\text{g/mL}$  (38), bir diğer çalışmada 216-844  $\mu\text{g/mL}$  arasında (40), bir başka çalışmada da 145,5-320  $\mu\text{g/mL}$  (41) bulunmuş olup, tez çalışmamızdaki sonuçlar (604,15-349,11 mg troloks eş değeri/g ekstrakt = 604,15-349,11 mg troloks eş değeri/mL ekstrakt) bu literatür sonuçlarından daha yüksek bulunmuştur. DPPH ve ABTS yöntemlerinin sonuçları *Diplotaxis virgata* ve *Achillea millefolium* bitkisi üzerinde yapılan çalışmaya benzerlik göstermektedir (60, 61). DPPH, FRAP ve ABTS yöntemleri farklı deneysel ilke ve şartlara sahip antioksidan aktivite yöntemleridir. Doğal ürünlerden elde edilen ekstraktlar kompleks bileşiklere sahip olabilmektedir. Bu nedenle kompleks bileşiklerin farklı antioksidan aktivite reaksiyon yöntemine karşı farklı deneysel şartlarda göstereceği kimyasal reaksiyon yatkınlığı da farklı olacaktır. Bu nedenle kompleks bileşik içeren ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri, farklı antioksidan aktivite yöntemleri ile yapılarak karşılaştırılmalıdır.

Bu çalışmada *A. maritima* bitkisinde bulunan fenolik maddeler HPLC-DAD cihazı ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. HPLC-DAD analizleri sonucunda *A. maritima* bitkisinde bulunan fenolik maddeler; kafeik asit, rutin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, resveratrol, luteolin, apigenin, kamferol, protokatekuik asit, epigallokateşin gallat, epikateşin gallat, naringenin, klorojenik asit, kamferol-3-glikozit ve vanilik asittir. *A. maritima* bitkisinin farklı çözücü ekstraktlarında bulunan fenolik maddelerin miktarları Tablo 4.5’de verilmiştir. Protokatekuik asit kloroform, etil asetat ve su fazında; vanilik asit sadece su fazında; epigallokateşin gallat kloroform ve etil asetat fazında; epikateşin gallat sadece kloroform fazında, naringenin kloroform ve etil asetat fazında; klorojenik asit klorofom, etil asetat, butanol ve su fazında; kafeik asit

etanol, etil asetat ve su fazında; *p*-kumarik asit hekzan dışındaki fazlarda; ferulik asit tüm fazlarda; rosmarinik asit etanol, klorofom ve etil asetat fazında; resveratrol etanol, etil asetat ve su fazında; rutin sadece etanol ve su fazında; kamferol-3-glikozit hekzan ve etil asetat fazında; luteolin ve kamferol etanol ve klorofom fazında; apigenin etanol ve hekzan fazında tayin edilmiştir. Tayin edilen protokatekuik asit ve vanilik asit hidroksibenzoik asit türeği; epigallokateşin gallat ve epikateşin gallat kateşin türeği; luteolin, naringenin, kamferol ve apigenin flavonoid türeği; klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulic asit ve rosmarinik asit sinnamik asit türeği; rutin ve kamferol-3-glikozit flavonoid glikoziti; resveratrol ise fitoaleksinin türeği bileşiktir.

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin analizi için ilk basamağı ekstraksiyon işlemi oluşturmaktadır. Yapılacak ekstraksiyon işlemi bitki, fenolik bileşik ve analitik yöntemle göre değişim göstermektedir. Ekstraksiyon öncesi bitkinin ezilmesi/öğütülmesi/preslenmesi sonucu yüzey alanı arttığı için ekstraksiyon çözücü ile bitkinin daha çok temas ettiği görülür. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler en basitten en karmaşık yapıya göre farklılık göstermektedir. Bunun dışında fenolik bileşiklerin protein, karbohidrat gibi yapılarla oluşturdukları kompleksleri de bulunmaktadır. Bu nedenle farklı çözücü ekstraktları farklı sınıf çözünürlüğe sahip fenolik bileşikleri içerebilmektedir. Doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerin çözünürlüğü fenoliklerin polimerizasyon derecesine, ekstraksiyon çözücüsünün polaritesine ve diğer bileşiklerle olan kimyasal etkileşimine göre değişir. Bu çalışmada *A. maritima* bitkisinden hazırlanan farklı polaritedeki çözücü ekstraktlarının farklı sınıf fenolik bileşik içermesi beklenen bir durumdur. Bu nedenle doğal ürünlerde fenolik maddelerin tayinlerinde farklı polaritedeki çözücülerinin kullanılması önemlidir. *A. maritima* bitkisinden hazırlanan farklı polaritedeki çözücü ekstraktlarına bakıldığında ferulik asit tüm ekstraktlarda bulunmaktadır. Tayin edilen fenolik maddeler için de en fazla ferulik asit  $47,97 \pm 0,07$  mg/g ekstrakt olarak etil asetat fazında bulunmaktadır. Antioksidan aktivite sonuçlarında en yüksek etil asetat ekstraktı bulunmuş olup, fenolik madde miktarı açısından da en fazla fenolik madde etil asetat ekstraktında HPLC-DAD cihazı ile belirlenmiştir. Bu nedenle spektroskopik (antioksidan aktivite sonuçları) ve kromatografik sonuçların birbirini tamamladığı görülmektedir. Benzer şekilde literatürde yapılan bir çalışmada da toplam antioksidan aktivite ve HPLC-DAD cihazı ile yapılan fenolik madde miktarı en fazla etanol ve etil asetat ekstraktlarında belirlenmiştir (35). Protokatekuik asit, epigallokateşin gallat, kafeik asit, *p*-kumarik asit,

ferulik asit, rosmarinik asit, resveratrol ve kamferol-3-glikozit en fazla etil asetat ekstraktında tayin edilmiştir. Ayrıca literatürde yapılan çalışmada *Achillea phrygia*'da yüksek miktarda klorojenik asit, sinapik asit, rutin, kuersetin, luteolin ve apigenin içerdiği belirlenmiştir (2). Aynı literatürde de klorojenik asit ve türevlerinin *Achillea* türlerinde de majör temel fenolik madde olduğu belirtilmiştir. Buna göre bulduğumuz sonuçlar literatür ile uyumludur. Ayrıca HPLC-DAD cihazı ile bulduğumuz fenolik madde miktarları ilgili literatürden daha yüksek bulunmuştur. Bu da uyguladığımız ekstraksiyon yönteminin daha verimli olarak fenolik maddeleri ekstrakte etmek için daha avantajlı olduğu sonucuna ulaşmamızı sağlamaktadır.

*A. maritima* ekstraktlarının farklı mikroorganizmalara karşı MİK değerleri Tablo 4.6'da sunulmuştur. Etanol ve kloroform fazları bakteri ve mayaya karşı benzer etki göstermiştir (MİK 2500 µg/mL). Hekzan fazı *S. aureus* (MİK 19 µg/mL) ve *E. fecalis* (MİK 39 µg/mL) gibi Gram pozitif bakterilere ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı (MİK 156 µg/mL) diğerlerinden daha fazla etkili bulunmuştur. Etil asetat fazı ise her bakteriye özgü etkili bulunmuştur. Butanol fazı ise, Gram pozitiflere göre (MİK 1250 µg/mL) Gram negatif çomak bakterilere karşı (MİK 625 µg/mL ve 39 µg/mL) daha etkili bulunmuştur. Su fazı ise tüm suşlara karşı stabil bir MİK (625 µg/mL) değerine sahip olmuştur.

MTT testi ekstraktların hem K562 ve Saos hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkilerini belirlemek, hem de sağlıklı hücreler üzerindeki toksisiteyi kontrol etmek için kullanıldı. *A. maritima* ekstraktlarının hücre hatlarına karşı İK50 değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir. K562 ve Saos hücrelerine karşı etanol ve kloroform fazları ekstraktlar arasında güçlü sitotoksik etki göstermiştir (sırasıyla 240, 280 ve 210, 240 µg/mL). Etil asetat fazı ise diğer iki ekstrakta göre az olsada yine güçlü aktivite göstermiştir (470, 360 µg/mL). Hekzan, su ve butanol fazları daha az etki göstermiştir. NIH-3T3 hücresine karşı ise sırasıyla etanol> etil asetat> kloroform fazlarının gösterdiği aktivite düşüktür. Hekzan, butanol ve su fazları sitotoksiste (İK50> 2,5 mg/mL) sergilememiştir. Ekstraktların K562 ve Saos hücre hatlarında farklı seviyede sitotoksiste gösterdiği, ekstraktların çoğu sağlıklı hücreler üzerinde toksik olmadığı tespit edilmiştir.

Tuzlu su karidesi toksisite çalışmaları tıbbi türlerin bitki ekstraktlarının sitotoksik olup olmadığını belirlemek için uygulanan bir yöntemdir. Tez kapsamında

yapılan çalışmada her bir ekstraktan 5-60 µL hacimlerde kullanılmıştır. Tablo 8'deki sonuçlara bakıldığında etil asetat, butanol ve su fazında negatif gruba göre canlılık sayısının çok değişmediği görülmektedir. Buna göre *A. maritima* bitkisinden hazırlanan etil asetat, butanol ve su fazı ekstraktlarının tuzlu su karidesi üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Ancak etanol, hekzan ve kloroform ekstraktlarının 20 µL hacimlerde tuzlu su karidesi üzerinde sitotoksik etkisi görülmüştür. Bu çalışmaya göre *A. maritima* bitkisinin sitotoksik açıdan en uygun ekstraktı etil asetat, butanol ve su fazı ekstraktlarıdır.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*Achillea* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, bu cinse ait türlerin çok sayıda biyolojik etkisinin olduğunu göstermektedir. Ülkemizde üzerinde fazla çalışmaların yoğunlaştığı *Achillea* türleri ise *A. millefolium*, *A. biebersteinii*, *A. santolina*, *A. falcata* ve *A. nobilis*'tir. Bu çalışma *Achillea* cinsine ait olup ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ve birçok yönü araştırılmamış *A. maritima*'nın farklı ekstraktlarının (etanol, hekzan, kloroform, etil asetat, butanol, su fazı) biyolojik aktivitelerini (antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik) incelemek ve içerdiği bileşikleri HPLC-DAD cihazı ile analiz etmek amacıyla yapılmıştır.

*A. maritima* türünün farklı çözücüler kullanarak elde edilen ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Fenolik madde içeriğinin de zengin olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı polaritedeki ekstrakt fazları, seçilen mikroorganizma ve hücre hatlarına karşı etkili bulunmuştur. Bu da antimikrobiyal ve kanser çalışmaları için potansiyel ilaç kaynağı olabileceğini göstermektedir. İlaç direnci gelişimi nedeniyle, büyük halk sağlığı sorunu olan suşlara karşı yüksek aktivite özellikle önemlidir. Tuzlu su karidesi toksisite çalışmalarına göre bitkiye ait daha uygun veya güvenli çözücü fazları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *A. maritima* ekstraktlarının umut verici antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri, *in vivo* ve klinik koşullar altında daha fazla araştırılmalıdır. Ayrıca, tespit edilen fenolik bileşiklerin haricinde bu türde bulunan diğer bileşiklerin saflaştırılıp yapısının aydınlatılması faydalı olacaktır. Farklı farmakolojik özellikleri belirlemek ve ayrıca bu türün ekstrakt ve bileşiklerinin çeşitli etki mekanizmalarını netleştirmek için farklı mikroorganizma ve hücreler üzerinde çalışmalar gereklidir.

## KAYNAKLAR

1. Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(19):5294–5299.
2. Zengin G, Bulut G, Mollica A, Haznedaroglu MZ, Dogan A, Aktumsek A. Bioactivities of *Achillea phrygia* and *Bupleurum croceum* based on the composition of phenolic compounds: In vitro and in silico approaches. *Food Chem. Toxicol.* 2017;107:597–608.
3. Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, Kang RKL. Biological activity of essential oils and their constituents. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 21. Elsevier; 2000:571–631.
4. Karaalp C, Yurtman AN, Karabay Yavasoglu NU. Evaluation of antimicrobial properties of *Achillea L.* flower head extracts. *Pharm. Biol.* 2009;47(1):86–91.
5. Abreu AC, McBain AJ, Simões M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 2012;29(9):1007.
6. Giorgi A, Mingozzi M, Madeo M, Speranza G, Cocucci M. Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb.). *Food Chem.* 2009;114(1):204–211.
7. Davis PH. *The Flora of Turkey and the East Aegean Islands: Vol.5.*; 1975.
8. Benedek B, Kopp B. *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. *Wien. Med. Wochenschr.* 2007;157(13–14):312–314.
9. Başer KHC. Essential Oils of *Achillea* Species of Turkey. 2016:14.
10. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*. Ankara; 1993.
11. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. *Türkiye Bitkileri Listesi(Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; 2012.
12. Mohammadhosseini M, Sarker SD, Akbarzadeh A. Chemical composition of the essential oils and extracts of *Achillea* species and their biological activities: A review. *J. Ethnopharmacol.* 2017;199:257–315.
13. Arabacı T. Türkiye’de yetişen *Achillea L.* (Asteraceae) cinsinin revizyonu. 2006. [<https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=THjGeAATGdWDYmcUKxbO9w&no=X0c9nC-bUsErWKqvFfZlFA>].
14. actaplantarum.org. Scheda IPFI, Acta Plantarum *Achillea maritima*. 2022. [[https://www.actaplantarum.org/flora/flora\\_info.php?id=5599&nnn=Achillea%20maritima](https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=5599&nnn=Achillea%20maritima)]. 15.3.2022 tarihinde erişilmiştir.
15. *Achillea maritima* (L.) Ehrend. & Y.P.Guo Georeferenced records. 2022. [<https://www.gbif.org/species/3120356>].
16. www.worldfloraonline.org. *Achillea maritima*. 2012. [<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000084908>]. 28.9.2022 tarihinde erişilmiştir.
17. Saeidnia S, Gohari A, Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *Daru J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.* 2011;19(3):173–186.



18. Abbet C, Mayor R, Roguet D, Spichiger R, Hamburger M, Potterat O. Ethnobotanical survey on wild alpine food plants in Lower and Central Valais (Switzerland). *J. Ethnopharmacol.* 2014;151(1):624–634.
19. Cavero RY, Akerreta S, Calvo MI. Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* 2011;137(1):844–855.
20. Tribess B, Pintarelli GM, Bini LA, Camargo A, Funez LA, de Gasper AL, et al. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 2015;164:136–146.
21. Savran A, Dural H. Pozantı (Adana) ve Çevresindeki Bazı Bitkilerin Yerel Adları ve Etnobotanik Özellikleri. :6.
22. Akan H, Bakır sade Y. Kahta (Adıyaman) Merkezi ve Narince Köyünün Etnobotanik Açısından Araştırılması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilim. Derg.* 2015;4(2). doi:10.17798/beufen.47724.
23. Dalar A, Mukemre M, Unal M, Ozgokce F. Traditional medicinal plants of Ağrı Province, Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 2018;226:56–72.
24. Arı S, Temel M, Kargioğlu M, Konuk M. Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 2015;11(1):84.
25. Sarper F, Akaydin G, Şimşek I, Yeşilada E. An Ethnobotanical Field Survey in the Haymana District of Ankara Province in Turkey. :10.
26. Polat R, Cakilcioglu U, Satıl F. Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl—Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 2013;148(3):951–963.
27. Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia - Soc. Behav. Sci.* 2011;19:756–777.
28. Mangisa M, Peter XK, Khosa MC, Fouche G, Nthambeleni R, Senabe J, et al. Ethnomedicinal and phytochemical properties of sesquiterpene lactones from *Dicoma* (Asteraceae) and their anticancer pharmacological activities: A review. *Sci. Afr.* 2021;13:e00919.
29. Quer PF. *Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado*. Editorial Labor; 1995.
30. Georgieva L, A G, D M, A P. Georgieva,2015.pdf. 2015:1347–1352.
31. Türkan F, Atalar MN, Aras A, Gülçin İ, Bursal E. ICP-MS and HPLC analyses, enzyme inhibition and antioxidant potential of *Achillea schischkinii* Sosn. *Bioorganic Chem.* 2020;94:103333.
32. Tuberoso CIG, Montoro P, Piacente S, Corona G, Deiana M, Dessì MA, et al. Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009;50(3):440–448.
33. Ertas A, Bog M, Hasi N, Yesi Y, Ren ACG. Antioxidant, anticholinesterase, and antimicrobial activities and fatty acid constituents of *Achillea cappadocica* Hausskn. et Bornm. *Turk J Chem* 2014;8.
34. Serdar G, Sökmen M, DemiR E, Sökmen A, Bektaş E. Extraction of antioxidative principles of *Achillea biserrata* M. Bieb. and chromatographic analyses. *Int. J. Second. Metab.* 2016;2(2):3–15.
35. Taşkın D, Taşkın T, Rayaman E. Phenolic composition and biological properties of *Achillea nobilis* L. subsp. *neilreichii* (Kerner) Formanek. *Ind. Crops Prod.* 2018;111:555–562.

36. Bina F, Daglia M, Santarcangelo C, Baeeri M, Abdollahi M, Nabavi SM, et al. Phytochemical profiling and ameliorative effects of *Achillea cretica* L. on rat model of endometriosis. *J. Ethnopharmacol.* 2020;254:112747.
37. Boutennoun H, Boussouf L, Rawashdeh A, Al-Qaoud K, Abdelhafez S, Kebieche M, et al. In vitro cytotoxic and antioxidant activities of phenolic components of Algerian *Achillea odorata* leaves. *Arab. J. Chem.* 2017;10(3):403–409.
38. Eruygur N, Koçyiğit UM, Taslimi P, Ataş M, Tekin M, Gülçin İ. Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract. *South Afr. J. Bot.* 2019;120:141–145.
39. Turkoglu I, Turkoglu S, Celik S, Kahyaoglu M. Antioxidant and antimicrobial activities of Turkish endemic *Achillea* species. 2010:10.
40. Gharibi S, Tabatabaei BES, Saeidi G, Goli SAH, Talebi M. Total phenolic content and antioxidant activity of three Iranian endemic *Achillea* species. *Ind. Crops Prod.* 2013;50:154–158.
41. Manayi A, Mirnezami T, Saeidnia S, Ajani Y. Pharmacognostical Evaluation, Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of the Roots of *Achillea tenuifolia* LAM. *Pharmacogn. J.* 2012;4(30):14–19.
42. Basile A, Rigano D, Sorbo S, Conte B, Rosselli S, Bruno M, et al. Antibacterial and antifungal activities of *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link essential oil from Sicily. *Nat. Prod. Res.* 2013;27(17):1548–1555.
43. Muselli A, Rossi P-G, Desjobert J-M, Bernardini A-F, Berti L, Costa J. Chemical composition and antibacterial activity of *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link essential oils from Corsica. *Flavour Fragr. J.* 2007;22(3):217–223.
44. Almadiy AA, Nenaah GE, Al Assiuty BA, Moussa EA, Mira NM. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016;69:529–537.
45. Hammad HM, Matar SA, Litescu S-C, Abuhamdah S, Al-Jaber HI, Afifi FU. Biological activities of the hydro-alcoholic and aqueous extracts of <i>Achillea fragrantissima</i> (Forssk.) grown in Jordan. *Nat. Sci.* 2014;06(01):23–30.
46. Cabral C, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Lopes MC, Salgueiro L. *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link as a source of a bioactive and fragrant oil. *Ind. Crops Prod.* 2013;43:484–489.
47. Beeby E, Magalhães M, Poças J, Collins T, Lemos MFL, Barros L, et al. Secondary metabolites (essential oils) from sand-dune plants induce cytotoxic effects in cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* 2020;258:112803.
48. Taghizadeh MS, Niazi A, Moghadam A, Afsharifar AR. Novel bioactive peptides of *Achillea eriophora* show anticancer and antioxidant activities. *Bioorganic Chem.* 2021;110:104777.
49. Saeidnia S, Gohari AR, Hadjiakhoondi A, Gohari MR, Afrapoli M. CYTOTOXICITY OF *Achillea talagonica* Boiss. and *A. tenuifolia* lam. *Int. J. Biol. Biotechnol.* 2006:3.
50. Cho Y-T, Su H, Wu W-J, Wu D-C, Hou M-F, Kuo C-H, et al. Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Vol 69. Elsevier; 2015:209–254.
51. Hossain MA, Al-Hdhami SS, Weli AM, Al-Riyami Q, Al-Sabahi JN. Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L grown in Sultanate of Oman. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2014;4:S368–S372.

52. Şahin SS, Oran S, Ahintürk PS, Demir C. Orthogonal signal correctionbased prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. 2012;10.
53. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26(9–10):1231–1237.
54. Şahin SS, Oran S, Ahintürk PS, Demir C, Öztürk SU. *Ramalina* Lichens and Their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant and Antimicrobial Agents. *J. Food Biochem.* 2015;7.
55. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ``Antioxidant Power``: The FRAP Assay. :7.
56. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard: M07-A8.* 8. Edition. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards; 2008.
57. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983;65(1–2):55–63.
58. McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. Atta-ur-Rahman. *Bench-Top Bioassays Discov. Bioact. Nat. Prod. Update Struct. Chem. Part-B” Elsevier Sci. Neth.* 1991;9:383–409.
59. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *J. Ethnopharmacol.* 2011;137(1):121–140.
60. Salah N, Casabianca H, Jannet H, Chenavas S, Sanglar C, Fildier A, et al. Phytochemical and Biological Investigation of Two *Diplotaxis* Species Growing in Tunisia: *D. virgata* & *D. erucoides*. *Molecules* 2015;20(10):18128–18143.
61. Sevindik HG, Güvenalp Z, Yerdelen KÖ, Yuca H, Demirezer LÖ. The discovery of potential anticholinesterase compounds from *Achillea millefolium* L. *Ind. Crops Prod.* 2015;76:873–879.



