

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

**ENDEMİK *MARRUBIUM ROTUNDIFOLIUM* BOISS. BİTKİSİNİN TOTAL
EKSTRESİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN VE BİYOAKTİVİTE
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Biyolog
Seden CİN**

**Danışman
Doç. Dr. Şüra BAYKAN**

**İZMİR
2018**

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

**ENDEMİK *MARRUBIUM ROTUNDIFOLIUM* BOISS. BİTKİSİNİN TOTAL
EKSTRESİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN VE BİYOAKTİVİTE
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**Biyolog
Seden CİN**

**Danışman
Doç. Dr. Şüra BAYKAN**

**İZMİR
2018**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Şüra BAYKAN
(Danışman)

.....

Üye : Doç. Dr. Bintuğ ÖZTÜRK

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil KOYU

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, hiç bir yardımı esirgemeyen, sabır ve hoşgörü ile yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Şüra BAYKAN'a sonsuz teşekkürler.

Arazi çalışmalarında, uçucuyağ analizlerinde ve eğitimim süresince her türlü destek veren Doç. Dr. Bintuğ ÖZTÜRK'e çok teşekkürler. Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Canan KARAALP'e desteğinden dolayı teşekkür ederim. Tüm laboratuvar çalışmalarında ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bana her zaman ağabeylik yapan Arş. Gör. Dr. Serdar DEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Ecz. Halil KOYU'ya çok teşekkürler. Antioksidan ve sitotoksisite çalışmalarımı yürüten ve hiç bir yardımı esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Fadime AYDIN KÖSE'ye teşekkür ederim. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları sırasında katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmail ÖZTÜRK 'e teşekkür ederim. YBSK analizlerinde yardımcı olan Yük. Müh. Çiğdem YENGİN'e teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında ve arazi çalışmalarında bilgisiyle ve arkadaşlığıyla yanımda olan Uzm. Biol. Tuğçe DEMİRÖZ ve Arş. Gör. Gökay ALBAYRAK'a çok teşekkürler. Tez sürecimde yanımda olan Uzm. Fzt. Yusuf EMÜK'e, tüm değerli hocalarıma, tüm arkadaşlarıma ve Farmasötik Botanik ailesine en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 17/Ecz/11 desteklenmiştir.

En büyük teşekkürüm ise tüm hayatım boyunca en içten sevgi ile yanımda olan, maddi manevi her türlü desteği sağlayan aileme. Size minnettarım. İyi ki varsınız.

İZMİR-2018

**Biyolog
Seden Cin**

Özet

Endemik *Marrubium rotundifolium* Boiss. Bitkisinin Total Ekstresinin Kimyasal İçeriğinin ve Biyoaktivite Potansiyelinin Araştırılması

Marrubium L. (Lamiaceae) cinsinin dünyada toplam takson sayısı yaklaşık 40'tır. Bunların 21 tanesi Türkiye'de bulunup büyük çoğunluğu endemiktir. Anadolu'da "bozotu, bozkaşık, karaderma" olarak bilinen, *Marrubium* L. cinsinin farklı türleri ile yapılan etnobotanik çalışmalar sonucu, bu türlerin halk arasında idrar söktürücü, göğüs yumuşatıcı, soğuk algınlığında, antipiretik ve ağrı kesici olarak kullanımları ortaya konmuştur. Farklı *Marrubium* türlerinin analjezik, sitotoksik, antienflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir.

Marrubium türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda ana bileşik grupları olarak diterpenler, flavonoidler, uçucuyağlar, fenilpropanoid esterleri ve feniletanoid glikozitleri izole edilmiştir.

Marrubium rotundifolium Boiss. Ege Bölgesi'nde yayılış gösteren endemik bir türdür. Bu çalışmada bitkinin toprak üstü kısımlarıyla elde edilen metanol, etilasetat ve hekzan ekstrelerinin kimyasal bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla; İTK (ince tabaka kromatografi), YBSK (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi), ve GC-MS (gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi) kromatografik yöntemleri uygulanmış olup, ekstrelerin biyoaktivite çalışması yapılmıştır.

İTK ve YBSK yöntemi ile karşılaştırma yaptığımız standart maddeler tespit edilememiştir. Uçucuyağ analizinde majör bileşikler olarak germakren-D (% 24.80), β -karyofillen (% 23.39), karyofillen oksit (% 16.69) tanımlanmıştır.

Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenolik içerik tayininde n- hekzan ve etilasetat ekstresinde fenolik madde içeriği gözlenmemiş olup, metanol ekstresinde $20,62 \pm 1,6$ GAE $\mu\text{g}/\text{mg}$ değerinde fenolik içeriği gözlemlenmiştir.

Aluminyum klorid/potasyum asetat metodu ile yapılan toplam flavonoid içerik tayininde elde edilen sonuçlara göre, metanol ve etilasetat ekstrelerinde flavonoid içeriği sırasıyla 70,76 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$ ve 142,58 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$ iken en yüksek flavonoid içeriği n-hekzan ekstresinde gözlemlenmiş olup 168,63 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$ 'dir.

OH⁻ ABTS ve DPPH radikal süpürücü etki çalışmalarında *M. rotundifolium* metanol ekstresi daha düşük dozlarda yüksek etki değerleri göstermiştir (Sırasıyla; $0,277 \pm 0,024$, $3,21 \pm 0,081$, $0,033 \pm 0,001$ mg/ml).

Bitki ekstralarının *in vitro* sitotoksitelerini belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmış olup 3 adet kanser (CaCo-2, SHSY5Y ve PC-3) ve 2 adet kanser olmayan hücre hattı (NIH-3T3, HK-2) üzerinde ekstralarda anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında *Staphylococcus aureus*'a karşı sadece etilasetat ekstresi (128 µg/ml) antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Enterococcus faecalis* bakteri suşuna karşı hem etilasetat hem de hekzan ekstraları aynı değerde aktivite göstermiş (128 µg/ml), *Bacillus subtilis*' e karşı metanol ve hekzan ekstraları (her biri 128 µg/ml) antimikrobiyal etki göstermiştir. *M. rotundifolium* ekstraları sadece Gram (+) bakteri suşlarına karşı etki göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma *M. rotundifolium* bitkisinin fitokimyasal ve biyoaktivite özelliklerini inceleyen bir çalışmadır. Bitkinin antioksidan etki potansiyeli bulunmakla birlikte zayıf antimikrobiyal ve sitotoksik etkili olduğu gözlenmiştir. Yapılan İTK çalışmaları ile bitkinin tüm ekstralarının kimyasal içeriğinin çok zengin olduğu görülmüştür. Bu nedenle bitkideki bileşikler tespit edebilmek amacı ile ileri fraksiyonlama ve saflaştırma çalışmaları yapılması planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Marrubium rotundifolium*; uçucuyağ; sitotoksitite; antioksidan; antimikrobiyal; flavonoid; fenolik asit

Abstract

Investigation of Chemical Composition and Bioactivity Potential of Total Extract of Endemic *Marrubium rotundifolium* Boiss.

Marrubium L. (Lamiaceae) has 40 taxons in the world. It is represented by 21 taxons in Turkey, the better part of which are endemic. Different *Marrubium* species, known as “bozotu, bozkaşık, karaderma”, are used traditionally as diuretic, carminative, expectorant in Anatolia. Antioxidant, cytotoxic, analgesic and anti-inflammatory effects of various *Marrubium* sp. were reported previously.

As a result of phytochemical studies on *Marrubium* species, diterpenes, flavonoids, volatile oils, phenylpropanoid esters and phenylethanoid glycosides were isolated as main phytochemical groups.

Marrubium rotundifolium Boiss. is an endemic species and distributed in Aegea. In this study, in order to determine the chemical components of methanol, ethylacetate and hexane extracts obtained from the air part of the plant, chromatographic methods such as TLC (thin layer chromatography), HPLC (high pressure liquid chromatography) and GC-MS (gas chromatography- mass spectrometry) were used and bioactivity of extracts were investigated.

The tested substances could not be detected with the TLC and HPLC. Germacrene-D (24.80 %), β -caryophyllene (23.39 %) and caryophyllene oxide (16.69 %) were identified as major compounds in the analysis of volatile oil.

Phenolic content was not observed in the *n*-hexane and ethylacetate extracts when the total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method when phenolic contents of $20,62 \pm 1,6$ GAE $\mu\text{g}/\text{mg}$ were observed in the methanol extract.

According to the results of the determination of total flavonoid content by aluminum chloride / potassium acetate method, flavonoid contents in methanol and ethylacetate extracts were 70,76 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$ and 142,58 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively, whereas the highest flavonoid content was observed in *n*-hexane extract 168,63 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$.

In the $\text{OH}^\cdot$, ABTS and DPPH radical scavenging activity studies, *M. rotundifolium* methanol extract showed higher IC_{50} values at lower doses (0.277 ± 0.024 , 3.21 ± 0.081 , 0.033 ± 0.001 mg/ml, respectively).

MTT method was used to determine in vitro cytotoxicity of plant extracts and no significant results were found in extracts on 3 cancers (CaCo-2, SHSY5Y and PC-3) and 2 non-cancer cell lines (NIH-3T3, HK-2).

Only ethylacetate extract (128 µg/ml) showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* in the study of antimicrobial activity by microdilution method. Methanol and hexane extracts (128 µg/ml each) showed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, both ethylacetate and hexane extracts (128 µg/ml) showed the same antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* bacterial strain. *M. rotundifolium* extracts only showed activity against Gram (+) bacterial strains.

In conclusion, this study is which examines phytochemical and bioactivity properties of *M. rotundifolium* plant. It has been observed that the plant has a weak antimicrobial and cytotoxic effect with potential for antioxidant effect. It has been seen that the chemical content of all extracts of the plant were very rich with the studies made by the TLC. Therefore, it is planned to carry out further fractionation and purification studies in order to identify the compounds in the plant.

Keywords: *Marrubium rotundifolium*; essential oil; cytotoxicity; antioxidant; antimicrobial; flavonoid; phenolic acid

İçindekiler

Önsöz	I
Özet	II
Abstract	IV
İçindekiler	VI
Şekiller Dizini	IX
Resimler Dizini	X
Tablolar Dizini	XI
Kısaltmalar Listesi	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Lamiaceae Familyası Genel Taksonomik ve Botanik Özellikleri	2
2.2. <i>Marrubium</i> L. Cinsi	5
2.2.1. <i>Marrubium</i> L. Cinsinin Genel Taksonomik Özellikleri	5
2.2.2. <i>Marrubium</i> L. Cinsinin Genel Botanik Özellikleri	8
2.2.3. <i>Marrubium</i> L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri.....	8
2.2.4. <i>Marrubium</i> L. Taksonlarının Halk Arası Kullanımı.....	19
2.2.5. <i>Marrubium</i> L. Taksonları Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları	20
2.3. <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss. Bitkisinin Genel Botanik Özellikleri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Kullanılan Aletler.....	27
3.2. Fitokimyasal Çalışmalar	28
3.2.1 Bitkisel Materyal	28
3.2.2. Ekstraksiyon İşlemleri	28
3.2.3. Kromatografik Yöntemler	30

3.2.3.1 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	30
3.2.3.2 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	31
3.2.3.3. Gaz Kromatografisi (GC) ve Kütle Spektroskopisi (MS)	34
3.3. Biyoaktivite Çalışmaları	35
3.3.1 Sitotoksikite	35
3.3.2 Antioksidan Tarama Yöntemleri	37
3.3.2.1 Total Fenolik İçeriği Tayini.....	38
3.3.2.2 Total Flavonoid İçeriği Tayini.....	40
3.3.2.3 Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAK) Tayini.....	42
3.3.2.4 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi.....	45
3.3.2.5 OH ⁻ Radikali Süpürücü Aktivite	46
3.3.3 Antimikrobiyal Aktivite Testleri	47
4. BULGULAR.....	50
4.1. Fitokimyasal Bulgular.....	50
4.1.1. İTK ve YBSK Analiz Bulguları	50
4.1.2. GC/ GC-MS Analiz Bulguları	52
4.2. Biyoaktivite Çalışmaları	56
4.2.1. Sitotoksikite Bulguları	56
4.2.2. Antioksidan Aktivite Testi Sonuçları	58
4.2.2.1. Total Fenolik İçerik Testine Ait Bulgular	58
4.2.2.2.Total Flavonoid İçerik Testine Ait Bulgular	59
4.2.2.3. Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAK) Testine Ait Bulgular.....	60
4.2.2.4 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi.....	61
4.2.2.5 OH ⁻ Radikali Süpürücü Aktivite	62
4.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analiz Bulguları.....	63
5. TARTIŞMA	65

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	73
8. ÖZGEÇMİŞ	82



Şekiller Dizini

Şekil 1: <i>Marrubium</i> türlerinde bulunan diterpenler	9
Şekil 2: Marrubiin kimyasal yapısı	12
Şekil 3: <i>Marrubium</i> türlerinden en çok elde edilen flavonoid ve fenolik bileşikler..	13
Şekil 4: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin persülfat ile oksidasyonu.....	43
Şekil 5: DPPH• radikalinin kimyasal formülü	46
Şekil 6: Marrubiin – Asidik solvan ekstresi YBSK kromatogramı	51
Şekil 7: <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss. Uçucuyağının Gaz Kromatografisi	53
Şekil 8: C8- C20 Alkan Karışımları.....	54
Şekil 9: Ekstrelerin PC-3 hücre hattına karşı gösterdiği etkinlik grafiği	57
Şekil 10: Ekstrelerin NIH- 3T3 hücre hattına karşı gösterdiği etkinlik grafiği	57
Şekil 11: Galik Asit Standart Eğri Grafiği.....	58
Şekil 12: Kersetin Standart Eğri Grafiği.....	59
Şekil 13: Troloks Standart Eğri Grafiği	61
Şekil 14: Askorbik Asit Standart Eğri Grafiği.....	62

Resimler Dizini

Resim 1: <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss.....	25
Resim 2: <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss. n- hekzan ekstresi.....	29
Resim 3: <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss. n-hekzan, etilasetat, metanol ekstreleri İTK profilleri.....	31
Resim 4: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı	33
Resim 5: Kombine çalışan GC- MS, GC- FID ve Otomatik Örnekleyici Sistemi	34
Resim 6: Total Fenolik İçeriğine Bağlı Renk Değişimi	40
Resim 7: Total Flavonoid İçeriğine Bağlı Renk Değişimi	42
Resim 8: TEAK uygulaması sırasında çözeltilerin renk değişimi.....	45
Resim 9: Etilasetat ve hekzan ekstresi – marrubiin karşılaştırması.....	50

Tablolar Dizini

Tablo 1: Türkiye’de Lamiaceae Familyasında Bulunan Cinsler	4
Tablo 2: Türkiye’de yayılış gösteren <i>Marrubium</i> taksonları	6
Tablo 3: <i>Marrubium</i> türlerinden elde edilen diterpen türevleri.....	10
Tablo 4: <i>Marrubium</i> türlerinden elde edilen flavonoid - fenolik bileşikler	14
Tablo 5: Ekstre Miktarları ve Verimleri	29
Tablo 6: Gradient Programı.....	32
Tablo 7: Avrupa Farmakopesine göre gradient programı	33
Tablo 8: Stok gallik asit çözeltisi	39
Tablo 9: Stok kersetin çözeltisi	41
Tablo 10: <i>Marrubium rotundifolium</i> Boiss. Uçucuyağ Bileşik Listesi	55
Tablo 11: Ekstrelerin çeşitli hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini gösteren IC ₅₀ değerleri (µg/ml)	57
Tablo 12: Gallik asit konsantrasyonu	58
Tablo 13: Kersetin Konsantrasyonu	59
Tablo 14: Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid madde içerikleri	60
Tablo 15: Troloks Konsantrasyonu	60
Tablo 16: Askorbik asit Konsantrasyonu	61
Tablo 17: Ekstrelerin OH ⁻ Radikali Süpürücü etkisi, ABTS radikali süpürücü etkisi ve DPPH aktivite değerleri.....	62
Tablo 18: Ekstrelerin antimikrobiyal etkinlik değerleri	64

Kısaltmalar Listesi

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonat)
AI	Aritmetik indis
CaCo-2	Kolon adenokarsinoma hücre hattı
CEBN 38	Krizeriol- 7- glukozit
CFU/ml	Coloni-Forming Units (koloni oluşturan ünite)
COX	Siklooksijenaz
CoxB- 3	Coxsackie B virüsü tip 3
CUPRAC	Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite
CPE	Sitopatik etki
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-diphenyl-1- pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtAs	Etilasetat
FCR	Folin Ciocalteu Reaktifi
FBS	Fetal Bovine Serum (sığır serumu)
FeSO ₄ -	Demir sülfat
FM3	İnsan melonoma hücre hattı
GAE	Gallik asit eşdeğeri
Gr	Gram
GC	Gaz Kromatografisi
GC- MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCMV	İnsan sitomegalavirüsü
HCT- 116	Kolon kanseri hücre hattı
Hex	Hekzan
HK- 2	İnsan böbrek tübüler epitel hücre hattı
HeLa	Serviks adenokarsinoma hücre hattı
IC ₅₀	%50 inhibitör konsantrasyon
İTK	İnce tabaka kromatografisi

KI	Kovarts İndis
MCF- 7	Meme epitelyal karsinoma hücre hattı
MeOH	Metanol
Mg	Miligram
Mm	Milimolar
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	[3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H-tetrazolyumbromid]]
Nm	Nanometre
NIH- 3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
NP	Difenilboriloksietilamin (Naturstoff)
OH ⁻	Hidroksil radikali
PC3	Prostat kanser hücre hattı
PEG	Polietilenglikol
Ppm	Parts per million (milyonda bir kısım)
QE	Kesetin eşdeğeri
RI	Retention time
RNT	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücre hattı
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	2-tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloro asetik asit
TEAK	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TRAP	Toplam radikal tuzaklayıcı parametre
Troloks	6-hidroksi-2,5,7,8-tetranetilkroman-2-karboksilik asit
UV	Ultraviole
V/S	Vanilin-sülfirik asit reaktifi
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

1. GİRİŞ

Lamiaceae familyasında bulunan *Marrubium* L. cinsine ait türlerin birçoğunun yayılışı İran-Turan, Akdeniz fitocoğrafik bölgelerinde olup, dünya üzerinde cinsin yaklaşık 40 türü mevcuttur. Ilıman bölgelerde yayılış gösteren bu türler, çok yıllık otsu bitkilerdir (1, 2).

Marrubium cinsi ilk defa Linneaus tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Boissier tarafından “Flora Orientalis” adlı eserinde çoğu Anadolu’dan olmak üzere 32 tür belirtilmiştir. Cinsi Türkiye Florası’na Cullen hazırlamıştır.

Türkiye florasında son revizyonlarla birlikte toplam 21 tür bulunmaktadır. Cinsin dünyada bulunan tür sayısının çoğu Türkiye’de yayılış gösterip bunların yarıdan çoğu endemiktir. Bu da cinsin gen merkezinin Türkiye olduğunu göstermektedir (2-5).

Anadolu’da “bozotu, bozkaşık, karaderma” olarak bilinen, *Marrubium* L. cinsinin farklı türleri ile yapılan etnobotanik çalışmalar sonucu, bu türlerin halk arasında idrar söktürücü, göğüs yumuşatıcı, soğuk algınlığında, antipiretik ve ağrı kesici olarak kullanımları ortaya konmuştur (6-8).

Farklı *Marrubium* türlerinin analjezik (9-11), sitotoksik (12-14), antienflamatuvar (15, 16), antioksidan (17-20) ve antimikrobiyal (14, 21, 22) etkileri bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir.

Marrubium türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda ana bileşik grupları olarak diterpenler (özellikle labdan tip diterpenler) (12, 23-26), flavonoidler (27, 28) , uçucuyağlar (20, 29-33), fenilpropanoid esterleri (34) ve feniletanoid glikozitleri izole edilmiştir (12, 20, 27, 28, 31, 34, 35).

Marrubium rotundifolium Boiss. Ege Bölgesi’nde yayılış gösteren endemik bir bitkidir. Yapılan literatür taramasında türe ait herhangi bir kimyasal çalışma bulunmamakla birlikte bir tane biyoaktivite çalışması (36) ile iki tane etnobotanik çalışmaya rastlanmıştır (37, 38). Bu çalışma ile ilk kez bitkinin kimyasal içeriği, antimikrobiyal ve sitotoksikite potansiyelleri ile antioksidan potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lamiaceae Familyası Genel Taksonomik ve Botanik Özellikleri

Dünyada yaklaşık 250 cins ile temsil edilen Lamiaceae familyasında 7000 tür mevcuttur. Bu familya üyeleri başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere Avustralya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da yoğun yayılım göstermektedir. Türkiye Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biridir. Bu familya ülkemizde 45 cinsten yaklaşık 574 tür, 735'in üstünde takson ile temsil edilir. Ülkemizdeki endemizm oranı yaklaşık % 44,5 olan bu familya, içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü, tür sayısı bakımından en zengin dördüncü familyası konumundadır (39, 40).

Familya üyeleri, bir veya çok yıllık otsular, nadiren çalılar veya ağaçlardır. Gövde ve dallar genellikle 4 köşelidir ve bu özellik familya için karakteristiktir (41). Bu familyanın önemli özelliklerinden birisi de gövdelerinde epidermis altında köşe kollenkiması ve uçucuyağ salgılayan lamiaceae tip salgı tüylerinin bulunmasıdır. Bu salgı tüyünün özelliği 8 adet baş hücresi, 1 adet sap hücresi taşımasıdır.

Karşılıklı veya dairesel dizilişli yapraklar, basit veya bileşik, stipulasızdır. Çiçekler yaprak koltuklarında kimoza veya rasemus durumunda toplanmış, erdişi olup zigomorf simetridir. Kaliks 5 sepalli, birleşik bazen 2 dudaklıdır. Korolla 5 petalli, birleşik 2 dudaklı veya bazen üst dudak körelmiş, alt dudak 3 lobludur. Stamenler 2 veya 4, korollaya bağlı, genellikle didinam tiptir. Pistil 1, ovaryum üst durumlu, 4 loplulu, 2 lokuslu ve karpelli, ovüller 4, anatrop, plasentasyon bazal veya eksenseldir. Ginobazik tip stilus bulunur. Meyvesi tipik olarak 4 nutletten oluşmuş ve şizokarp tiptir (42).

Familyanın genel çiçek formülü: **z.K₍₅₎.C₍₅₎.A₄.G₍₂₎** (41).

Familya içindeki cinslerin ayrımında ise; bitkinin tek veya çok yıllık oluşu; otsu, çalimsı vb form yapısı; tüylerin varlığı, tüy tipleri ve konumu, kaliks boyu ve damarlanma durumu, dişlerinin yapısı; korollanın biçimi ve rengi, tüy durumu ve tüy yapısı, korollanın dudak ve diş yapılarındaki sayı ve şekil farkları, indirgenmiş veya körelmiş kısımları; stamen sayısı ve yapısı, stamenlerin korollanın üst dudağına göre konumu ayırt edici karakterler olarak kullanılır (43).

Kozmopolit olan Lamiaceae familyası üyelerinin çoğu özellikle uçucuyağlar ve diğer sekonder metabolitler (terpenoidler, flavonoidler ve fenolik bileşikler) bakımından zengin olması sebebiyle; tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi

alanlarda oldukça büyük öneme sahiptir (44). Diğ r taraftan bu familya üyelerinin ülkemizde halk arası kullanımı da oldukça yaygındır. Bu familyanın bilinen önemli cinsleri: *Thymbra*, *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Mentha*, *Teucrium*, *Ballota*, *Stachys*, *Salvia*, *Ajuga*, *Prunella*, *Melissa*, *Lamium*, *Sideritis* ve ***Marrubium***'dur.



Tablo 1: Türkiye’de Lamiaceae Familyasında Bulunan Cinsler

1. <i>Ajuga</i> Linne	16. <i>Ballota</i> Linne	31. <i>Calamintha</i> Miller
2. <i>Teucrium</i> Linne	17. <i>Marrubium</i> Linne	32. <i>Clinopodium</i> Linne
3. <i>Rosmarinus</i> Linne	18. <i>Sideritis</i> Linne	33. <i>Acinos</i> Miller
4. <i>Lavandula</i> Linne	19. <i>Stachys</i> Linne	34. <i>Micromeria</i> Benth
5. <i>Prasium</i> Linne	20. <i>Melissa</i> Linne	35. <i>Cyclotrichium</i> (Boiss.) Manden. & Scheng.
6. <i>Scutellaria</i> Linne	21. <i>Nepeta</i> Linne	36. <i>Thymus</i> Linne
7. <i>Melittis</i> Linne	22. <i>Glechoma</i> Linne	37. <i>Coridothymus</i> Reichb. fil.
8. <i>Eremostachys</i> Bunge	23. <i>Dracocephalum</i> Linne	38. <i>Thymbra</i> Linne
9. <i>Phlomis</i> Linne	24. <i>Lallemantia</i> Fisch. & Mey.	39. <i>Mentha</i> Linne
10. <i>Lamium</i> Linne	25. <i>Hymenocrater</i> Fisch. & Mey.	40. <i>Lycopus</i> Linne
11. <i>Wiedemannia</i> Fisch.&Mey.	26. <i>Hyssopus</i> Linne	41. <i>Ziziphora</i> Linne
12. <i>Galeobdolon</i> Hudson	27. <i>Prunella</i> Linne	42. <i>Salvia</i> Linne
13. <i>Galeopsis</i> Linne	28. <i>Origanum</i> Linne	43. <i>Dorystoechas</i> Boiss. & Heldr
14. <i>Leonurus</i> Linne	29. <i>Pentapleura</i> Hand.-Mazz.	44. <i>Elsholtzia</i> Willd.
15. <i>Moluccella</i> Linne	30. <i>Satureja</i> Linne	45. <i>Ocimum</i> Linne

2.2. *Marrubium* L. Cinsi

2.2.1. *Marrubium* L. Cinsinin Genel Taksonomik Özellikleri

Alem	: Plantae
Bölüm	: Tracheophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Altsınıf	: Asteridae
Takım	: Lamiales
Aile	: Lamiaceae
Cins	: <i>Marrubium</i> L.

Lamiaceae familyasında yer alan *Marrubium* L. cinsinin dünyada toplam takson sayısı 40 olup, bunların 21 tanesi Türkiye’de bulunmaktadır. Bu taksonlardan 15 tanesi Türkiye endemiğidir (endemizm oranı: %57) ve endemizm oranının yüksek oluşu, Anadolu’nun bu cins için önemli bir gen merkezi olabileceğini göstermektedir (2, 5, 45).

Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* taksonları (4) Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* taksonları

<u>Takson adı</u>	<u>Türkçe Adı</u>	<u>Genel Yayılış Alanları</u>
<i>Marrubium anisodon</i>	yayotu	D. Karadeniz Bölümü, İç B. Anadolu Bölümü, Antalya Bölümü, Hakkari Bölümü
<i>Marrubium astracanicum</i> • <i>M. astracanicum</i> subsp. <i>astracanicum</i> ❖ <i>M. astracanicum</i> subsp. <i>macrodon</i> (E)	mor yayotu • mor yayotu (dağ çayı) ❖ koca yayotu	• G. Marmara Bölümü, Karadeniz Bölgesi, Y. Sakarya Bölümü, D. Anadolu Bölgesi, Akdeniz Bölgesi ❖ Ege Bölgesi, Y. Fırat Bölümü, Antalya Bölümü
<i>Marrubium bourgaei</i> • <i>M. bourgaei</i> subsp. <i>bourgaei</i> (E) ❖ <i>M. bourgaei</i> subsp. <i>caricum</i> (E)	bozkaşık • bozkaşık ❖ akkaşık	• Antalya Bölümü ❖ Asıl Ege Bölümü
<i>Marrubium catariifolium</i>	boz yayotu	Erzurum – Kars Bölümü
<i>Marrubium cephalanthum</i> (E)	başlı bozot	O. Karadeniz Bölümü, O. ve Y. Kızılırmak Bölümleri, Adana Bölümü
<i>Marrubium cordatum</i>	yayla dermesi	Y. Murat – Van ve Hakkari Bölümleri
<i>Marrubium cuneatum</i>	elkurtaran	Y. Fırat, Y. Murat – Van ve Hakkari Bölümleri, GD. Anadolu Bölgesi
<i>Marrubium depauperatum</i> (E)	yoksulderme	O. Kızılırmak Bölümü
<i>Marrubium eriocephalum</i>	-	Van- İspiriz dağı (5)
<i>Marrubium globosum</i> • <i>M. globosum</i> subsp. <i>globosum</i> (E)	bozcaboğum • bozcaboğum (boz ot)	• O. Karadeniz Bölümü, O. ve Y. Kızılırmak Bölümleri, Asıl Ege Bölümü, Y. Fırat Bölümü, Akdeniz Bölgesi, GD. Anadolu Bölgesi

<i>Marrubium lutescens</i> • <i>M. lutescens</i> subsp. <i>lutescens</i> (E) ❖ <i>M. lutescens</i> subsp. <i>micranthum</i> (E)	sarıderme • sarıderme ❖ akderme	• Ege Bölgesi, Konya Bölümü, Akdeniz Bölgesi ❖ Akdeniz Bölgesi
<i>Marrubium heterodon</i> (E)	köşeli bozotu	O. Karadeniz Bölümü, Akdeniz Bölgesi
<i>Marrubium parviflorum</i> • <i>M. parviflorum</i> subsp. <i>oligodon</i> (E) ❖ <i>M. parviflorum</i> subsp. <i>parviflorum</i>	bozotu • küllü bozotu ❖ bozotu (dağ çayı,köpek otu)	• İç B. Anadolu Bölümü, Y. Sakarya ve O. Kızılırmak Bölümü, Erzurum – Kars Bölümü, Y. Murat – Van ve O. Fırat Bölümü ❖ Türkiye
<i>Marrubium peregrinum</i>	yabaniderme (boz ot)	Marmara Bölgesi, Asıl Ege Bölümü
<i>Marrubium persicum</i>	tuzcaboğum	Erzurum – Kars Bölümü
<i>Marrubium rotundifolium</i> (E)	kalartopu	Asıl Ege Bölümü
<i>Marrubium sivasense</i> (E)	kukasotu	Y. Kızılırmak Bölümü
<i>Marrubium trachyticum</i> (E)	itsineği	O. Karadeniz Bölümü, Y. Sakarya ve Y. Kızılırmak Bölümleri
<i>Marrubium vanense</i> (E)	van dermesi	Y. Murat – Van Bölümü
<i>Marrubium vulcanicum</i> (E)	ağrı dermesi	Y. Murat – Van Bölümü
<i>Marrubium vulgare</i>	karaderme (boz otu,it sineği,yalancı ısırgan,kara derme,köpek otu,mayasıl otu,kukas otu)	G. Marmara Bölümü, Batı Karadeniz Bölümü, Ege Bölgesi, Akdeniz Bölgeleri, O. Fırat Bölümü

(E) : Endemik türler

2.2.2. *Marrubium* L. Cinsinin Genel Botanik Özellikleri

Marrubium L. taksonları bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar dişli ve çok tüylüdür. Kaliks ters konik, dar ve 5-10-30 dişlidir. Korolla beyaz, sarımsı veya mor renkte, 2 dudaklıdır. Stamenler 4 adet, korolla tüpünün içindedir. Nutlet pürüzsüz, tepe noktasında kesik veya yuvarlaktır. Kaliks dişlerinin sayısı geleneksel sınıflandırmada önemli bir özelliktir. Bazı türlerin kaliks diş sayısı 10 veya daha fazla, bazı türlerinki 5, 6 veya 7, bazı türlerin ise 5'tir.

Marrubium türlerinin tüyleri genellikle çok karmaşıktır; temelde bunlar stellat (yıldızimsı) tiptedir, ancak sıklıkla yanal dallar çok küçüktür ve merkez dal çok uzundur, böylece indumentum (tüylerle kaplı örtü) çok yoğun olduğunda ve kalın olduğunda, tüyler yüzeysel olarak basit görünür. Çok dikkatli teşhis etmek gerekir. Çoğu türde basit tüyler üst yaprak yüzeyinde bulunur (46).

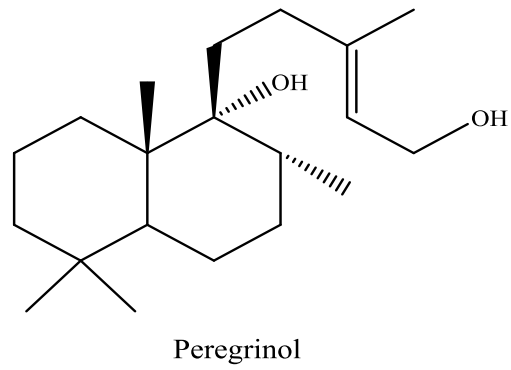
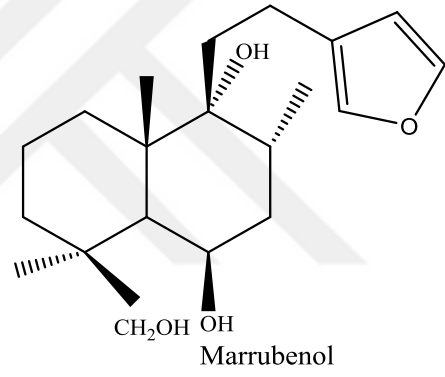
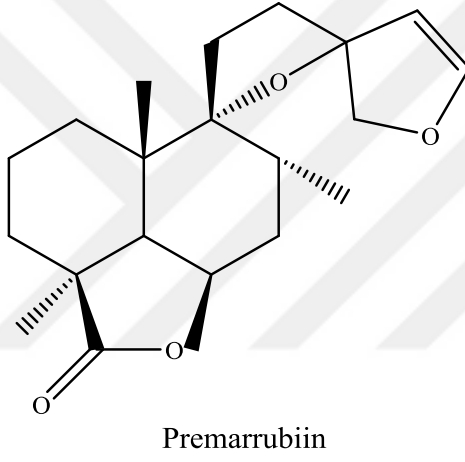
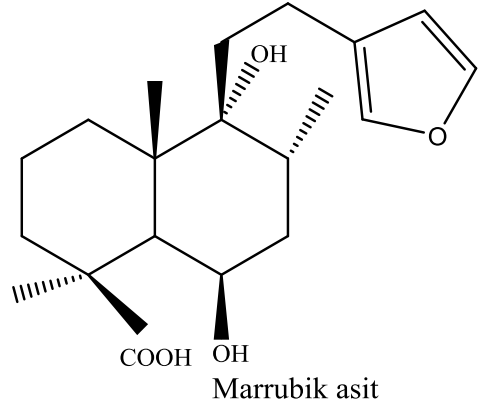
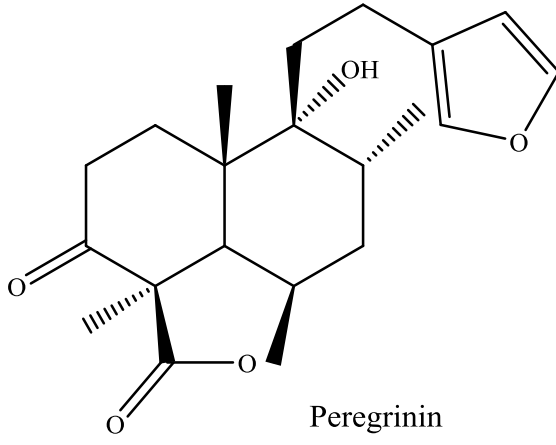
2.2.3. *Marrubium* L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri

Marrubium türlerinin genel kimyasal bileşik gruplarını; diterpenler (majör grup olarak labdan tip diterpenler), flavonoidler, fenilpropanoid glikozitleri, feniletanoid glikozitleri ve fenolik asitler oluşturmaktadır. Bununla birlikte uçucuyağlarının elde edildiği ve kimyasal yapısının aydınlatıldığı çok sayıda çalışma da mevcuttur.

1. Diterpenler

Diterpenler dört izopren (2- metil buta-1,3 dien) ünitesinden oluşmuş, 20 karbonlu yapıya sahip doğal bileşik gruplarından. *Marrubium* L. cinsinin ana bileşik gruplarından olan labdan tip diterpenler ise bisiklik diterpenler grubundan olup lakton halkasına sahiptir.

Marrubium L. cinsinden bu güne kadar marrubiin, marrubenol, velutin A, silenin A, polyodonin, peregrinin, marrubaş ve marrubiol gibi pek çok diterpenik bileşikler izole edilmiştir (11, 22-25).



Şekil 1: *Marrubium* türlerinde bulunan diterpenler

Tablo 3: *Marrubium* türlerinden elde edilen diterpen türevleri

Tür	Diterpen	Referans
<u>M. trachyticum</u> (T) (E)	Marrubiin	(47)
<u>M. anisodon</u>	Marrubiin, vulgarol	(48, 49)
<u>M. astracanicum</u>	Polyodonin, marrubinon A-B	(26)
<u>M. catarifolium</u>	Peregrinol	(50)
<u>M. globosum ssp. globosum</u>	Marrubiin, polyodonin, marrubiglobosin	(51)
<u>M. parviflorum</u>	Anatolion	(52)
<u>M. peregrinum</u>	Peregrinol peregrinin, tetrahidroperegrinin	(50, 53) (50, 54)
<u>M. vulgare</u>	Marrubiin Marrubenol peregrinin 12(S)-hidroksi marrubiin, 3-deokso-15-metoksivelutin C, tessalin D, marrubinon B, deasetilviteksilakton, verbaskosit, lökoseptisit A, martinosit, anisofolin A, terniflorin	(55, 56) (56) (54) (57)
<u>M. alysson</u>	Marrubiin	(58)
<u>M. cylleneum</u>	Marrubiin, silenin A, 15-epi-silenin -A	(12)
<u>M. globosum ssp.</u>	Silenin A, 15-epi- silenin -A, marrulibanosit, 13-14- γ - lakton	(59)

<u>libanoticum</u>		
<u>M. incanum</u>	Marrubiin, peregrinin	(60)
<u>M. leunuroides</u>	Peregrinol	(26)
<u>M. polyodone</u>	Polyodonin	(61)
<u>M. supinum</u>	Marrubiin, premarrubenol, 6-asetil-premarrubenol	(58)
<u>M. sericeum</u>	Marrubiin	(58)
<u>M. velutinum</u>	Peregrinin, polyodonin, velutin A, 15-epi-velutin A, 15-epi-velutin B, velutin C	(12)
<u>M. aschersonii</u>	Marrubiin, marrubenol, Marrubash A ve B	(23)
<u>M. deserti</u>	Marrulibasetal A, desertin, silenin A ve 15-epi-silenin A, marrubiin, marrulakton, marrulibasetal ve β -stigmasterol B	(17)

(T)= Türkiye’de çalışılmış

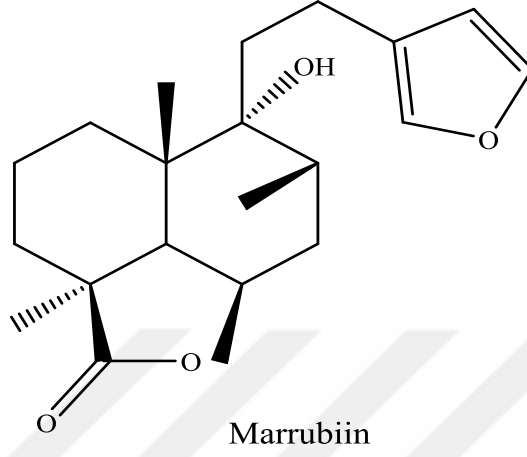
(E)= Endemik tür

Türkiye ve dünya üzerinde yaygın olarak yayılış gösteren *Marrubium vulgare* ile ilgili çok fazla çalışma yapılmış olup Avrupa Farmakopesi Adaptasyonlu Türk Farmakopesi’nde de yer almaktadır.

Marrubiin

Marrubiin ilk kez 1842 yılında *Marrubium vulgare*’den izole edilmiştir (10, 62). Daha sonra yapılan çalışmalar ile yine Lamiaceae familyasına ait pek çok cinste marrubiin varlığı gösterilmiştir (63). Bunlar; *Leonotis leonurus* (64), *Phlomis bracteosa* (65), *Marrubium deserti* (17), *Marrubium velutinum*, *Marrubium cylleneum* (12), *Marrubium trachyticum* (47), *Marrubium globosum* (51), *Marrubium anisodon* (48), *Marrubium sericeum*, *Marrubium supinum*, *Marrubium*

alysson (58), *Marrubium thessalum* (29). Sadece bir literatürde Lamiaceae familyası dışında Rosaceae familyasına ait *Spiraea brahuica* bitkisinden marrubiin izole edildiği rapor edilmiştir (66).

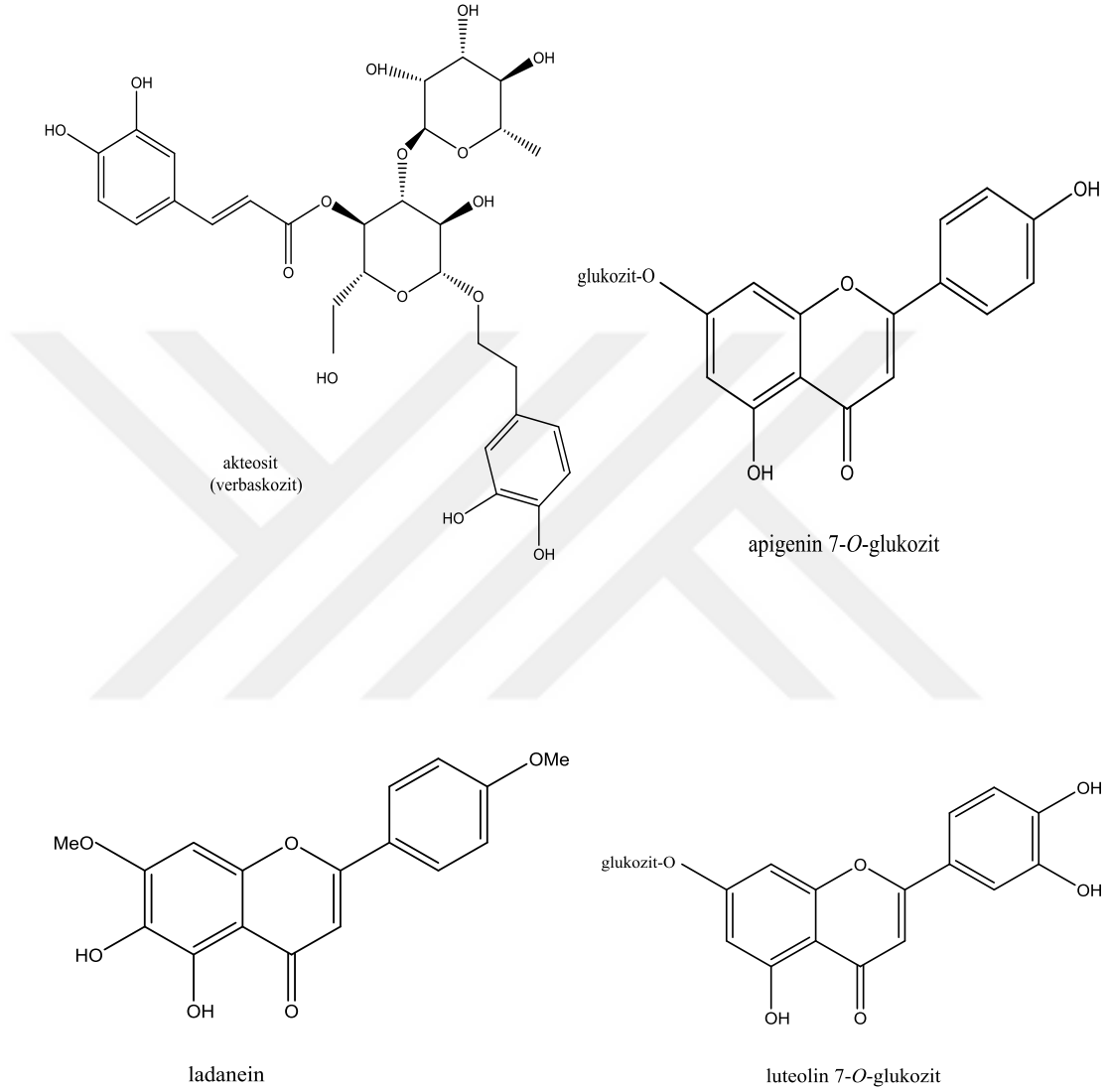


Şekil 2: Marrubiin kimyasal yapısı

Antinosiseptif (9), antioksidan, antigenotoksik (17), kardiyoprotektif (64), vazorelaksant (67), gastroprotektif (68), antispasmodik (65), immünmodüller(12), antiödematojenik (69) ve analjezik (9, 10) aktiviteleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

2. Flavonoid ve Fenolik Yapıda Bileşikler

Türkiye’de yayılış gösteren *Marrubium* türlerinden bugüne kadar en çok elde edilen flavonoidler ve fenolik bileşikler Şekil 3’te gösterilmiştir;



Şekil 3: *Marrubium* türlerinden en çok elde edilen flavonoid ve fenolik bileşikler

Tablo 4: *Marrubium* türlerinden elde edilen flavonoid - fenolik bileşikler

Tür	Bileşik	Rfn.
<u>M. trachyticum</u> (T) (E)	Flavonoid: Ladanein	(47)
<u>M. vulgare</u>	Fenilpropanoit esterleri: E-kafeoil-L-malik asit, akteosit, forsitozit, arenariozit, ballotetrozit, alissonozit, verbaskozit Feniletanoit glikozitleri: Marrubosit, magnoliyosit, ballotetrosit, trikosantosit Flavonoid: Luteolin O-glikozit, luteolin O-glukronit, apigenin O-glikozit, apigenin O- glukronit, krizeoriyol O- glukronit, ladanein, alissonozit, lökoseptozit, apigenin-O- glikozit, luteolin, terniflorin, deasetilforsikolin, marrulibasetal A, apigenin	(34, 70) (71) (72)
<u>M. peregrinum</u>	Fenolik bileşikler: 5, 6, 7, 4'-tetrametoksiflavon, apigenin, kemferol, apigenin-7-glikozit, luteolin-7-glikozit, akteozit	(35)
<u>M. alysson</u>	Flavonoid: Diosmetin, diosmetin-7- ramnozid, krizeriyol, luteolin, luteolin-7- rutinozit, akasetin, akasetin -7- glikozit, kersetin Fenilpropanoit glikoziti: Alissonozit	(15) (73)
<u>M. veletinum</u>	Flavonoid: Apigenin, krizeriyol, 5,6,7,4'-tetrametilskutellarin, 5,7,4'-trimetilskutellarin, izoramnetin-3-O-glikozit, nikotiflorin, izoramnetin--3-O-rutinozit, kersetin-3-O-rutinosit, 6-OH-kemferol-3-O-rutinosit, kemferol-3-O-(6''-E-p-kumarik asit)-glikozit Feniletanoit glikozitleri: Akteosit, lökosestosit, martinozit, ekinakozit, forsitozit, alissonozit, lavandulifoliozit, sitakisozit, velutinozit Fenolik asit: Klorojenik asit, faselik asit	(74)
	Flavonoid:	(74)

<u>M.cylleneum</u>	5,6,7,8,4'-pentahidroksiflavon, kersetin, luteolin-7-O- glikozit Feniletanoit glikozitleri: Martinozit Fenolik asit: p-kumarik asit, ferulik asit, iso- ferulik asit	
<u>M. deserti</u>	Fenolik bileşikler ve 7-O- deriveleri: Apigenin, apigenin-7-O- neohesperidozit, apigenin-7-O- glikozit, terniflorin, apigenin-7-O-glikuronit Feniletanoit glikozitleri: Akteozit, forsitozit	(17)
<u>M. globosum</u> <u>ssp.libanoticum</u>	Flavonol: Kersetin 3-O- β -D-rutinozit, kersetin 3-O- β -D- glikozit, kemferol 3-O- β -D- rutinozit, kemferol 3-O- β -D- glikozit, isoramnetin 3-O- β -D-rutinozit, isoramnetin 3-O- β -D-glikozit. Flavon deriveleri: Apigenin 7-O- β -D- glikozit, apigenin 7-O- β -D-(3''-p-kumaril)- glikozit	(59)
<u>M. thessalum</u>	Feniletanoit glikozitleri: Akteozit, lökoseptozit A, martinozit, ekinakozit, vaydemannozit C, 6'-glukosilmartinozit, forsitosit B, alissonozit, lamiyoflomozit, sitakisozit A, stahisozit D, izoakteozit, plantainozit C, dekafeylakteyoit, leonurisit B, salidrozit Flavonoid: Apigenin, apigenin-7-O- β -D glukopiranozit, kemferol-3-O- β -D glukopiranozit isoramnetin-3-O- β -D- glukopiranozit, kemferol-3-O- β -D-rutinozit, isoramnetin-3-O- β -D- rutinozit, kamferol-3-O-(6"-O-E-p-kumaril)- β -D-glukopiranozit, isoramnetin-3-O-(6"-O-E-p-kumaril)- β -D-glukopiranozit, apigenin-7-O-(6"-O-E-p-kumaril)- β -D-glukopiranozit, apigenin-7-O-(3"-O-E-p-kumaril)- β -D-glukopiranozit, apigenin-7-O-(3",6"-di-O-E-p-kumaril)- β -D- glukopiranozit, krizeoriyol-7-O-(3",6"-di-O-E-p-kumaril)- β -D- glukopiranozit. Basit fenolik bileşikler: Arbutozit, vanillolozit	(29)

3. Uçucuyağlar

Uçucuyağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan, su ya da su buharı distilasyonu ile elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olup, bazen donabilen, uçucu, kokulu ve yağimsı karışımlardır (75).

Marrubium türlerinden elde edilen uçucuyağlar aşağıdaki gibi sınıflandırılmış olup, en yüksek verimle elde edilebilen bileşikler β -karyofillen, germakren D, öjenol, β -bisabolen, timol, E- karyofilen, bisiklogermakren, γ -muurolen ve karyofillen oksit'tir.

Marrubium bourgaei ssp. caricum (Türkiye)

β -karyofillen (% 23.2), (Z)- β -farnesen (% 13.5), germakren D (% 10.3)

Denizli- Olukbaşı, Geyran Yaylası

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (32, 33).

Marrubium bourgaei ssp. bourgaei (Türkiye)

Hekzadekanoyik asit (% 33.3), heksadihidrofarnesil aseton (% 6.4)

Antalya- Bakırlar Dağı

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (33).

Marrubium anisodon (Türkiye)

(Z)- β -farnesen (% 20.2), nonakosan (% 18.5) β -karyofillen (% 13.3)

Konya- Karaman yolu

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (31).

Marrubium globosum subsp. globosum (Türkiye)

Spatulenol (% 15.8), β -karyofillen (% 9.0), karyofillen oksit (% 7.9), germakren D (% 6.5), bisiklogermakren (% 3.1)

Muğla- Yılanlı Dağı

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (20).

Marrubium globosum (Lübnan)

β -karyofillen (% 12.4), heksadekanoyik asit (% 7.4) spatulenol (% 5.2)

Toprak üstü kısımlar hidrodistilasyon (76).

Marrubium cuneatum

Germakren D (% 15.6), heksadekanoyik asit (% 6.5), spatulenol (% 6.5), karyofillen oksit (% 6.2), *p*-metoksiasetofenon (% 5.4), bisiklogermakren (% 5.2)

Toprak üstü kısımlar hidrodistilasyon (Lübnan) (76).

Bisiklogermakren (% 37.9), germakren D (% 24.1)

Toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (İran) (77).

Marrubium vulgare

Öjenol (% 50.1)

Çiçeklerinden distilasyon (Cezayir) (30, 78).

β -bisabolen (% 29), öjenol (% 16.2)

Trikomlarından hidrodistilasyon (Cezayir) (78).

β -bisabolen (% 28.3), β -karyofillen (% 7.8), (*E*)- β -farnesen (% 7.4), 1,8-sineol (% 4.8)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (Tunus) (30).

Timol (% 34.6)

Toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (Mısır) (79).

(*E*)-karyofillen (% 25.91-% 32.06), germakren D (% 20.23-% 31.14), δ -amorfen (% 8.38-% 10.22)

Toprak altı ve toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (Polonya) (80).

γ -ödesmol (% 11.93), β -sitronellol (% 9.90), sitronelin format (% 9.50), germakren D (% 9.37)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (Tunus).

β -bisabolen (% 20.4), δ -kadinen (% 19.1) isokaryofillen (% 14.1)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (İran).

Marrubium aschersonii (Tunus)

β -bisabolen (% 22.0), α -tujen (% 10.3), öjenol (% 10.1), α -humulen (% 6.2)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (30).

Marrubium parviflorum Fisch (İran)

Bisiklogermakren (% 26.3), germakren D (% 21.5) β -karyofillen (% 15.6)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (81).

Marrubium velutinum Sm. (Yunanistan)

γ -Muurolen (% 27.28), β -karyofillen (% 24.25), β -karyofillen oksit (% 6.03)

Toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (82).

Marrubium peregrinum (Yunanistan)

(Z)- β -Farnesen (% 12.04-% 16.47), (E)- β -farnesen (% 21.49-% 24.16), *epi*-bisikloeskiflandren (% 3.53-% 12.31), bisiklogermakren (% 4.81-% 11.03)

Toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (82, 83).

Marrubium crassidens Boiss (İran)

β -karyofillen (% 20.3), germakren D (% 12.9), karyofilen oksit (% 11.1), kubenol (% 11.0)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (84).

Marrubium incanum Desr.

Germakren D (% 32.46-% 37.87), (E)-karyofillen (% 22.49-% 30.79), α -kadinol (% 14.36-% 17.87)

Toprak altı ve toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (Polonya) (80, 85).

(E)-karyofilen (% 27.0), germakren D (% 26.2), bisiklogermakren (% 11.5)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (Sırbistan) (85).

Marrubium thessalum (Yunanistan)

Karyofillen oksit (% 21.7), β -karyofillen (% 17.6), germakren D (% 15.3), β -bisabolen (% 12.6), *trans*- β -farnesen (% 8.1)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (29).

Marrubium astracanicum (İran)

β -karyofillen (% 21.2), valeranon (% 5.4)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (86).

Karyofillenoksit (% 35.8), sitronellal (% 16.9) β -karyofillen (% 13.1)

Toprak üstü kısımları buhar distilasyonu (87).

Marrubium peregrinum (Sırbistan)

β - karyofillen (% 17.99), γ -muurolen (% 6.29), bisiklogermakren (% 9.80), germakren -D (% 9.05), spatulenol (% 3.76), karyofillen oksit (% 4.98)

Toprak altı ve toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (83).

Marrubium deserti (Cezayir)

Germakren D (% 45.7)

Toprak üstü kısımları hidrodistilasyon (88).

2.2.4. *Marrubium* L. Taksonlarının Halk Arası Kullanımı

2015 yılında Manisa-Sarıgöl’de yapılan çalışma ile “ yabani calba, bozot, şerefe kekiği” olarak bilinen *Marrubium rotundifolium*’un toprak üstü kısımlarının infüzyon veya yakı olarak; karminatif, kabızlıkta, barsak spazmında, dispepsi ve soğuk algınlığında kullanımları rapor edilmiştir (37). Yine *Marrubium rotundifolium*’un toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde karminatif, kabızlıkta, barsak spazmında ve soğuk algınlığında kullanımları 2017 yılında Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde “Doğal ve Sağlıklı Yaşam” Kongresi’nde rapor edilmiştir (38).

Anadolu’da; *Marrubium vulgare* çiçekli dallar idrar söktürücü, gaz söktürücü ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılır (89).

Muğla’da “boz otu, it sineği, yalancı ısırgan, kara derme, köpek otu, mayasıl otu, kukas otu” olarak bilinen *Marrubium vulgare*’nin çiçekli toprak üstü kısımları diüretik, karminatif, ekspektoran, mukolitik, soğuk algınlığında, solunum sistemi hastalıklarında kullanılır (90).

Koyuncu ve ark. (2010) tarafından yapılan etnobotanik çalışmada *Marrubium vulgare* (boz ot), *M. parviflorum* subsp. *parviflorum* (köpek otu), *M. peregrinum* (boz ot) toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde idrar söktürücü ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanımları ortaya konmuştur (6).

Altundag ve Ozturk (2011) tarafından yapılan etnobotanik çalışma ile Doğu Anadolu’da “dağ çayı” olarak bilinen *Marrubium astracanicum* subsp. *astracanicum* ve *Marrubium parviflorum* subsp. *oligodon*’un toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde soğuk algınlığında ve antipiretik olarak kullanımı belirlenmiştir (7).

Bir başka çalışmada Antalya yöresinde “boz ot” olarak bilinen *Marrubium globosum* subsp. *globosum* toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde ağrı kesici olarak kullanımı rapor edilmiştir (8).

Marrubium cuneatum bitkisinin yapraklarının dekoksasyon yöntemi ile karın ağrısı için kullanımı Malatya’da yapılan etnobotanik çalışmalar ile gösterilmiştir (91).

Dünyanın farklı bölgelerine baktığımızda;

Marrubium vulgare yapraklarının dekoksasyon ile Meksika’da diyabette, soğuk algınlığı ve ateşte (92, 93), İran’da ise sindirim bozukluklarında kullanımı belirlenmiştir (94).

K. Koch ve ark. tarafından 2005 yılında yine İran’da yapılan bir etnobotanik çalışmada *Marrubium anisodon* bitkisinin dekoksasyon ile hipertansiyon, kas spazmı, sırt ağrısı, karminatif, kadın infertilitesi, sindirim bozukluklarında kullanımı gösterilmiştir (94).

Cezayir endemiği olan *Marrubium desertii*, antispazmodik, sindirim sistemi bozukluklarında, akrep sokmalarında ve alerjiye karşı sıklıkla kullanılmaktadır (17).

2.2.5. *Marrubium* L. Taksonları Üzerinde Yapılan Biyoaktivite Çalışmaları

2017 yılında Ozsoy ve ark. tarafından Manisa’dan toplanan *Marrubium rotundifolium* ve seçilen sekiz bitkinin etilasetat, metanol, dikolorometan, petrol eteri ve su ekstraktlarının antioksidan, antiinflamatuvar, asetilkolinesteraz ve tioredoksin redüktaz inhibitör aktiviteleri çalışılmıştır. *Marrubium rotundifolium*’un total fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemiyle gallik asit eşdeğeri üzerinden hesaplanmış ve en yüksek fenolik içerik etilasetat ekstresinde gözlemlenmiştir (58.32 mg/g). Total flavonoid madde içeriği alüminyum klorür yöntemi ile kateşin eşdeğeri üzerinden hesaplanmış ve en yüksek flavonoid içeriği yine etilasetat ekstresinde gözlemlenmiştir (29.76 mg/g). Antioksidan potansiyelleri TBA, LPO, DPPH ve FRAP yöntemleriyle yapılmış ve hepsi için düşük etki görülmüştür. Ekstrelerin asetilkolinesteraz inhibe etme gücü, antiinflamatuvar aktiviteleri değerlendirmek için COX değerleri hesaplanmış olup, tioredoksin redüktaz inhibitör aktivitesi tanımlanamamıştır (AChE 11.44 mg/ml, COX-1 5.91 mg/ml, COX-2 9.63 mg/ml) (36).

1998 yılında Souza ve ark. tarafından *Marrubium vulgare*'nin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından elde edilen hidroalkolik ekstrenin sıçanlar üzerinde hot-plate testi ile önemli analjezik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu etkinin; yapısında bulunan steroid ve terpenlerden ileri gelebileceği vurgulanmıştır (9).

Marrubium vulgare'den bulunan marrubiinin yarı sentezi ile elde edilen marrubinik asitin analjezik etkisi *in-vivo* yöntemlerle farelerde denenmiş, standart analjezik bileşiklere oranla 11 kat daha etkili olduğu saptanmıştır (10).

Kanada'da *Marrubium astracanicum* bitkisinin toprak üstü kısımları ile yapılan *in vivo* çalışmada bitkinin hidroalkolik ekstresinin, *n*-hekzan ekstresinin ve polar fraksiyonlarının antinosiseptif aktivitelerinin anlamlı analjezik aktivite gösterdiği saptanmıştır (95).

Marrubium parviflorum bitkisinin (2012-İran) toprak üstü kısımlarından elde edilen hidroalkolik ekstresinin farelerde formalin testi ile yapılan analjezik etki çalışmasında 200 mg/kg'doz 15-40 dk'lık faz aralığında etki göstermiş olup anlamlı bulunmuştur (11).

2010 yılında Sırbistan'da yapılan bir çalışmada *Marrubium peregrinum*'un toprak üstü kısımlarından 5 farklı ekstre hazırlanmıştır (aseton, metanol, petrol eteri, etilasetat ve sodyum hidrojen karbonat). Ekstrelerin aktivitesi, DPPH radikallerinin inhibisyon yüzdesi ve IC₅₀ değerleri olarak ifade edilmiştir (µg/ml). Yüzde değerler, % 27.26 ila % 89.78 arasında değişmektedir. Toplam fenolik içerik, gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilen kuru madde ağırlığının 27,26 ila 89,78 mg/g'dır. Toplam flavonoid konsantrasyonları, rutin eşdeğeri olarak ifade edilen, 18.72 ila 54.77 mg/g arasında değişmektedir. *M. peregrinum*'un metanol ekstresi yüksek fenolik ve flavonoid içeriğine bağlı olarak güçlü antioksidan aktivite göstermiştir (96).

2011 yılında yapılan çalışmaya göre, Cezayir endemiği olan *Marrubium deserti* bitkisinin toprak üstü kısımlarından diklorometan ve metanol ekstreleri ile birçok diterpen madde grubu olan bileşikler izole edilmiş ve bunların antioksidan ve antigenotoksik etkinlikleri çalışılmıştır. DPPH, ABTS, CUPRAC tayini yöntemleri ile antioksidan ve *Escherichia coli* üzerinden PQ37 hücrelerini SOS Chromotest yöntemi ile antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Akteosit, forsitosit B, apigenin-7-O-glukuronit antioksidan aktivite gösterirken, apigenin-7-O-β-neohesperidozit, akteozit, apigenin-7-O-glukozit, apigenin güçlü genotoksik aktivite göstermiştir (17).

2012 yılında Tunus'ta yapılan çalışmada *Marrubium deserti* yapraklarından petrol eteri, etil asetat, kloroform, bütanol ve metanol ekstreleri hazırlanmış ve bu

ekstrelerin antioksidan ve antiviral aktiviteleri çalışılmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Antioksidan aktivite, DPPH, ABTS testi ve amonyum tiosiyanat yöntemi ile, antiviral aktivite ise insan sitomegalovirüs (HCMV) suşu AD-169 (ATCC Ref. VR 538) ve Cocksackie B virüsü tipi 3 (CoxB-3) ile sitopatik etki (CPE) redüksiyon testi ile belirlenmiştir. Metanol ekstresi 0.150 mg/ml IC₅₀ önemli antioksidan aktivite sergilemiştir. Etil asetat ekstresi linoleik asit emülsiyon sistemini (% 79.23) kullanarak en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bütanol, metanol ve etilasetat ekstreleri ise, Cocksackie B3 virüsüne karşı önemli antiviral aktivite göstermiştir (135 µg/ml IC₅₀) (19).

2008 yılında Muğla'da Sarıkürkçü ve ark. tarafından yapılan çalışmada *Marrubium globosum subsp. globosum* bitkisinin uçucuyağı ve metanol ekstresinin alt fraksiyonlarının (polar alt fraksiyonlar ve polar olmayan alt fraksiyonlar) antioksidan aktivitesi çalışılmıştır. Uçucuyağın gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi ile analizi yapılmış; ana bileşenlerinin spatulenol (% 15.8), β -karyofillen (% 9.0), karyofillen oksit (% 7.9), germakren D (% 6.5) ve bisiklogermakren (% 3.1) olduğu ortaya konmuştur. Antioksidan aktiviteleri; DPPH, β -karoten / linoleik asit ve indirgenme gücü tayini olmak üzere üç farklı test sistemi ile belirlenmiştir. DPPH sisteminde, en zayıf radikal süpürme aktivitesini uçucuyağ (1203.38 $\pm$ 7.18 µg ml⁻¹) sergilemiştir. Polar alt fraksiyonun antioksidan aktivitesi 157.26 $\pm$ 1.12 µg ml⁻¹ IC₅₀ değeriyle üstün bulunmuştur. Polar alt fraksiyonu, polar olmayan bir fraksiyon ile karşılaştırıldığında IC₅₀ değeri 625.63 $\pm$ 1.02 µg ml⁻¹ değeriyle en güçlü radikal azaltıcı olmuştur. Toplam fenolik madde miktarı polar alt fraksiyonda (25.60 $\pm$ 0.74 µg/mg) en yüksektir. Her iki alt fraksiyon için flavonoid içeriği eşit bulunmuştur (20).

Yumrutaş ve Saygıdeğer tarafından 2010 yılında Gaziantep'te *Marrubium parviflorum* ve *Lamium amplexicaule* bitkilerinin yapraklarından *in vitro* antioksidan aktivite çalışmak amacıyla *n*-hekzan ve metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik, flavonoid, flavonol ve fenolik asit içeriği, β -karoten / linoleik asit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ABTS, güç azaltma, metal şelasyon testleri ile incelenmiştir. Bu bitkilerin metanol ekstreleri yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği için *n*-hekzan ekstresine kıyasla daha önemli antioksidan aktivite sergilemiştir. Toplam fenolik içerik Folin-Ciocalteu testi ile belirlenmiştir. *M.*

parviflorum metanol ekstresi fenolik 332.93 $\pm$ 26.90, DPPH 22.72 $\pm$ 0.11, ABTS 34.10 $\pm$ 1.80, güç azaltma testi 46.34 $\pm$ 2.43, metal şelasyon testi 11.47 $\pm$ 0.81. Ayrıca metanol ekstresinde YBSK ile yüksek miktarda bulunan fenolik asitin rosmarinik asit olduğu saptanmıştır (97).

Marrubium thessalum (2012-Yunanistan) toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin feniletanoid glikozitleri, flavonoidler ve basit fenolik bileşikleri içerdiği saptanmıştır. Bu madde gruplarının HeLa, MCF-7, FM3 ve HCT-116 olmak üzere dört insan kanser hücresi hattına karşı sitostatik etkileri ve hücre büyümesini önleyici aktiviteleri MTT metodu ile çalışılmış olup, apigenin, apigenin-7-O- β -D glukopironozit, kamferol-3-O-(6"-O-E-p-kumaril)- β -D- glukopironozit, apigenin-7-O-(3",6"-di-O-E-p- kumaril)- β -D- glukopironozit flavonoidlerinin HeLa hücre hattına karşı güçlü sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir (13).

2014 yılında İran kaynaklı *Marrubium crassidens*'in toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi, antiproliferatif ve sitotoksikite aktiviteleri açısından MTT yöntemi yoluyla meme kanseri hücre hattı MCF-7'deki etkinliği açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca *M. crassidens* ekstresinin fenolik ve flavonoid içeriğine bağlı antioksidan özelliği de değerlendirilmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre, *M. crassidens*, hücre büyümesi sırasında 240 μ g/mL konsantrasyondaki sitotoksikite etkisini kademeli olarak artırarak antiproliferatif aktivite göstermiş olup, ekstrenin antioksidan aktivitesi için RC₅₀ değeri 40 μ g/mL olarak belirlenmiş ve toplam fenolik ve flavonoidler için değerler kuru bitki materyali 100 g başına 512.64 mg gallik asit eşdeğeri ve 212.73 mg kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. *M. crassidens*'in gözlenen anti-proliferatif ve antioksidan özellikleri, ekstrede tespit edilen yüksek miktarda fenolik ve flavonoid içeriğine bağlanmıştır (18).

Marrubium vulgare bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın farklı patojen mikroorganizmalarda (*Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger* mantar suşları ve Gram + ile Gram - bakteriler) antimikrobiyal aktivitesi ve HeLa hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Mevcut sonuçlar, mikroorganizmalara karşı önemli bir aktivite göstermiştir. Özellikle inhibisyon zonlarına ve minimum inhibisyon konsantrasyon değerlerine sahip Gram (+) bakteriler 6.6-25.2 mm ve 1120-2600 μ g/ml iken, Gram (-) bakteriler daha yüksek direnç göstermiştir. Test edilen dört suşun antifungal aktivitesi olan *Botrytis cinerea* inhibisyonu ile en güçlü aktivite sergilerken (12.6 mm'lik zonlar), *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* ve *Aspergillus niger*'e karşı

daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. Sitotoksisite testi için MTT yöntemi kullanılmıştır. HeLa hücre hatlarının bazı koşullar altında çoğalması IC₅₀ değeri 0.258 µg/ml'dir. Yapılan bu çalışma ile *Marrubium vulgare*'nin uçucuyağının güçlü antimikrobiyal ajan olduğunu; fakat sitotoksisite için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır (14).

Ulukanlı ve Akkaya tarafından 2011'de Kars'ta yapılan çalışma ile *M. catariifolium* ve *Phlomis pungens* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan, aseton ve metanol ekstralarının disk difüzyon yöntemiyle *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Staphylococcus aureus* (meat isolate), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* NCTC 96040, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi çalışılmıştır. Aseton ve metanol ekstralarında aktivite gözlemlenmemiş olup hekzan ekstresinde gözlemlenmiştir. *M. catariifolium* hekzan ekstresi gram pozitif bakteri suşlarına karşı artan konstrasyonlarda (500 µg disk başına *S. aureus* ATCC 29213 (12 mm), *B. subtilis* (10 mm), *S. aureus* ATCC 6538 (9 mm) ve *S. epidermidis* (9 mm); 1000 µg disk başına *S. aureus* ATCC 29213 (13 mm), *S. aureus* ATCC 6538 P (13 mm), *B. subtilis* (12 mm) ve *S. epidermidis* (10 mm)) etki göstermiştir (21).

Marrubium vulgare metanol ekstresinin sıçan modelinde izoproterenol ile indüklenen miyokard enfarktüsü üzerine anti-inflamatuar etkisi araştırılmıştır. Yapısında bulunan glikozidik fenilpropanoid esterlerin siklooksijenaz enzimini (COX) inhibe ettiği ve antiinflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur. İzoproterenol kaynaklı miyokard enfarktüsü karşısında güçlü koruyucu etkilere sahip olduğunu ve bu korunmanın anti-inflamatuar etkilerinden kaynaklanması olası görünmektedir (tedavi edilen gruplarda, sırasıyla % 55.4, % 52.2 ve % 69 oranında azaltmıştır) (16).

2015 yılında Ahmed A. Elberry ve ark.'nın yaptığı çalışmada streptozotosine bağlı diyabetik farelerde *Marrubium vulgare*'nin metanol ekstresinin antidiyabetik ve antidislipidemik etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak ekstre ikinci haftadan itibaren kan şekeri düzeyini önemli ölçüde düşürmüştür. Tedavinin 14. gününden itibaren plazma glikoz seviyesinde % 23'lük, 28. gününde ise % 42'lik bir azalma olmuştur (98).

Marrubium vulgare hidroalkolik ekstresi üzerine çalışılmış ve majör bileşen olan marrubiinin farelerde 1050 değerleri (pmol/kg, i.p.) olan güçlü ve doz ile ilişkili antinosiseptif etkisi gözlemlenmiştir (99).

Marrubium vulgare'nin kök ve toprak üstü kısımlarının hidroalkolik ekstresinin in vitro kas preparatlarında asetilkolin, bradikinin, sakkarin gibi bazı nörotransmitterlerin aktivitesini inhibe ederek önemli antispazmodik aktivite sağladığı belirlenmiştir (100).

2.3. *Marrubium rotundifolium* Boiss. Bitkisinin Genel Botanik Özellikleri



Resim 1: *Marrubium rotundifolium* Boiss.

Marrubium rotundifolium Boiss. Ege Bölgesi'nde (Denizli, İzmir ve Manisa) yayılış gösteren endemik bir bitkidir. Dik, biraz dallı ve çok yıllık bir bitkidir. Sapları 30-40 cm. yoğun beyaz tüylüdür. Kaulin yapraklar geniş eliptik ya da ovattır. Kısa petiolat 35-42 x 26-40 mm. uzunluğunda, çentiklidir. Yoğun stellat (yıldızimsı) tüyler yukarıda ve altında, dolayısıyla basit görünürler. Brakteoller (pulsu yaprakçık)

kaliks tüpleri kadar uzundur. Kaliks tüpü 5-6 mm. boyunda, dişler dik, biraz eşitsizdir. Çoğunda stellate-pilose (yıldız şeklindeki tüy) uzun, nadiren bazıları tüysüz ve çok kısadır. Korolla beyazımsı, yoğun stellat-tüylü dış, üst dudağın içinde daha az yoğundur.

Çiçeklenme: Mayıs-Temmuz

Habitat: Çukurlu yamaçlar.

M. bourgaei ve *M.heterodon*'a çok benzer, ancak yaprak boyutu, indumentum ve çiçek dişlerindeki farklılıklar ile ayrılır (101).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Aletler

Ekstraksiyon Çalışmaları

- Hassas terazi (OHAUS Adventurer AR 3130)
- Ultrasonik su banyosu (Ultrasonic LC-30, Elma)
- Kromatografi tankı (Camag cam küvet)
- UV lamba (Spectroline ENF-260C/FE)
- KFE vakum manifoldu (Alltech)
- Vakum pompası (Büchi Vac-500)
- Evaporatör (Büchi RE-111)
- Vakum kontrolörü (Büchi B-721)
- Su banyosu (Büchi 461)
- Vorteks (IKA Yellow-Line TTS-2)
- Vakum konsantratör sistemi
- Vakumlu santrifüj (Christ RVC 2-25)
- Soğutucu (Christ LT-105)

Gaz Kromatografisi (GC ve GC-MS) Düzenegi

- Gaz Kromatografisi (Thermo Scientific Trace GC Ultra)
- Kütle Detektörü (Thermo Scientific DSQ II)
- Kapiller Kolon (Thermo TR-Wax)
- Autosampler (Thermo Scientific TriPlus)
- Neo-Clevenger tipi distilasyon cihazı

YBSK (HPLC) Düzenegi

- Thermo Scientific-Accela 1250 Pump
- Thermo Scientific-Accela autosampler
- ACE- 250×4.6 mm 5µ (SN:A87717)
- Thermo Scientific - Accela – PDA Dedektör
- Lichrosphere 100 RP-18 kolon
- Turbochrom Navigator Software

Antioksidan Aktivite Denemeleri

- Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler (Brand Transfer pipet)
- Spektrofotometrik mikroparka okuyucusu (Molecular Devices- Versamax BN 03252)
- Manyetik karıştırıcı (Nüve MK 318)
- Vortex (Nüvemix)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV- 1601 model)

Sitotoksosite Çalışmaları

- UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific-Germany)

Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

- Dansitometre cihazı (McFarland Den-1 Biosan, Letonya)

3.2. Fitokimyasal Çalışmalar

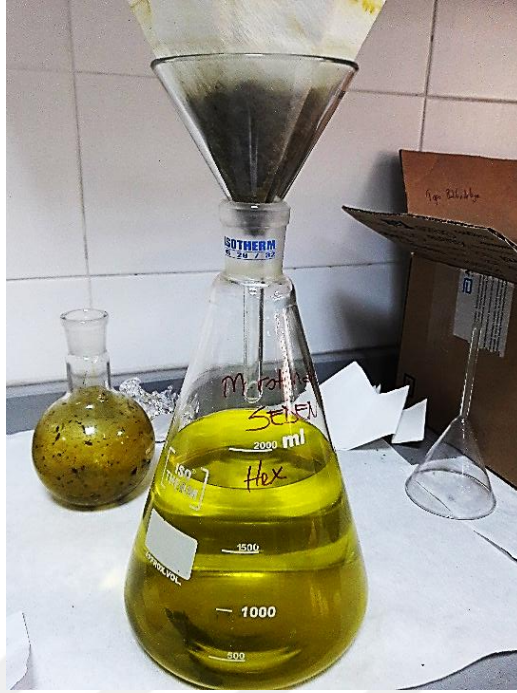
3.2.1 Bitkisel Materyal

2016 Haziran ayında bitkinin toprak üstü kısımları İzmir/Ödemiş-Bozdağ bölgesinden toplanarak kurutma kabinlerinde düzenli hava akışı altında kurutulmuş ve herbaryum örnekleri hazırlanarak Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir (İZEf No: 6052)

3.2.2. Ekstraksiyon İşlemleri

A-) Solvan Ekstraksiyonu

Kurutma kabinlerinde düzenli hava akışı altında kurutulan *Marrubium rotundifolium* toprak üstü kısımları toz haline getirilmiştir. 826 gr toz materyal sıralı ekstraksiyona tabi tutularak (3x 2L) sırası ile *n*-hekzan, etilasetat, metanol ile oda sıcaklığında, 24 saat süre ile, ultrasonik su banyosunda ekstre edilmiştir. İşlem bittikten sonra ekstreler süzülerek (Örn. Resim: 2); metanol, etilasetat ve hekzan ekstreleri ayrı ayrı birleştirilip, 40°C altındaki rotary evaporatör ile evaporasyon işlemine tabi tutulmuştur. Miktarlar: *n*-hekzan; 9.247 gr, etilasetat;10.133 gr, metanol; 69.652 gr şeklindedir.



Resim 2: *Marrubium rotundifolium* Boiss. *n*-hekzan ekstresi

Tablo 5: Ekstre Miktarları ve Verimleri

EKSTRE	EKSTRE MİKTARI (gr)	% VERİM
<i>n</i> -hekzan	9.247	1,08
Etilasetat	10.133	1,21
Metanol	69.652	8,35

B-) Uçucuyağ Eldesi

Araştırma materyalinden uçucuyağ elde etmek için parçalanmış drogdan 100 gr tartılmış ve 2lt'lik cam balon içerisine alınıp, üzerine 1lt distile su ilave edilerek Neo-Clevenger tipi hidrodistilasyon cihazında sabit sıcaklıkta 3 saat tutulmuştur. İşlem sonunda cihazın ml ölçekli toplama kısmında biriken uçucuyağın üzerine hekzan ilave edilerek hacmi okunmuş ve drog miktarı ile hesaplanarak (a/h) % uçucuyağ verimi elde edilmiştir. Uçucuyağ analizi yapılmaya kadar -18°C'de bekletilmiştir (102).

3.2.3. Kromatografik Yöntemler

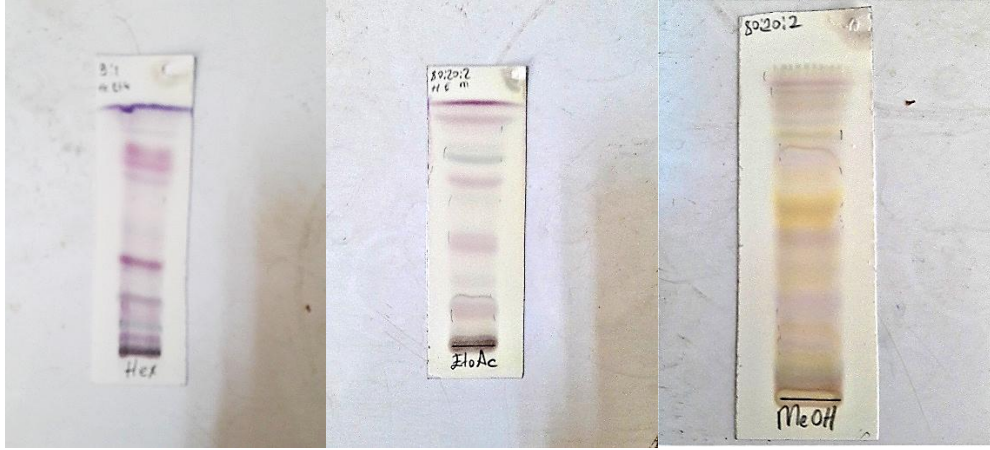
Çalışmamızda bitkinin kimyasal bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla; İTK (ince tabaka kromatografi), YBSK (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi), ve GC/MS (gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi) kromatografik yöntemleri uygulanmıştır.

3.2.3.1 İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK yöntemi ile ekstrelerde bulunan maddelerin tespiti; Sigma Aldrich'ten ticari olarak satın alınan saf standart bileşikler kıyaslanarak yapılmıştır. Karşılaştırma yapılan standart maddelere daha önce yapılmış olan literatür (34, 59, 103) verileri incelenerek karar verilmiştir.

Kersetin	Klorojenik asit
Apigenin	Gallik asit
Vicenin- 2	P- kumarik asit
Naringenin	Vanilik asit
Kemferol	Kafeik asit
Rutin	CEBN 38
Luteolin	Homooryantin
Hesperidin	Orientin
Marrubiin	

İTK analizlerinde belirteç olarak Vanilin-Sülfürik asit reaktifi ve Naturstoff (NP/PEG) Reaktifi kullanılmıştır.



Resim 3: *Marrubium rotundifolium* Boiss. *n*-hekzan, etilasetat, metanol ekstreleri İTK profilleri

3.2.3.2 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK)

Ekstraksiyon ile elde edilen *n*-hekzan, etilasetat, metanol ekstreleri ve kolon kromatografisiyle elde edilen metanol alt fraksiyonlarından bazılarına YBSK uygulanmış, böylece aşağıdaki standart maddelerin (fenolik asit ve flavonoidlerin) ve marrubiinin ekstrelerde varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Klorojenik asit
Apigenin
p- kumarik asit
Kemferol

Vanillik asit
Kafeik asit
Luteolin

Yaklaşık 1'er mg tartılan ekstreler ve standart bileşikler, 1000 ppm konsantrasyonda stok çözelti olarak hazırlanmış, ardından 20 ppm konsantrasyonda çözeltiler oluşturulmuştur.

YBSK cihazının çalışma koşulları ve hareketli fazların gradient programı (Tablo 4) aşağıda verilmiştir (104):

Kolon Sıcaklığı: 30°C

Hareketli Faz A: ACN

Akış Hızı: 1 mL/dakika

Hareketli Faz B: % 0.3 Asetik Asitli Su

Enjeksiyon Hacmi: 10 µL

Hareketli Faz C: MeOH

Tablo 6: Gradient Programı

Zaman (dk)	Hareketli Faz A (% h/h)	Hareketli Faz B (% h/h)	Hareketli Faz C (% h/h)
0	0	100	0
3	15	85	0
8	20	70	10
10	75	10	15
13	80	5	15
14	0	100	0

Ayrıca çalışmamızda marrubiin'in tespiti Avrupa Farmakopesinde *Marrubium vulgare* bitkisinde marrubiin tespiti için yer alan yöntem ile de çalışılmış olup yöntem şu şekildedir (105);

50 gr toz drog homojen hale getirilir. 1.00 gr toz drog yuvarlak dipli 50 ml'lik balona yerleştirilir. Üzerine 2 hacim seyreltik hidroklorik asit ve 8 hacim metanol karışımından 15 ml eklenir. Su banyosunda 80°C'da geri çeviren soğutucu altında 30 dk ısıtılır. Oda sıcaklığına kadar soğutulup pamuktan 25 ml'lik balon jojeye süzülür. Yuvarlak dipli balon metanol ile çalkalanıp yıkanarak 25.0 ml'ye seyreltilir ve süzülür.

Şahit çözelti: 2.0 mg marrubiin, 10 ml metanolde çözülür.

Kolon:

- Boyut: t= 0.25 m, Ø= 4 mm;
- Sabit faz: uç kaplı-oktadesilsilil silika jel kromatografi için (5 µm);

Hareketli faz:

- Hareketli faz A. asetonitril
- Hareketli faz B. 0.5 ml fosforik asit, su ile 1000 ml'ye seyreltilir.

Tablo 7: Avrupa Farmakopesine göre gradient programı

Zaman (dk)	Hareketli Faz A (% h/h)	Hareketli Faz B (% h/h)
0 → 15	40 → 90	60 → 10
15 → 20	90 → 40	10 → 60
20 → 25	40	60

Akış hızı: 1.5 ml/dk.

Tespit: 217 nm'de.

Uygulama: 20 µL.



Resim 4: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Cihazı
(FABAL: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı)

3.2.3.3. Gaz Kromatografisi (GC) ve Kütle Spektroskopisi (MS)



Resim 5: Kombine çalışan GC- MS, GC- FID ve Otomatik Örnekleyici Sistemi (FABAL: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı)

GC- MS analizleri; “Thermo Scientific Trace GC Ultra” gaz kromatografisine kombine bağlı “Thermo Scientific DSQ II” kütle detektörü ve “Thermo TR-Wax” kapiller kolon (60 m x 0.32 mm i.d.; film kalınlığı 0.25 μ m) ile yapılmıştır. GC-MS tanımlamasında, iyonizasyon enerjisi 70 eV olan elektron iyonizasyon sistemi ile taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. 70 °C ‘den 210 °C’ye 7 °C/dk olacak şekilde programlanmış fırın sıcaklığı ve 230 °C’ye detektör sıcaklığı ayarlanmıştır. Uçucuyağ örneği 1/100, H/H oranında *n*-hekzan ile seyreltilmiş ve 1.0 μ l olarak “Thermo Scientific TriPlus” autosempler ile split modunda, enjektör sıcaklığı 200 °C, split akışı 50 ml/dk, split oranı 50 olacak şekilde enjekte edilmiştir (106).

Uçucuyağ bileşenlerinin nitel analizleri; alkan karışımındaki bileşiklerin alıkonma süreleri yardımıyla hesaplanan, uçucuyağ bileşiklerinin aritmetik indislerin, Adams’ın indis listesi ile karşılaştırılması ve GC-MS analizlerinden elde edilecek

kütle spektrumları “ Xcalibur” yazılımında yer alan kütle veri tabanlarının karşılaştırılması yolu ile yapılmıştır (107). Uçucuyağların nicel analizleri ise üç tekrar şeklinde GC-MS analiz sonuçlarına göre yapılmış olup, incelenen pik altında kalan alanın toplam piklerin alanına oranı şeklinde “ Qrom quest ” yazılımı yardımıyla hesaplanmış ve yapılan üç enjeksiyonun ortalaması alınarak kaydedilmiştir (108). Bileşiklerin indislerinin genellikle KI (kovats indis) ya da RI (retention indis) adları ile bilinen logoritmik bir formül ile hesaplandığı ancak aşağıda belirtilmiş logoritmik olmayan ve benzer bir yolla hesaplanan AI (aritmetik indis) değerlerinin, KI değerlerine oranla daha sağlıklı sonuçlar verdiği VAN’dan DOOL ve Kratz tarafından kaydedilmiştir. Bu nedenle Adams’ın yeni kitabında indis listesi AI şeklinde hazırlanmıştır. Çalışmamızda uçucuyağ bileşenlerimizin indis hesaplarını aşağıda verilen AI formülüne göre gerçekleştirmiş bulunmaktayız.

$$AI (x) = 100 P_z + 100 [(RT (x) - RT (P_z)) / (RT (P_{z-1}) - RT (P_z))]$$

$AI (x) = 100 \times \text{önceki bileşiğin karbon sayısı} + 100 \times (\text{bilinmeyen bileşiğin alıkonma zamanı} - \text{önceki bileşiğin alıkonma zamanı})$

$(\text{sonraki bileşiğin alıkonma zamanı} - \text{önceki bileşiğin alıkonma zamanı})$

Tablolarda sunulan AI değerleri Adams’ın kitabında yer alan listedeki değerlerle birebir uyuşmasa da söz konusu bileşiklerin geliş sıraları, alıkonma süreleri dikkatle kontrol edilmiştir. AI değerlerindeki farklılıkların, kullanılan kolon ve metottaki farklılıklardan olabileceği değerlendirilmiş.

“ Xcalibur” yazılımında bulunan kütle kütüphanesinin içerdiği yüzlerce literatür tarafından teyit edilmiştir.

3.3. Biyoaktivite Çalışmaları

Biyoaktivite çalışmalarının tamamında *n*-hekzan, etilasetat ve metanol ekstraktları kullanılmıştır.

3.3.1 Sitotoksosite

Sitotoksosite, bazı makromolekülerin moleküler olaylar sonucu sentezlenmemesi ve bunun sonucunda hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır.

In vitro sitotoksosite testleri; hücre ölümü, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, hücre membranının seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücresel metabolizma gibi toksik etkiyi belirleyen parametrelerin değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır.

Elde edilen ekstre örneklerinin sitotoksik etkileri, enzimatik bir yöntem olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid (MTT) testi ile *in vitro* olarak belirlendi. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT, metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksitenin kantitatif ve kolorimetrik olarak ölçülmesine olanak sağlayan bir testtir (109, 110).

MTT Yöntemin İlkesi

Yöntemin esası, MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Canlı hücreler tarafından absorbe edilen MTT, spesifik olarak hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine (trikarboksilik asit döngüsüne ait bir enzim) bağlanır ve suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkte formazon kristalleri oluşturur. Oluşan kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerin eklenmesi ile kolayca çözünür. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrede görünür dalga boyunda ölçülebilen bir absorbans verir. Oluşan rengin şiddeti canlı hücre sayısı ile orantılı olup, okunan absorbans değeri canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (109-111).

Yapılan çalışmada, ekstrelerin ölümsüzleştirilmiş sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sağlıklı hücreler olarak fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH-3T3) ve insan böbrek tübüler epitel hücre hattı (HK-2) kullanılmıştır. Kanserli hücre hatları olarak ise, insan kolon adeno karsinoma hücre hattı (Caco-2), insan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y) ve insan prostat kanseri hücre hattı (PC-3) kullanılmıştır.

Kullanılan Hücre Hatları:

İnsan kanser hücre hatları;

- Caco.2 : Kolon adenokarsinoma hücre hattı
- SH-SY5Y : Nöroblastoma hücre hattı
- PC-3 : Prostat kanser hücre hattı

Sağlıklı hücre hatları;

- NIH-3T3 : Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
- HK-2 : İnsan böbrek tübüler epitel hücre hattı ile belirlenmiştir.

Deneyin Yapılışı:

NIH-3T3, SH-SY5Y ve PC-3 hücreleri, % 10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren DMEM besiyeri içinde; Caco-2 hücreleri % 20 FBS içeren DMEM besiyeri içinde ve HK-2 hücreleri ise % 10 FBS içeren DMEM:F12 besiyeri içinde, konvansiyonel hücre kültürü koşulları olan 37°C'de, % 5'lik CO₂ inkübatöründe çoğaltılmıştır. Deney gününden bir gün önce hücreler toplanarak mikroskop altında sayılıp, 7.5×10^5 hücre /kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilmiştir.

Ertesi gün hücrelerin besiyerine, son konsatrasyonları 0, 5, 12,5, 25 ve 50 µg/ml olacak şekilde, DMSO içerisinde çözündürülerek hazırlanan ekstre çözeltileri eklenerek 48 saat süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuk 1x steril fosfat tamponu ile yıkanmış ve ardından hücrelerin üzerine 100 µl MTT (5 mg / ml) içeren besiyerinden 500 µl eklenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra, ortam uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 500 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Oluşan mor renkli çözeltinin absorbansı 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Varioscan Flash, Thermo) ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı kontrole göre değişim yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Sonuçlar, her örneğe ait 4 farklı tekrara ait ortalama değerler ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi Prism GraphPad 5 paket programı kullanılarak, tek yönlü Anova analizi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Antioksidan Tarama Yöntemleri

Ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılır. Serbest radikaller; solunum, enzim reaksiyonları, otooksidasyon reaksiyonları gibi endojen kaynaklar ile sigara dumanı, hava kirliliği, UV ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiyotikler gibi çeşitli eksojen kaynakların etkisiyle meydana gelebilmektedirler (112).

Serbest radikaller, oksijen türevli (ROT, reaktif oksijen türleri) veya nitrojen türevli (RNT, reaktif nitrojen türleri) oksidan moleküllerdir. Organizmada endojen veya eksojen kaynaklı olarak oluşan radikaller, antioksidan bileşikler ile farklı

mekanizmalar yoluyla denge halinde tutulmaktadır. Bu dengenin bozulması halinde ise serbest radikaller hücrelerde yapısal ve fonksiyonel bileşikleri okside ederek hücre hasarına hatta hücre ölümüne yol açmaktadırlar (113). Bu dengenin serbest radikaller tarafından bozulması ‘oksidatif stres’ olarak adlandırılır.

Oksidatif stres’in insanlarda; çeşitli kalp damar patolojileri, diyabet, alzheimer ve parkinson hastalıkları, hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları, down sendromu ve kanser gibi hastalıklar ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (114).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri ortadan kaldırarak hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (115, 116).

Marrubium türlerinden yapılarında basit fenolikler, fenilpropanoidler, flavonoidler gibi fenolik karakterde maddeler içermesi nedeniyle çeşitli antioksidan çalışmaları yapılmıştır. Çalışmamızda *Marrubium rotundifolium* bitkisinde de bu maddelerin varlığı tespit edilmiş olup, bitkinin antioksidan etkinliği farklı yöntemlerle test edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda ekstrelerdeki fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin total miktarının tespiti için total fenolik ve total flavonoid içerik tayin metodları yapılmıştır.

3.3.2.1 Total Fenolik İçeriği Tayini

Bu yöntem ilk kez 1965’de Singleton ve Rossi tarafından çalışılmıştır. Fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı olan Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi, FCR) fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır (117). Folin-Ciocalteu reaktifi ile total fenolik bileşik miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarında kullanılan standart bir yöntemdir.

Yöntemin esası, bazik koşullar altında FCR’nin fenolik bileşikler ile reaksiyona girerek oluşturduğu mavi renkli kompleks ürünün görünür ışık spektrofotometresiyle belirlenmesine dayanmaktadır.

2001 yılında Mc Donald ve arkadaşları tarafından Folin-Ciocalteu reaktifi metodu ile ekstrelerin total fenolik içerikleri belirlenmiştir (118).

Gerekli Çözeltiler:

- Gallik asit: Hazır olarak satın alınmıştır (Sigma-Aldrich, Viyana, Avusturya)
- Folin reaktifi: Reaktif hazır olarak satın alınmıştır (Sigma-Aldrich, Viyana, Avusturya)
- 1 M Na₂CO₃ çözeltisi: 10,6 gr Na₂CO₃ tartılarak 100 ml distile suda çözülmüştür.
- 0.1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstre çözeltisi: 1 mg/ml stok çözelti hazırlanmıştır.

Stok çözeltiden 100 µl alınmış ve çözücü (etanol) ile 1000 µl'ye tamamlanarak 0.1 mg/ml ekstre çözeltisi elde edilmiştir.

Gallik Asit Standardının Hazırlanması:

1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde distile su ile stok çözelti hazırlanmıştır. Standart eğri hazırlanması için kullanılacak ara konsantrasyonlar, stok gallik asit çözeltisinin seri dilüsyonu ile Tablo 8'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 8: Stok gallik asit çözeltisi

No	Stok Gallik asit çözeltisi	Distile su	Son konsantrasyon
1	250 µl	750 µl	2500 µg/ml
2	200 µl	800 µl	200 µg/ml
3	150 µl	850 µl	150 µg/ml
4	100 µl	900 µl	100 µg/ml
5	50 µl	950 µl	50 µg/ml

Deneyin Yapılışı:

n-hekzan, etilasetat ve metanol ekstralarının ve gallik asit çözeltilerinden her birinden 1 mg/ml'lik konsantrasyonlar hazırlanıp, DMSO (1:10) ile seyreltilerek 0,1 mg/ml'lik konsantrasyonlara getirilmiştir. Daha sonra cam tüplere 0,5 ml 0.1 mg/ml konsantrasyonda ekstre çözeltisi, 5 ml 1:10 dilüe edilmiş Folin- Ciocalteu ayracı ve

inkübasyon süresi sonrasında reaksiyonu durdurmak için 4 ml 1 M Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir.

Ekstrelerin ve gallik asidin bulunduğu karışımların homojen hale getirilebilmeleri için vortekste 1'er dakika karıştırılmıştır. Ardından, su banyosunda 45°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İşlem sonunda, spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda, absorbans değerleri okunmuştur.

Çalışmada, ekstre çözeltisini içermeyen reaksiyon karışımı kör olarak kullanılmış; deney gruplarından elde edilen sonuçlarla kör arasındaki fark baz alınarak sonuçlar belirlenmiştir.



Resim 6: Total Fenolik İçeriğine Bağlı Renk Değişimi

3.4.2.2 Total Flavonoid İçeriği Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoid madde içerikleri, alüminyum klorür ile belirlenmiştir. Yöntemin esası, ortamda bulunan alüminyum klorür'ün ekstredeki flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asidik ortamda kararlı kompleksler oluşturması ve bu kompleksin renk şiddetinin 415 nm dalga boyunda görünür ışık spektrofotometresiyle belirlenmesine dayanmaktadır.

Tayinlerde standart olarak kersetin kullanılmış olup, flavonoid madde miktarı mg kersetine eşdeğer/g örnek olarak hesaplanmıştır (119).

Gerekli Çözeltiler:

- Kersetin: Sigma Aldrich
- 1 mg/ml (= 1g/l) ekstre çözeltisi: *n*-hekzan, etilasetat, metanol ekstreleri 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüştür.
- %10'luk Aluminyum klorid çözeltisi: 2 g Aluminyum klorid 2 ml etanolde çözülmüştür.
- 1 M potasyum asetat: 98,15 mg potasyum asetat tartılarak 1 ml suda çözülmüştür.

Kersetin Standardının Hazırlanması:

1 mg kersetin tartılıp 1 ml DMSO çözeltisinde çözündürülmüştür. Ardından DMSO ile 1:100 dilüe edilerek 1 µg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Standart eğri hazırlanması için kullanılacak ara konsantrasyonlar, stok kersetin çözeltisinin seri dilüsyonu ile Tablo 9'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 9: Stok kersetin çözeltisi

No	Stok Kersetin Çözeltisi	DMSO	Son konsantrasyon
1	750 µl	250 µl	75 µg/ml
2	500 µl	500 µl	50 µg/ml
3	250 µl	750 µl	25 µg/ml
4	125 µl	875 µl	12,5 µg/ml
5	-	1000 µl	0

Denevin Yapılışı:

10 ml'lik cam tüplerin içerisine sırasıyla, 0.5'er ml 1 mg/ml konsantrasyondaki *n*-hekzan, etilasetat ve metanol ekstreleri veya kersetin çözeltisi; 0.1 ml %10'luk Aluminyum klorid çözeltisi; 1,5 ml metanol; 0.1 ml 1 M potasyum asetat ve 2,8 ml

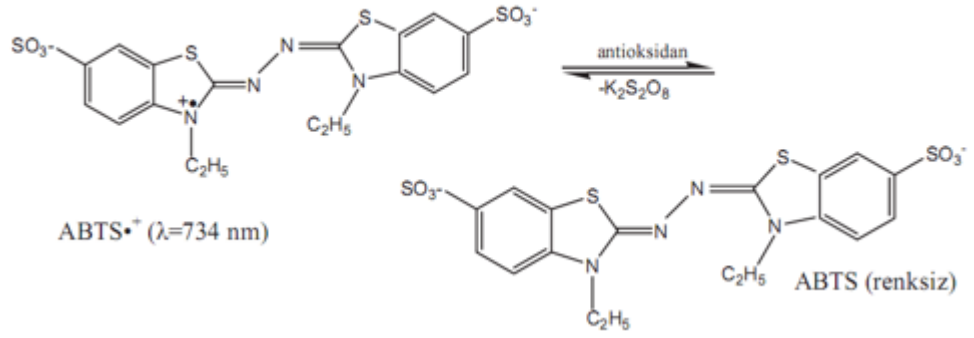
distile su eklenmiştir. Tüp içeriğinin, homojen olması için yaklaşık 1 dakika süre ile vortekste karıştırılmıştır. Ardından tüpler 30 dakika süreyle oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde, spektrofotometre aracılığıyla 415 nm dalga boyunda tüp içeriklerinin absorbansı kör çözeltilisine karşı ölçülmüştür.



Resim 7: Total Flavonoid İçeriğine Bağlı Renk Değişimi

3.4.2.3 Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAK) Tayini

İlk olarak Miller ve Rice-Evans tarafından 1993 yılında rapor edilen TEAC yöntemi (120), daha sonra Re ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (121). Geliştirilmiş yöntemde; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu 734 nm' de maksimum absorbans gösteren mavi/yeşil kromofor ABTS^{•+} radikali meydana gelir. Radikalin absorbansı 30° C' de 12- 16 saat içinde sabitlenir ve iki gün süreyle stabil kalır. Ancak ortamda hidrojen verici antioksidanların bulunması ile radikal indirgenmeye başlar ve radikal katyonun absorbsiyonunda zamana bağlı olarak düşüş olur. Bu düşme, yüzde inhibisyon olarak ifade edilip aynı koşullar altında yapılan bir çalışma ile çizilen troloks standart eğrisinden hareketle TEAK tayini yapılır (122, 123).



Şekil 4: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin persülfat ile oksidasyonu

Deneyin yapılışı:

Bu deneyde karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilen 7 mM stok ABTS•⁺ radikal çözeltisinin 734 nm' de 1ml 5 mM fosfat tamponuna (pH: 7.4) karşı 0.700 ± 0.02 absorbans gösterdiği konsantrasyondaki, yüzde inhibisyonu 'sıfır' olarak belirlenmiştir. Bu nedenle ABTS çözeltisinin absorbansı 0.700 ± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile seyreltilmiştir. Bu çözeltiden örnek küvetine 1 ml eklenerek, 30 °C sıcaklığa sabitlenmiş spektrofotometrede, 5 mM fosfat tampon (pH: 7.4) çözeltisine karşılık 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değer $A_{ABTS•+}$ olarak kaydedildikten sonra küvet içeriğine 10 µl ekstre veya standart çözeltisi ilave edildiği anda kronometre çalıştırılmıştır. Küvet içeriğinin homojen olması için küvet kapağı kapatılarak birkaç defa karıştırılmıştır. Aynı dalga boyunda (734 nm) 6. dakikaya kadar olan absorbans değeri gözlenmiş olup 6. dakikadaki köre karşı okunan absorbans $A_{6. dk}$ olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bu değerlerden sonra yüzde inhibisyon oranı aşağıdaki şekilde her örnek için ayrı hesap edilmiştir.

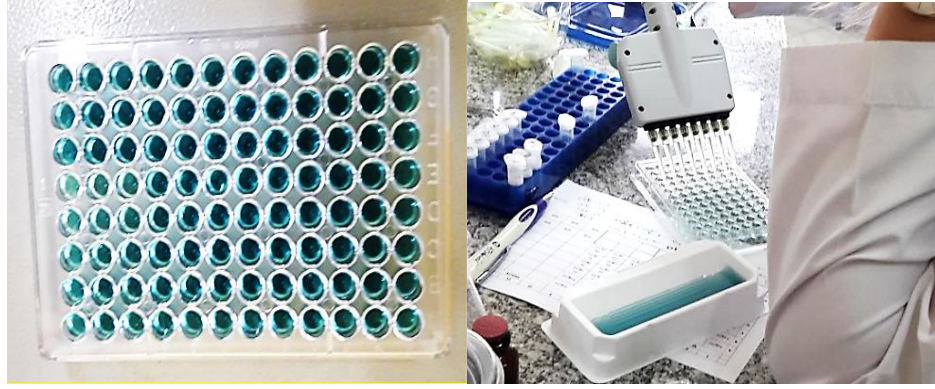
$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{ABTS•+} - A_{6. dk}) \times 100 / A_{ABTS•+}$$

Troloks standart eğrisinde % inhibisyon değerlerinin karşılık geldiği troloks eşdeğer konsantrasyonu belirlenmiştir. Sonuçlar, 'mmol/ml troloks eşdeğerliği (mM)' olarak verilmiştir. Her örnek için üçer ölçüm alınmış ve sonuçlar hesap edilirken üç ölçümün ortalaması kullanılmıştır.

TEAK Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Suda çözünen bir E vitamini türevi olan Troloks, TEAK tayinleri için en çok kullanılan standarttır. Troloks' un çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için 6.257 mg troloks tartılmış ve 5 mM fosfat tamponu kullanılarak 10 ml' ye tamamlanmıştır. Böylece 2.5 mM konsantrasyondaki stok çözelti elde edilmiştir. 2.5 mM stok çözeltiden alınan belirli hacimler, 5 mM fosfat tamponu ile seyreltilerek 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM ve 2 mM'lık standart çözelti serisi hazırlanmıştır. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilen 7 mM stok ABTS^{•+} radikal çözeltisinin 734 nm' de absorbanısı 0.700 ± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile dilüe edilmiştir. Bu çözeltiden örnek küvetine 1 ml eklenerek kör olarak 5 mM fosfat tamponunun (pH: 7.4) kullanıldığı ve 30 °C sıcaklığa sabitlenmiş spektrofotometrede, 734 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür. Daha sonra küvete 10 µl troloks standart çözeltisi eklenmiş ve kronometre çalıştırılmıştır. Küvet içeriği karıştırılarak 6 dakika süresince 734 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. 6. dakikadaki absorban değeri dikkate alınarak troloks konsantrasyonuna karşılık gelen yüzde inhibisyon değeri hesap edilmiştir. Sonuçlar “mM Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite” olarak ifade edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltiler için üçer deneme yapıp hesaplanan yüzde inhibisyonların ortalaması alınmış ve standart eğri çizilmiştir. Deneyin çalışıldığı farklı günlerde, iki veya üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbanısı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğrideki sapmalar düzeltilmiştir.



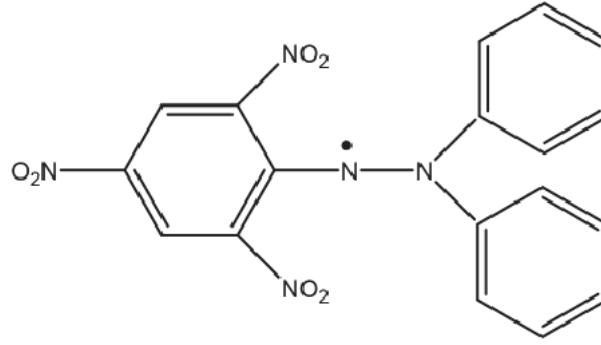
Resim 8: TEAK uygulaması sırasında çözeltilerin renk değişimi

3.4.2.4 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Örneklerin serbest radikal süpürme kapasitesi 2,2-diphenyl-1- pikrilhidrazil (DPPH•) radikalinin süpürülmesine dayanan bir yöntem ile test edilmiştir.

Bu metot DPPH• radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. DPPH• radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir. DPPH• radikali koyu menekşe renkte olup 515 nm’de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Radikal süpürücü ile muamele olan DPPH• çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma UV-görünür bölge spektrofotometresiyle ölçülür. Alternatif olarak, antioksidan indirgeme yeteneği, elektron spin rezonans ile de değerlendirilebilir. Metanolik DPPH• çözeltisindeki daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının absorbanсында daha fazla düşme, dolayısıyla yüksek radikal süpürme kapasitesi demektir (124).

Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH derişiminin % 50’sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını ifade eden IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değeri ile verilir (125, 126).



Şekil 5: DPPH• radikalinin kimyasal formülü

Denevin Yapılışı:

Yapılan çalışmada standart olarak askorbik asit'in metanolik çözeltileri (2, 4, 8, 12, 16, 20 µg/ml) kullanılmıştır. Ekstre örnekleri ve standart metanol içerisinde çözündürülerek farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrolakanın kuyucularına 100 µL örnek çözeltisi eklendikten sonra 100 µL metanolik DPPH• radikali (200 µM) ilave edilerek karıştırılmıştır. Ardından plakaların üzerine kapak kapatılarak, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda köre karşı mikrolaka okuyucuda 517 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Her bir ölçüm üç defa tekrar edilmiştir. Örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100,$$

A_B : DPPH• radikalinin absorbansı

A_A : Örneğin absorbansı

Sonuçlar ortalama % inhibisyon değeri $\pm$ ortalama standart sapma olarak ifade edilmiştir.

3.4.2.5 OH⁻ Radikali Süpürücü Aktivite

Son derece reaktif bir radikal olan reaktif hidroksil radikali (OH[•]), başta DNA, yağlar ve proteinler olmak üzere çeşitli hücresel komponentlerde oksidatif hasara neden olabilmektedir. Hidroksil yakalama aktivitesi yüksek olan bileşikler veya ürünler, OH⁻ grubunu nötralize edip hidrojen atomuna dönüştürerek inaktif hale getirirler. .Fe⁺² ve H₂O₂'in reaksiyonu (Fenton reaksiyonu) ile ortaya çıkan OH[•] radikali, DNA'daki riboz şekeri ile etkileşerek beş karbon atomunun herhangi

birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla DNA hasarına neden olmaktadır. Hidroksil radikal yakalama aktivitesinin ölçümü deoksiriboz metoduyla yapılmaktadır. Yöntemde, OH⁻ radikalinin oluşması sağlanarak 2-deoksiribozun oksidatif bozunmaya uğraması hedeflenir. Böylece bozunma ürünü malondialdehit ile TBA (2-tiyobarbitürik asit)'nin kondensasyonu kantitatif olarak spektrofotometrik yöntemle ölçülmektedir. Bu yöntemle göre; ölçülen absorbans değerinin düşük olması; yüksek deoksiriboz parçalanmasının inhibisyonu anlamına gelmektedir (127, 128).

Denevin Yapılışı:

Reaksiyon karışımı; 500 µg/ml olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra bu örneklerden 20, 60,100 µg/ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlar elde edilmiştir. Cam tüpler içerisine 100 µL ekstre çözeltisi üzerine, 175 µL 120 mM fosfat tamponu (pH:7.4), 35 µL 33.6 mM deoksiriboz, 35 µL 33.6 mM H₂O₂, 35 µL 300 µM FeCl₃, 35 µL 1.2 mM EDTA, ve 35 µL 1.2 mM askorbik asit eklenmiştir. Tüplerin ağzı kapatılarak 37 °C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyona 350 µL %1 lik TBA ve 350 µL %2.8' lik TCA (trikloroasetik asit) ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra tüpler kaynar sıcak su banyosunda 15 dk ısıtılmıştır. Tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuş ve karışımın absorbansı 532 nm' de köre karşı ölçülmüştür. Karışımın absorbans miktarındaki azalma deoksiribozun oksidasyonunun azaldığını gösterir. % İnhibisyon aşağıdaki formülden hesaplanır. Çalışmada standart olarak α-Tokoferol çözeltisi kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_k - A_s) / A_k * 100$$

A_k= Kontrolün absorbansı

A_s= Ekstaktların veya standartların varlığında ölçülen absorbans

3.3.3 Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Antimikrobik ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Bunlardan çalışmamızda kullandığımız mikrodilüsyon metodunda; standart sayıda mikroorganizma içeren mikropklara (son konsantrasyon 5x10⁵ CFU/ml),

kullanılacak olan antibiyotikler (ekstreler) özel çözücülerinde hazırlandıktan sonra iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda (2, 4, 8, 16.. µg/ml gibi) seyreltilerek ekilir. Kontrol grubu olarak kullanılan ve antibiyotik içermeyen tüpe de aynı oranda mikroorganizma ekilir. Besiyerleri 35°C’de 1 gecelik inkübasyonun ardından, bulanıklık yönünden incelenir. Mikroorganizma büyümesini önleyen ve gözle görülebilen bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenir (129, 130).

Bakteri ve mantar kökenleri

Gram-pozitif bakteri kökenlerinden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Bacillus subtilis* RSKK 02021, Gram-negatif bakteri kökenlerinden *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Salmonella enterica* RSKK 25922 kullanılmıştır. Maya mantarı kökenleri olarak *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida parapsilosis* RSKK 04057 kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi

Ekstrelerin antibakteriyel etkilerinin saptanması amacıyla CLSI kriterleri göz önünde bulundurularak mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır (131). Ekstrelerin antifungal etkilerinin saptanması amacıyla CLSI kriterlerinin modifikasyonu olan Kotmakçı ve ark.’nın uyguladığı yöntem kullanılmıştır (132). Bakteri kökenleri Mueller-Hinton agarda (Merck) 35°C’de 24 saat ve maya kökenleri Sabouraud dekstroz agarda (Merck) 35°C’de 48 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Besiyerindeki kolonilerden alınarak serum fizyolojik ile süspanse edilmiş ve süspanسیونlar dansitometre cihazı ile 0,5 McFarland’a ayarlanmıştır. Bakteri kökenleri için katyon eklenmiş Mueller-Hinton broth (Merck) ve *Candida* kökenleri için 3-(N-morpholino) propansülfonik asit ile tamponlanmış RPMI (Sigma) besiyerlerinden 50’şer µl alınarak 96’lık mikropłaka kuyucuklarına dağıtılmıştır. Bitki ekstreleri DMSO ile çözündürüldükten sonra mikropłakaların ilk kuyucuklarına ilave edilerek ½ oranında seri dilüsyonları hazırlanmış ve 1-2048 µg/ml arası konsantrasyonlar çalışılmıştır. Bakteri ve mantar süspanسیونları 1/100 oranında seyreltilmiş ve kuyucuklara ilave edilmiştir. Antimikrobiyal kontrol amacıyla siprofloksasin (İ.E. Ulagay) ve flukonazol (sigma) kullanılmıştır. 35°C’de 16 saatlik inkübasyonun ardından gözle görülebilen üremenin olmadığı en düşük

konsantrasyon değerleri minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak hesaplanmıştır. Tüm deneyler en az iki tekrarlı olarak uygulanmıştır.



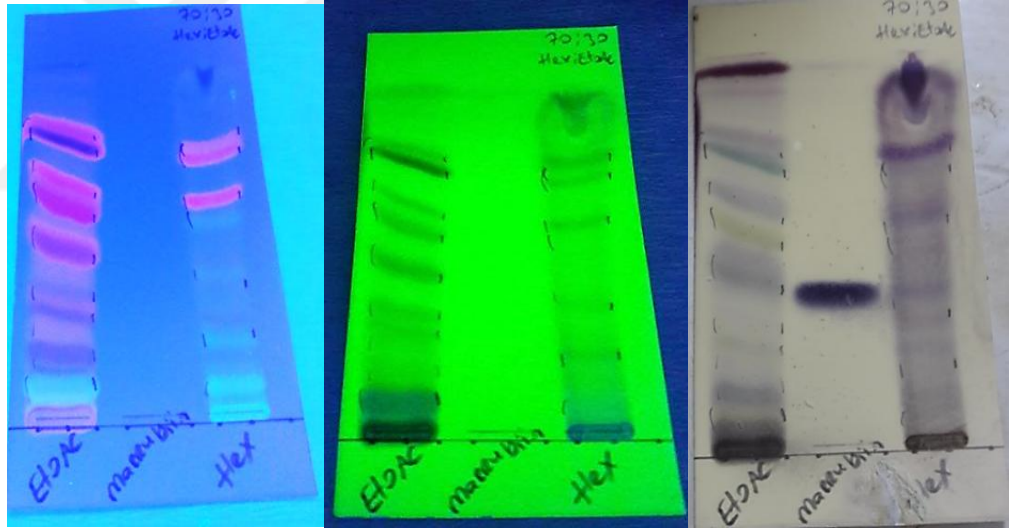
4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Bulgular

4.1.1. İTK ve YBSK Analiz Bulguları

İTK yöntemlerinde de anlatıldığı gibi kullandığımız standart fenolik maddelerden olan kersetin, vicienin- 2, rutin, klorojenik asit, CEBN 38, homooriyantin, oriyantin'nin yaptığımız ön çalışmalar sonrasında metanol ve etilasetat ekstraktlarında olabileceğine yönelik İTK profili Resim 9'da verilmiştir.

Marrubium cinsinin bazı türleri için majör bileşik olan marrubiin, İTK yöntemi ile *n*- hekzan ve etilasetat ekstraktlarında karşılaştırılmış fakat ekstraktlarda marrubiin tespit edilememiştir (Resim 9).



Resim 9: Etilasetat ve hekzan ekstresi – marrubiin karşılaştırması

Şekil 6: Marrubiin – Asidik solvan ekstresi YBSK kromatogramı

4.1.2. GC/ GC-MS Analiz Bulguları

Marrubium rotundifolium bitkisinin gaz kromatografisi sonucu uçucuyağının ve n- alkan karışımının kromatogramları Şekil 6 ve Şekil 7' de verilmiştir. Şekil 6 kromatogramı ile uçucuyağ bileşenleri belirlenirken, Şekil 7 (n- alkan karışımı) kromatogramı ile uçucuyağ bileşenlerinin AI değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan GC ve GC-MS analizlerinde, uçucuyağın % 98.74'ini oluşturan 32 pik tanımlanmıştır. GC-MS sonuçlarına göre tanımlanan piklerin yüzde miktarı 88.38'dir. Ana seskiterpen hidrokarbon bileşenleri % 82.53 olup en çok bulunanları; germakren-D (% 24.80), β -karyofillen (% 23.39), karyofillen oksit (% 16.69), trans- β -farnesen (% 6.11) ve bisiklogemakren (% 3.84)'dir. Ayrıca ana bileşenlerden biri keton grubu bileşik olan hekza dihidro farnesil aseton (% 4.00) olarak saptanmıştır. Oksijenli seskiterpenler % 5.34, oksijenli monoterpenler % 1.28 oranında bulunmuştur.

Thermo Scientific DSOII REPORT

Data File: Omek_enj1

Instrument Method: C:\Xcalibur\method\Ucucuyagiucucuyag_adams_2016.meth

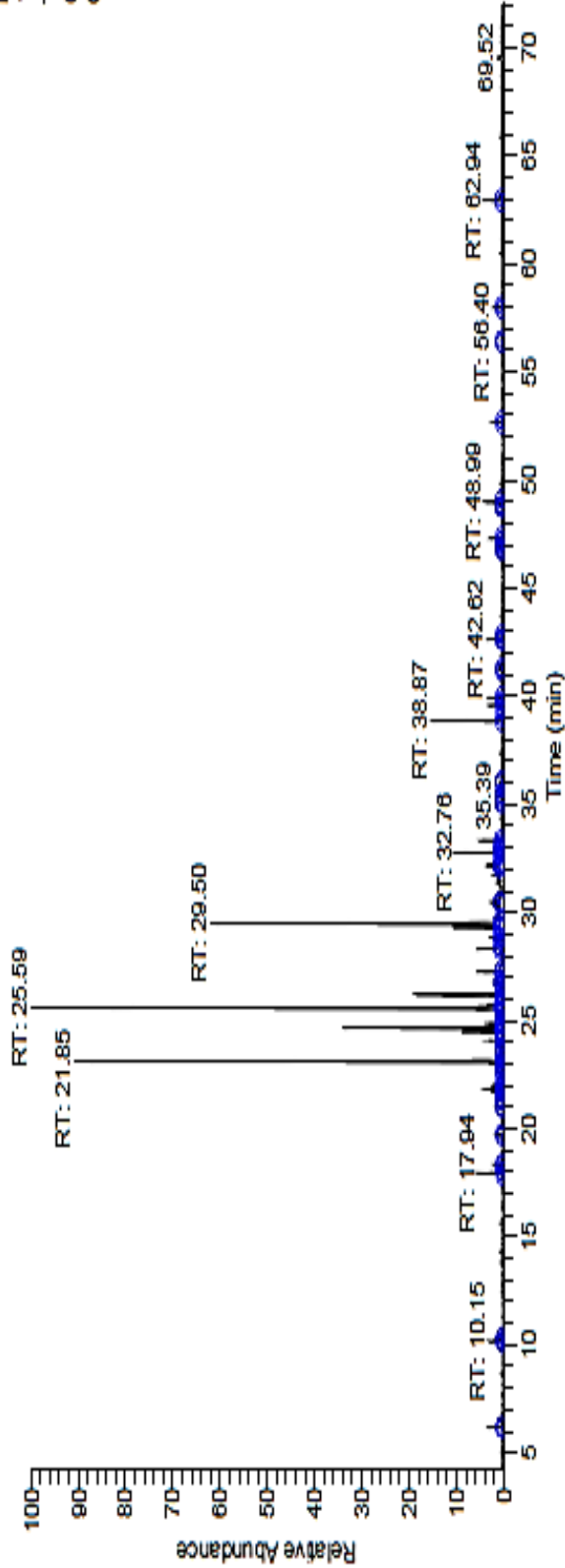
Current Data Path: C:\Xcalibur\Data\2017\Sura BAYKAN\2017 03 30

Acquisition Date: 03/31/17 10:54:38 AM

Operator: Cigdem YENGİN

RT: 4.20 - 72.01 SM: 7G

NL:
 1.93E8
 TIC MS
 Genesis
 Omek_enj1

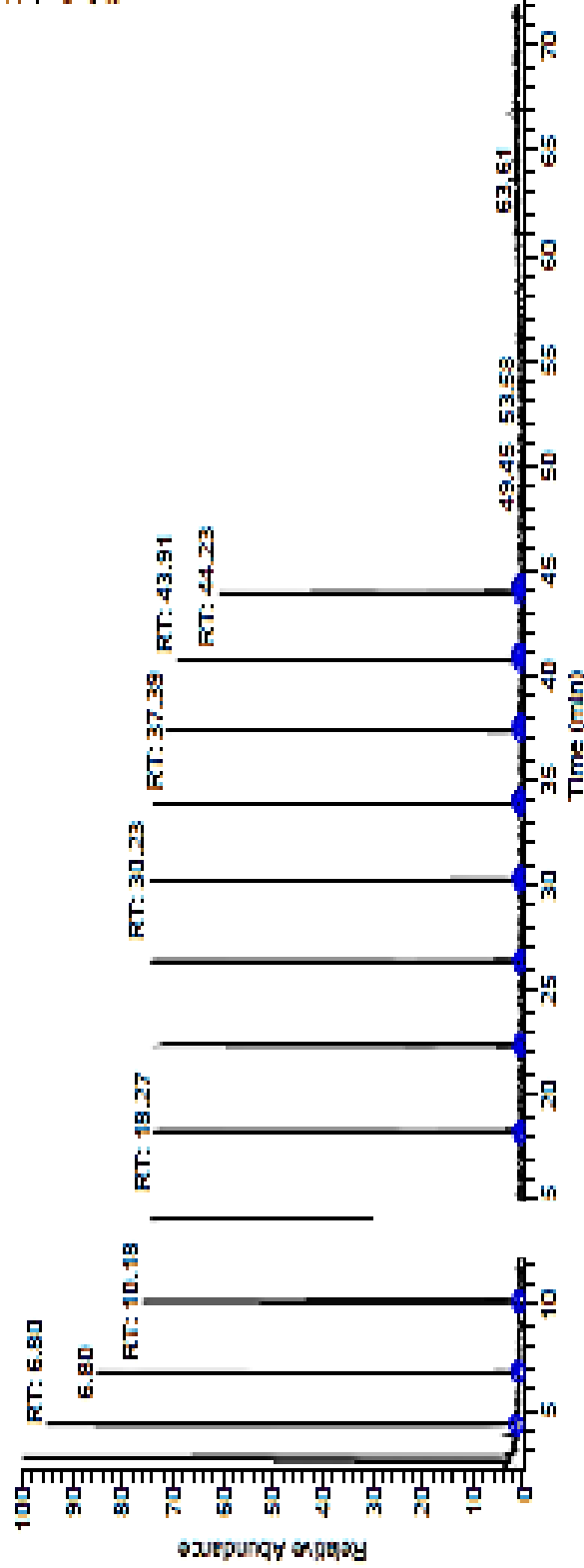


Şekil 7: *Marrubium rotundifolium* Boiss. Uçucuyagının Gaz Kromatografisi

Thermo Scientific DSQII REPORT

Data File: AlkanMbc_G-C20_002
 Instrument Method: C:\Xcalibur\method\1\user\mg\user\mg_alkan_AlkanMbc_G.ms
 Current Data Path: C:\Xcalibur\data\2017\Sun 11A\YKAN\2017 03 30
 Acquisition Date: 03/01/17 12:29:21 AM
 Operator: Cihad YENGIN
 RT: 2.20 - 72.01 SM: 7G

NL:
 3-20E7
 TIC: MS
 Genexp:
 AlkanMbc_G
 8-C20_002



Şekil 8: C8- C20 Alkan Karışımları

Tablo 10: *Marrubium rotundifolium* Boiss. Uçucuyağ Bileşik Listesi

No	RT	BİLEŞİKLER	% (MS)	% (FID)	Adams	I (hesaplanan)	Tanımlama
1	6,18	1-okten-3-ol	0.44	0.43	974	975	MS, AI
2	10,15	Linalol	0.45	0.51	1095	1099	MS, AI
3	10,31	Nonanal	0.34	0.33	1100	1103	MS, AI
4	17,94	Dihidroedulan I	1.07	1.18	-	1292	MS
5	18,34	Karvakrol	0.47	0.44	1298	1301	MS, AI
6	19,71	2-metil-bütanoik asitin heptil esteri	0.39	0.38	1317	1334	MS, AI
7	20,99	(+)-siklosativen	0.27	0.25	1369	1366	MS, AI
8	21,35	α -kopaen	0.23	0.24	1374	1374	MS, AI
9	21,71	β -bourbonen	0.46	0.48	1387	1383	MS, AI
10	22,03	β -eleman	0.53	0.52	1389	1391	MS, AI
11	23,12	β-karyofillen	18.95	23.39	1408	1418	MS, AI
12	24,08	(+)- β -funebren	0.52	0.51	1413	1442	MS, AI
13	24,47	α -karyofillen	1.70	1.65	1417	1452	MS, AI
14	24,67	Trans-β farnesen	7.98	6.11	1440	1457	MS, AI
15	25,43	τ -muurolen	0.20	-	1478	1476	MS, AI
16	25,59	Germakren -D	21.42	24.80	1484	1480	MS, AI
17	25,77	β -iyonon	0.55	0.55	1487	1484	MS, AI
18	26,19	Bisiklogermakren	3.89	3.84	1500	1495	MS, AI
19	26,70	β -bisabolen	0.39	0.38	1505	1508	MS, AI
20	27,26	δ -kadinen	1.23	1.38	1522	1522	MS, AI
21	28,82	Nerolidol	0.61	0.60	1562	1563	MS, AI
22	29,29	Spatulenol	2.20	2.24	1577	1575	MS, AI
23	29,50	Karyofillen oksit	14.36	16.69	1582	1580	MS, AI
24	32,16	α -kadinol	0.80	0.84	1652	1652	MS, AI
25	32,26	Kusinol	0.54	0.56	1679	1655	MS, AI
26	32,76	Aromadendran	2.13	2.29	-	1669	MS
27	33,31	α -bisabolol	1.07	1.10	1685	1684	MS, AI
28	35,40	Siklareol oksit	-	-	-	1743	MS

29	38,87	Hekzahidrofarnesi l aseton	2.98	4.00	-	1844	MS
30	39,60	Diiso bütıl ftalat	0.65	0.64	1868	1866	MS, AI
31	42,62	Dibütıl ftalat	0.90	0.60	-	1959	MS
32	47,32	Fitol	0.66	1.81	1942	-	MS
Toplam % Tanımlanan Bileşik			88.38	98.74			
Oksijenli monotерpenler			1.28				
Seskiterpen hidrokarbonları			82.53				
Oksijenli seskiterpenler			5.34				
Diterpenler			1.81				
Diğerleri			7.78				

4.2. Biyoaktivite Çalışmaları

4.2.1. Sitotoksisite Bulguları

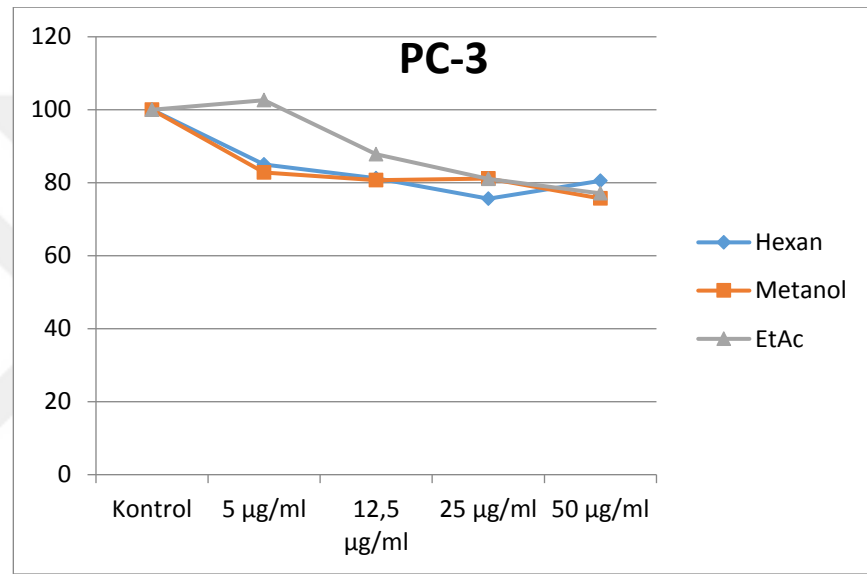
Marrubium rotundifolium toprak üstü kısımlarından elde edilen *n*-hekzan, etilasetat, metanol ekstralarının MTT yöntemi ile 3 kanser hücre hattı (CaCo-2, SH-SY5Y, PC-3) ve 2 kanser olmayan hücre hattı (NIH-3T3, HK-2) üzerine sitotoksik aktivitesi çalışılmış olup sonuçlar Tablo 11’de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre ekstraların tüm hücre hatları üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Metanol ekstresi PC-3 (Prostat kanseri) hücre hattına karşı IC₅₀: 173 µg/ml, etilasetat ekstresi CaCo-2 (kolon adenokarsinoma) hücre hattına karşı IC₅₀:262 µg/ml değerlerde inhibisyon sağlamıştır.

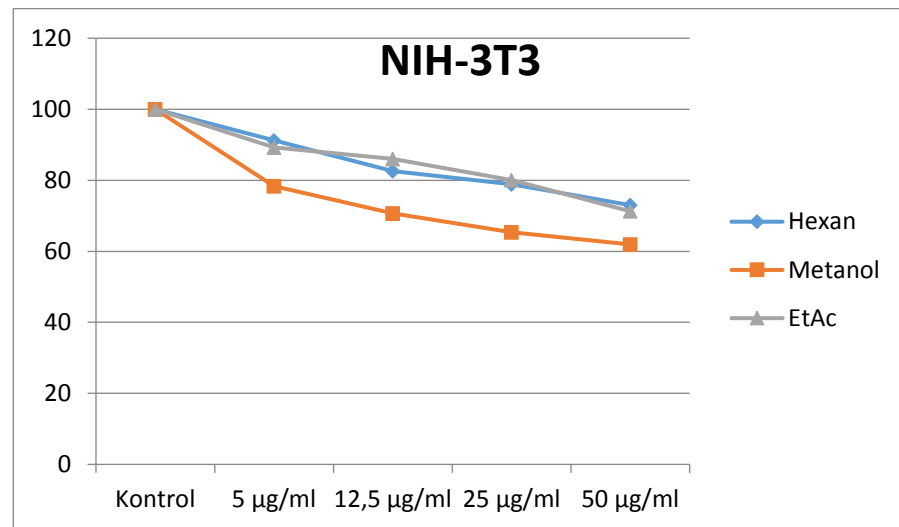
Ekstrelerin hiç biri SHSY5Y (nöroblastoma kanser hücre hattı)’na karşı etki göstermemiştir. Sağlıklı hücre hatları olan NIH-3T3 (fare embriyonik fibroblast hücre hattı) ve HK-2 (insan böbrek tübüler epitelhücre hattı) hücre hatlarında ise metanol ekstresinde daha yüksek etki görülmüştür.

Tablo 11: Ekstrelerin çeşitli hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini gösteren IC₅₀ değerleri (µg/ml)

IC ₅₀ (µg/ml)	Caco.2	SH-SY5Y	PC-3	NIH-3T3	HK-2
Metanol	778 ± 48	-	173 ± 18	75 ± 3	119 ± 2
Etilasetat	262 ± 9	-	-	139 ± 10	156 ± 11
<i>n</i> -hekzan	388 ± 31	-	243 ± 33	145 ± 9	159 ± 17



Şekil 9: Ekstrelerin PC-3 hücre hattına karşı gösterdiği etkinlik grafiğı



Şekil 10: Ekstrelerin NIH- 3T3 hücre hattına karşı gösterdiği etkinlik grafiğı

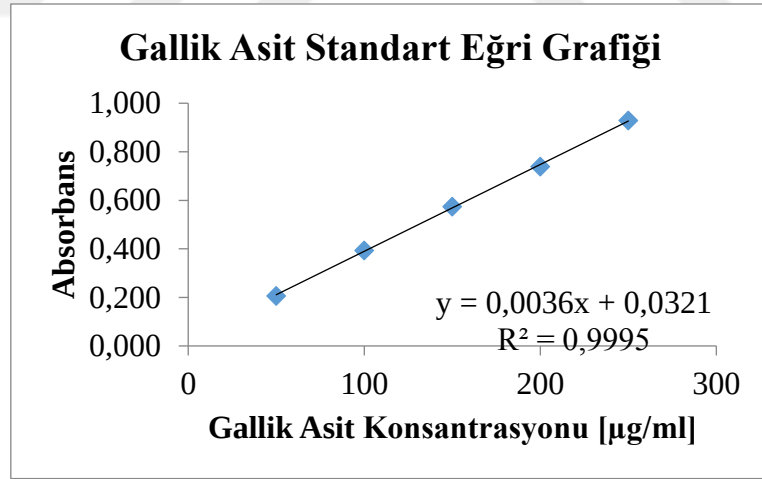
4.2.2. Antioksidan Aktivite Testi Sonuçları

4.2.2.1. Total Fenolik İçerik Testine Ait Bulgular

Marrubium rotundifolium toprak üstü kısımlarından elde edilen üç ekstrenin Folin-Ciocalteu yöntemiyle total fenolik içerikleri tespit edilmiş olup, sonuçlar Tablo 14'te, standart olarak kullanılan gallik asit'in eğrisi ise Şekil 10'da verilmiştir.

Tablo 12: Gallik asit konsantrasyonu

Gallik Asit Konsantrasyonu [µg/ml]	Ortalama Absorbans
50	0,207
100	0,394
150	0,575
200	0,739
250	0,929



Şekil 11: Gallik Asit Standart Eğri Grafiği

Elde edilen sonuçlara göre, etilasetat ve *n*-hekzan ekstralarında fenolik içerik gözlenmemiş olup metanol ekstresinde $20,62 \pm 1.6$ GAE µg/mg fenolik içeriği gözlemlenmiştir.

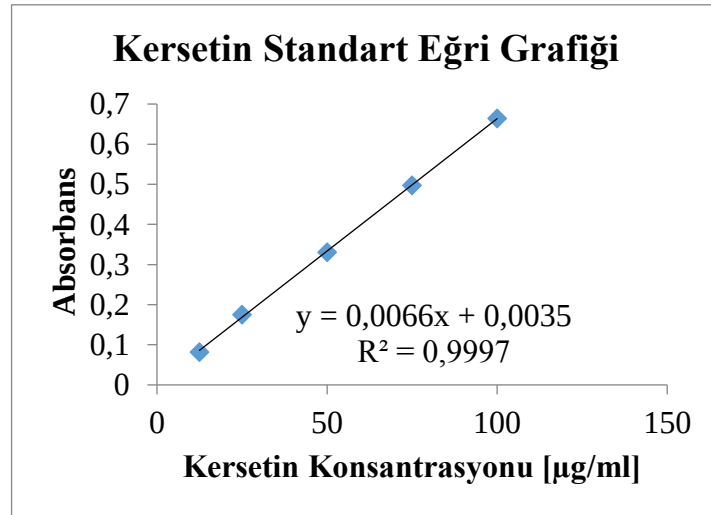
4.2.2.2.Total Flavonoid İçerik Testine Ait Bulgular

Alüminyum klorid / potasyum asetat metodu ile 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstrelerin kersetin eşdeğeri olarak konsantrasyonları belirlenmiş olup total flavonoid içerikleri saptanmıştır.

n-hekzan, etilasetat, metanol ekstralarının kersetin eşdeğer konsantrasyonları Tablo 13'te verilmiş olup, Şekil 11'de standart olarak kullanılan kersetinin standart eğri grafiği gösterilmiştir.

Tablo 13: Kersetin Konsantrasyonu

Kersetin Konsantrasyonu [µg/ml]	Ortalama Absorbans
12,5	0,082
25	0,175
50	0,331
75	0,498
100	0,664



Şekil 12: Kersetin Standart Eğri Grafiği

Elde edilen verilere göre metanol ve etilasetat ekstraksiyonları flavonoid içeriği sırasıyla 70,76 QE µg/mg ve 142,58 QE µg/mg iken en yüksek flavonoid içeriği *n*-hekzan ekstresinde gözlemlenmiş olup 168,63 QE µg/mg'dir (Tablo 14).

Tablo 14: Ekstrelerin total fenolik ve flavonoid madde içerikleri

Ekstre	Gallik Asit Eşdeğeri Total Fenolik Madde İçeriği [µg/mg] *	Kersetin Eşdeğeri Total Flavonoid İçeriği [µg/mg] **
Metanol	20,62 ± 1,6	70,76 ± 1,32
Etilasetat	***	142,58 ± 3,45
n-Hekzan	***	168,63 ± 2,78

* Ekstreler (örnekler) 0,1 mg/ml konsantrasyonda verilmiştir.

** Ekstreler (örnekler) 1 mg/ml konsantrasyonda verilmiştir.

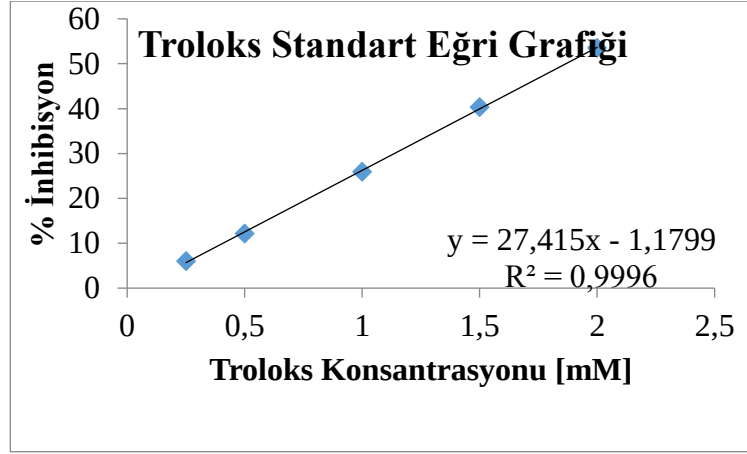
*** - madde içeriği gözlenmemiştir.

4.2.2.3. Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAK) Testine Ait Bulgular

TEAK yönteminde farklı konsantrasyonlarda troloks (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2,5 mM) ve % inhibisyon değerleri test edilmiş olup Tablo 15’te gösterilmiştir. Örneklerin (metanol, etilasetat ve hekzan), troloks standart eğri grafiği Şekil 12’de, troloks eşdeğer antioksidan kapasiteleri Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 15: Troloks Konsantrasyonu

Troloks Konsantrasyonu (mM)	% İnhibisyon
0,25	6,05
0,5	12,14
1	25,95
1,5	40,36
2	53,53



Şekil 13: Trolox Standart Eği Grafiği

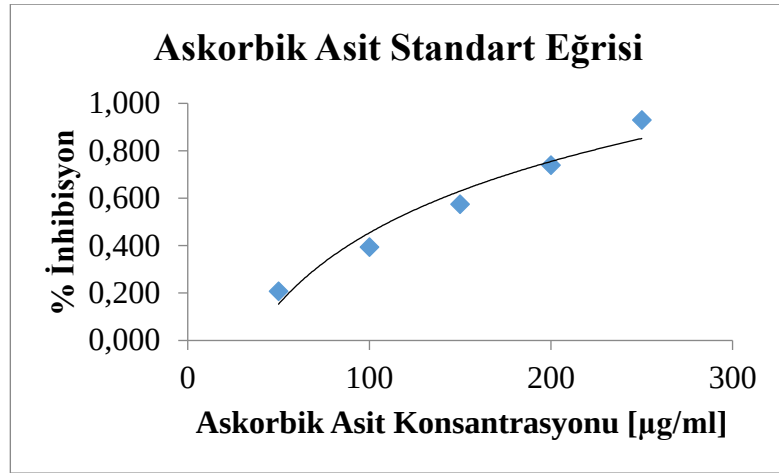
Bulgulara göre, metanol ekstresinde, konsantrasyona bağlı antioksidan kapasite artışı gözlenmiş (3.21 ± 0.081); fakat etilasetat ve hekzan ekstresinde etki gözlemlenmemiştir.

4.2.2.4 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

DPPH yöntemi ile askorbik asitin 2, 4, 8, 16, 18, 20 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (Tablo 16). Ekstrelerin askorbik asit standart eğri grafiği Şekil 13'te DPPH aktivite değerleri Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 16: Askorbik asit Konsantrasyonu

Askorbik asit Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)	% İnhibisyon
2	6,45
4	32,15
8	53,56
16	79,72
18	90,20
20	95,59



Şekil 14: Askorbik Asit Standart Eğri Grafiği

4.2.2.5 OH⁻ Radikali Süpürücü Aktivite

Reaksiyon karışımı; 500 µg/ml olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra bu örneklerden 20, 60, 100 µg/ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlar elde edilip, standart olarak askorbik asit ilave edilmiştir. 2-deoksiribozun OH⁻ radikali tarafından oksidasyonunun inhibisyonu, % inhibisyon olarak değerlendirilmiş, sonuçlar Tablo 17’de verilmiştir.

TEAK ve DPPH’ da olduğu gibi en yüksek aktivite metanol ekstresinde gözlenmiştir.

Tablo 17: Ekstrelerin OH⁻ Radikali Süpürücü etkisi, ABTS radikali süpürücü etkisi ve DPPH aktivite değerleri

	IC50 değerleri (mg ekstre/ ml)		
	Metanol	Etilasetat	n-Hekzan
OH⁻ Radikali Süpürücü etkisi	0,277 ± 0,024	0,832 ± 0,032	1,179 ± 0,132
ABTS Radikali Süpürücü Etkisi	3,21 ± 0,081	-	-
DPPH	0,033 ± 0,001	0,099 ± 0,001	-

4.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Analiz Bulguları

Gram (+) bakteri suşlarından olan *Staphylococcus aureus*'a karşı sadece etilasetat ekstresi (128 µg/ml) antimikrobiyal aktivite gösterirken, *Enterococcus faecalis* bakteri suşuna karşı hem etilasetat hem de hekzan ekstreleri aynı değerde aktivite göstermiştir. Yine Gram (+) bakteri suşlarından biri olan *Bacillus subtilis*' e karşı metanol ve hekzan ekstreleri antimikrobiyal etki göstermiştir (128 µg/ml). Fakat Gram (-) bakteri suşlarına ve maya mantarı örneklerinde antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir.



Tablo 18: Ekstrelerin antimikrobiyal etkinlik değerleri

		EtAc (µg/ ml)	Met (µg/ ml)	Hek (µg/ ml)	Siproflo ksasin (Kontrol Antibakt eriyel)	Flukona zol (Kontrol Antifung al)	DMSO (Çözücü)
Gram (+) Bakteri Kökenleri	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	128	256	256	0.25	-	-
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	128	256	128	0.25	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 02021	256	128	128	0.015	-	-
Gram (-) Bakteri Kökenleri	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	512	1024	1024	0.015	-	-
	<i>Salmonella enterica</i> RSKK 25922	512	512	1024	0.25	-	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	512	1024	1024	0.06	-	-
Maya Mantarı Kökenleri	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	512	1024	1024	-	1	-
	<i>Candida parapsilosis</i> RSKK 04057	512	512	512	-	1	-

ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu

RSKK: Refik Saydam Kültür Koleksiyonu

- Etki yok

5. TARTIŞMA

Endemik *Marubium rotundifolium* Boiss. bitkisinin toprak üstü kısımlarından yaptığımız çalışmalar ile *n*-hekzan, etilasetat, metanol ekstreleri elde edilmiştir. YBSK ve İTK yöntemleri kullanılarak bitkinin fenolik ve flavonoid bileşikleri belirlenmiş olup, GC yöntemi ile uçucuyağ bileşenleri tanımlanmıştır. Bitkinin biyoaktivite potansiyelinin araştırılmasına yönelik ekstrelerin antioksidan (total fenolik, total flavonoid, TEAK yöntemi, OH radikali ile DPPH radikali süpürücü aktivite), sitotoksikite (MTT yöntemi) ve antimikrobiyal (Mikrodilüsyon yöntemi) etkileri ilk kez tarafımızdan çalışılmıştır.

Marrubium cinsi “Flora of Turkey’de” 22 takson (18 tür) ile temsil edilmektedir. Güner tarafından 2012 yılında yayınlanan “Türkiye Bitkileri Listesi”nde *M. persicum* ve *M. sivasense* de eklenmiş ve bu sayı 24 taksona (20 tür) yükselmiştir (4). 2016 yılında Fırat ve ark. tarafından yapılan çalışma ile yeni tür olarak eklenen *M. eriocephalum* ile birlikte günümüz itibariyle toplam takson sayısı 25, tür sayısı ise 21 dir (5).

Yaptığımız literatür taramaları sırasında *Marrubium* cinsine ait dünyada yayılış gösteren ~40 taksondan 25 tanesi Türkiye florasında bulunmasına rağmen bu bitkilerin kimyasal ve biyoaktivite çalışma sayılarının oldukça sınırlı olduğu saptanmıştır. Özellikle biyoaktivite potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle Anadolu’da yayılış gösteren *Marrubium* taksonları ile daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Çalışma materyalimiz *M. rotundifolium* 2016 Haziran ayında İzmir/ Ödemiş – Bozdağ bölgesinden toplanarak herbaryum örnekleri hazırlanmış, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’na kaydedilmiştir (İZEF: 6052).

M. rotundifolium Ege Bölgesi’nde yayılış gösteren endemik bir türdür. Gencay Akgül tarafından 2008 yılında tamamlanan doktora tezi ile tüm *Marrubium*’ların botanik revizyonları yapılmıştır. Bu tezde *M. rotundifolium*’un morfolojik olarak en yakın türün *M. globosum* olduğu ve bu iki türün sıklıkla karıştırılabildiği belirtilmiştir (133).

Çalışmamızda bitkiden hazırladığımız farklı polaritedeki ekstrelerde İTK ve YBSK ile standart şahit maddeler (Klorojenik asit, kafeik asit, vanillik asit, apigenin, luteolin, *p*-kumarik asit, kemferol ve marrubiin) ile yaptığımız kıyaslama sonucu moleküllerin hiçbirisi tespit edilememiştir. Moleküller *Marrubium*’lardan bugüne

kadar izole edilen bileşikler göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Marrubiin YBSK ile Avrupa Farmakopesinde yer alan marrubiin tayin yöntemi esas alınarak da araştırılmış ve “marrubiin”ın *M. rotundifolium*’da bulunmadığı doğrulanmıştır. 2000 yılında Takeda ve arkadaşları Manisa Akseki’den toplanan *M. globosum*’dan marrubiin elde etmişlerdir (51). Bu türün *M. rotundifolium*’a en yakın tür olduğu göz önünde bulundurulduğunda marrubiinin taksonomik ayırmda önemli rol oynayabileceği belki de yapılabilecek ileri çalışmalarla cinsteki tür ayrımlarında kemotaksonomik marker olabileceği düşünülmektedir.

Bugüne kadar *Marrubium* türlerinden elde edilen uçucuyağ analizlerinde en yüksek verim ile seskiterpen hidrokarbonlar elde edilmiş olup, ana madde bileşenleri olarak β -karyofillen, germakren D, öjenol, β -bisabolen, timol, E- karyofillen, bisiklogermakren, γ -muurolen ve karyofillen oksit tanımlanmıştır. Çalışma materyalimiz olan *M. rotundifolium* Boiss. bitkisinden elde edilen uçucuyağ analizinde de majör bileşikler germakren-D (% 24.80), β -karyofillen (% 23.39), karyofillen oksit (% 16.69)’dir. Türkiye kaynaklı *Marrubium* taksonları ile yapılan uçucuyağ çalışmaları da oldukça sınırlıdır. Sarıkürkçü ve ark. tarafından Muğla-Yılanlı Dağı’ndan toplanan *M. globosum subsp. globosum*’un uçucuyağında spatulenol (% 15.8), β -karyofillen (% 9.0), karyofillen oksit (% 7.9), germakren D (% 6.5) ana bileşenler olarak rapor edilmiştir (20). Ayrıca Akgül G. yaptığı doktora tez çalışmasında Muğla- Yılanlı Dağı’ndan *M. globosum* olarak toplanan türlerin *M. rotundifolium* varyasyonları olduğunu belirtmiştir (133). Bununla birlikte sözkonusu makalede adı geçen *M. globosum*’un uçucuyağ sonuçları ile çalışma sonuçlarımız arasında görülen paralellik bu hipotezi desteklemektedir. Nitekim uçucuyağ verim ve bileşenlerinin bitkinin bulunduğu ekolojik koşullara göre oldukça değişkenlik göstermesi *M. globosum* olarak yayınlanan türün *M. rotundifolium*’un kemotipi olabileceğini düşündürmüştür. Ancak tabi ki bu hipotezin doğrulanması için de aynı lokalitelerden toplanan bitkiler ile aynı koşullarda bir çalışma yapılması gereklidir.

Bununla birlikte Denizli’den toplanan *M. bourgaei ssp. caricum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile ana bileşik olarak β -karyofillen (% 23.2), (Z)- β -farnesen (% 13.5), germakren D (% 10.3) elde edildiği rapor edilmiştir (32, 33). *M. bourgaei ssp. bourgaei* (Antalya) bitkisinin yine toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile elde edilen ana bileşikler heksadekanoyik asit (% 33.3), heksadihidrofarnesil aseton (% 6.4)’dur (33). Konya’dan toplanan *M. anisodon* toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon ile (Z)- β -farnesen (% 20.2),

nonakosan (% 18.5) β -karyofillen (% 13.3) elde edilirken (31), *Marrubium* taksonomisine dair Akgül ve ark. polen ve tohum dataalarını baz alarak yaptıkları sınıflandırmada; *M. rotundifolium*'a en yakın türler olarak *M. persicum*, *M. astracanicum*, *M. globosum* ve *M. cephalanthum* türlerini önermiştir (2). Sonuçlarımızın kemotaksonomiye katkısını bu bağlamda değerlendirebilmek amacıyla diğer türlerin de uçucuyağ çalışmaların yapılması değerli katkılar sağlayacaktır.

Germakren-D bitkilerde pek çok seskiterpenin prekürsörü olduğu düşünülen sekiterpen hidrokarbon yapıda bir bileşiktir. Yaprak biti ve kenelere karşı koruyucu (134, 135), sivrisineklere karşı insektisit olduğu gösterilmiştir (136). Bu bileşiğin uçucuyağda oldukça yüksek oranda bulunması *M. rotundifolium*'un uçucuyağının doğal bir insektisit ajan olarak kullanım potansiyelinin değerlendirilebileceğini düşündürmüştür.

Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenolik içerik tayininde elde edilen sonuçlara göre, *n*-hekzan ve etilasetat ekstresinde fenolik madde içeriği gözlenmemiş olup, metanol ekstresinde $20,62 \pm 1,6$ GAE $\mu\text{g}/\text{mg}$ değerinde fenolik içeriği gözlemlenmiştir. Manisa'dan toplanan *Marrubium rotundifolium* ile yapılan çalışmada ise en yüksek fenolik madde içeriği etilasetat ekstresinde gözlemlenmiştir ($58,32$ mg/g) (36). *M. peregrinum*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerde toplam fenolik içerik gallik asit üzerinden hesaplanmış ve metanol ekstresinde yüksek bulunduğu rapor edilmiştir (96). Bir başka çalışmada *M. deserti* bitkisinin yapraklarından elde edilen petrol eteri, etilasetat, kloroform, bütanol ve metanol ekstreleri arasında Folin- Ciocalteu kolorimetrik yöntem ile total fenolik içerik metanol ekstresinde yüksek bulunmuştur (19). Muğla'da yapılan çalışmada *M. globosum subsp. globosum* bitkisinin total fenolik madde içeriği polar alt fraksiyonlarda en yüksek bulunmuştur ($25,60 \pm 0,74$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) (20). Gaziantep' te yapılan çalışmada *M. parviflorum* bitkisinin yapraklarından *in vitro* antioksidan aktivite çalışmak amacıyla *n*-hekzan ve metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenol ve flavonoid miktarları incelenmiştir. Bu bitkilerin metanol ekstreleri yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği için *n*-hekzan ekstresine kıyasla daha önemli antioksidan aktivite sergilemiştir. Toplam fenolik içerik Folin-Ciocalteu testi ile belirlenmiştir. *M. parviflorum* metanol ekstresi fenolik madde içeriği $332,93 \pm 26,90$ olarak hesaplanmıştır (97). Sonuç olarak *Marrubium*'larla bu alanda yapılan

alışmalara baktığımızda genellikle toplam fenolik içeriğinin bizim elde ettiğimiz sonuçlarla paralel olarak polar ekstrelerde daha yüksek olduğu görülmektedir.

Aluminyum klorid/potasyum asetat metodu ile yapılan toplam flavonoid içerik tayininde ise elde edilen sonuçlara göre, metanol ve etilasetat ekstraksiyonları flavonoid içeriğı sırasıyla 70,76 QE µg/mg ve 142,58 QE µg/mg iken en yüksek flavonoid içeriğı *n*-hekzan ekstresinde gözlemlenmiş olup 168,63 QE µg/mg'dir. Yine Manisa'dan toplanan *M. rotundifolium* ile yapılan çalışmada ise en yüksek flavonoid içeriğinin etilasetat ekstresinde (29.76 mg/g) olduğu rapor edilmiştir (36). Fakat farklı *Marrubium* türlerinden yapılan çalışmalarda en yüksek flavonoid içeriğı metanol ekstresinde rapor edilmiştir (13, 18). Muhtemelen *M. rotundifolium* hekzan ekstresinde şekersiz, flavon aglikonları yüksek oranda bulunmaktadır ancak ileri fitokimyasal çalışmalar ile bu veriler desteklenmelidir.

OH⁻ ABTS ve DPPH radikal süpürücü etki çalışmalarında *M. rotundifolium* metanol ekstresi daha düşük dozlarda yüksek IC₅₀ değerleri göstermiştir (Sırasıyla; 0,277 ± 0,024, 3,21 ± 0,081, 0,033 ± 0,001 mg/ml). Radikal süpürücü etkilerin metanol ekstrlerinde bulunan yüksek fenolik madde içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir. *M. rotundifolium* total fenolik- flavonoid içerik tayini ve antioksidan aktivite potansiyelleri ilk kez tarafımızdan ortaya koyulmuştur. *Marrubium* ekstrleri ile bu alanda yapılan çalışma sayısı da oldukça sınırlıdır. 2010 yılında Sırbistan'da Stankovic tarafından yapılan çalışma ile *M. peregrinum*'un toprak üstü kısımlarından 5 farklı ekstre hazırlanmıştır (aseton, metanol, petrol eteri, etilasetat ve sodyum hidrojen karbonat). Ekstrelerin aktivitesi, DPPH radikallerinin inhibisyon yüzdesi ve IC₅₀ değerleri olarak ifade edilmiştir (µg/ml). Yüzde değerler, % 27.26 ila % 89.78 arasında değişmektedir (96). Yumrutaş ve Saygıdeğer tarafından 2010 yılında Gaziantep'te *Marrubium parviflorum* bitkisinin yapraklarından *in vitro* antioksidan aktivite çalışmak amacıyla *n*-hekzan ve metanol ekstrleri hazırlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenol ve flavonoid miktarları, β-karoten / linoleik asit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ABTS, g azaltma, metal şelasyon testleri ile incelenmiştir. Bu bitkilerin metanol ekstrleri yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği için *n*-hekzan ekstresine kıyasla daha önemli antioksidan aktivite sergilemiştir. *M. parviflorum* metanol ekstresi, DPPH 22.72 ± 0.11, ABTS 34.10 ± 1.80, g azaltma testi 46.34 ± 2.43, metal şelasyon testi 11.47 ± 0.81 değerleri ile antioksidan potansiyellerinin olduğu rapor edilmiştir (97).

Bitki ekstralarının *in vitro* sitotoksitelerini belirlemek, doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerin antikanser etkilerini araştırmak için atılan ilk adımdır. Bu düşünceyle yapmış olduğumuz sitotoksite testinde MTT yöntemi kullanılmış, 3 adet kanser (CaCo-2, SHSY5Y ve PC-3) ve 2 adet kanser olmayan hücre hattı (NIH-3T3, HK-2) üzerinde *M. rotundifolium*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol, etilasetat ve hekzan ekstralarının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ekstrelerde anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bu alanda yapılan diğer çalışmalara baktığımızda *M. thessalum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstresinin HeLa, MCF-7, FM3 ve HCT-116 olmak üzere dört insan kanser hücresi hattına karşı sitostatik etkileri ve hücre büyümesini önleyici aktiviteleri MTT metodu ile çalışılmış olup, HeLa hücre hattına karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (13). Bir başka çalışmada *M. crassidens* bitkisinin metanol ekstresinin yapılan MTT yöntemi ile MCF-7 (meme kanseri) hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi gösterilmiştir (18). Daha önce *Marrubium* türleri ile yapılan çalışmalarda, bizim kullandığımız hücre hatları kullanılmamıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi ile yaptığımız antimikrobiyal aktivite çalışmamızda *Staphylococcus aureus*'a karşı sadece etilasetat ekstresi (128 µg/ml) antimikrobiyal aktivite gösterirken, *Enterococcus faecalis* bakteri suşuna karşı hem etilasetat hem de hekzan ekstraları aynı değerde aktivite göstermiş olup (128 µg/ml), *Bacillus subtilis*'e karşı metanol ve hekzan ekstraları (her biri 128 µg/ml) antimikrobiyal etki göstermiştir. Çalışma materyalimiz olan *M. rotundifolium* ekstraları sadece Gram (+) bakteri suşlarına karşı etki göstermiştir. *M. vulgare*'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi çalışılmış olup Gram (+) bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği rapor edilmiştir (14). Ulukanlı ve Akkaya tarafından yapılan çalışmada *M. catariifolium* bitkisinin toprak üstü kısımlarının *n*-hekzan, aseton ve metanol ekstralarının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış ve hekzan ekstresinin Gram (+) bakteri suşlarına karşı artan konsantrasyonlarda etki ettiği bildirilmiştir (21).

Genel olarak *M. rotundifolium* ile farklı yöntemlerle denenen antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal etki testleri yapılmıştır. Bitkinin antioksidan etki potansiyeli bulunmakla birlikte zayıf antimikrobiyal ve sitotoksik etkili olduğu gözlenmiştir. *Marrubium* türleri ile yapılan fitokimyasal çalışmalar ile ana bileşik gruplarının diterpen yapıda bileşikler olduğu ortaya koyulmuştur. *Marrubium*

türlerinde bulunan labdan diterpenlerin analjezik, antienflamatuvar ve vazorelaksan aktivite potansiyelleri de bulunmaktadır. *M. rotundifolium* üzerinde bu alanda çalışmalarımız devam etmektedir.

Bununla birlikte, yapılan İTK çalışmaları ile bitkinin tüm ekstrelerinin kimyasal içeriğinin çok zengin olduğu görülmüştür. Bu nedenle laboratuvarımızda bitkideki bileşikleri tespit edebilmek amacı ile ileri fraksiyonlama ve saflaştırma çalışmalarına başlanmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma *Marrubium rotundifolium* Boiss. bitkisi ile yapılan ilk fitokimyasal çalışma olmakla birlikte biyoaktivite çalışmasıdır.

Daha önce *Marrubium* türlerinden izole edilen fenolik ve flavonoid yapıdaki moleküller esas alınarak *M. rotundifolium* bitkisinin fitokimyasal çalışmaları İTK ve YBSK ile bileşik kıyaslama çalışması olarak tasarlanmıştır.

Sonuç olarak İTK ve YBSK ile kıyasladığımız bileşikler tespit edilememiştir. Ancak zengin kimyasal içeriği göz önünde bulundurulduğunda laboratuvarımızda bitkideki bileşikleri tespit edebilmek amacı ile ileri fraksiyonlama ve saflaştırma çalışmalarına başlanmıştır.

GC/MS yöntemi ile uçucuyağ bileşenleri tanımlanmış olup en yüksek verimle seskiterpen hidrokarbon grubu bileşikler bulunmuştur. Majör bileşik olarak germakren D tespit edilmiştir. Bu bileşiğin *M. rotundifolium*'un uçucuyağında oldukça yüksek oranda bulunması bitkinin uçucuyağınının doğal insektisit bir ajan olarak kullanım potansiyelinin değerlendirilebileceğini düşündürmüştür.

Toplam fenolik içerik tayininde elde edilen sonuçlara göre en yüksek fenolik madde içeriği metanol ekstresinde olup $20,62 \pm 1,6$ GAE $\mu\text{g}/\text{mg}$ değerindedir. Sonuç olarak *Marrubium*'larla bu alanda yapılan çalışmalara baktığımızda çalışmamıza paralel olarak genellikle toplam fenolik içeriğinin polar ekstraktlarda daha yüksek olduğu görülmektedir.

Toplam flavonoid içerik tayininde ise en yüksek flavonoid içeriği *n*-hekzan ekstresinde gözlemlenmiş olup 168,63 QE $\mu\text{g}/\text{mg}$ 'dir. Fakat farklı *Marrubium* türlerinden yapılan çalışmalarda en yüksek flavonoid içeriği metanol ekstresinde rapor edilmiştir. Muhtemelen *M. rotundifolium* hekzan ekstresinde şekerli, flavon aglikonları yüksek oranda bulunmaktadır ancak ileri fitokimyasal çalışmalar ile bu veriler desteklenmelidir.

Biyoaktivite taramaları da yine cinse ait daha önceki çalışmalar esas alınarak planlanmış ve 3 farklı ekstrenin *in vitro* yöntemlerle sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal etkinlikleri çalışılmıştır. Genel olarak antioksidan etki potansiyeli bulunmakla birlikte zayıf antimikrobiyal ve sitotoksik etki gözlenmiştir.

Marrubium türleri (özellikle de *Marrubium vulgare*) dünyada yoğun ilgi gören türlerdir. Ancak; endemizm oranının yüksek oluşuna bağlı olarak gen merkezinin Türkiye olmasına ve yoğun yayılış alanı göstermesine rağmen, ülkemizde *Marrubium* türleri ile yapılan bilimsel çalışmalar sınırlıdır. Bu sebeple çalışmamız bu türlerle yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlayacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Martin E, Çetin Ö, Akguel G, Ay H. New chromosome numbers in the genus *Marrubium*(Horehound) from Turkey. *Biological Diversity and Conservation*. 2011;4(2):185-8.
2. Akgül G, Ketenoğlu O, Pınar NM, Kurt L, editors. Pollen and seed morphology of the genus *Marrubium* (Lamiaceae) in Turkey. *Annales Botanici Fennici*; 2008: BioOne.
3. Büyükkartal HN, Çölgeçen H, Akgül G. *Marrubium globosum* Montbret & Aucher ex Benth.'de tohum kabuğunun yapısı. *Anadolu University Journal of Sciences & Technology*. 2009;10(1).
4. Güner A. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). 1st ed. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; 2012.
5. Fırat M. *Marrubium eriocephalum* (Lamiaceae); a species new to the flora of Turkey, with contributions to its taxonomy. *PhytoKeys*. 2016(58):9.
6. Koyuncu O, Yaylaci O, Öztürk D, Potoglu Erkara I, Savaroglu F, Akcoskun O, et al. Risk categories and ethnobotanical features of the Lamiaceae taxa growing naturally in Osmaniye(Bilecik/Turkey) and environs. *Biological Diversity and Conservation*. 2010;3(3):31-45.
7. Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*. 2011;19:756-77.
8. Fakir H, Korkmaz M, Icel B. Medicinal plants traditionally used for pain alleviation in Antalya province, Turkey. *Ethno Med*. 2016;10(3):314-24.
9. De Souza M, De Jesus R, Cechinel-Filho V, Schlemper V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*. 1998;5(2):103-7.
10. Meyre-Silva C, Yunes R, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco*. 2005;60(4):321-6.
11. Khanavi M, Delnavazi M-r, Nikoui V, Ostadhadi S, Bakhtiarian A. Evaluation of analgesic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium parviflorum* by formalin test in mice. *Asian Journal of plant sciences*. 2012.
12. Karioti A, Heilmann J, Skaltsa H. Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry*. 2005;66(9):1060-6.
13. Argyropoulou A, Samara P, Tsitsilonis O, Skaltsa H. Polar constituents of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr.(Lamiaceae) and their cytotoxic/cytostatic activity. *Phytotherapy Research*. 2012;26(12):1800-6.
14. Zarai Z, Kadri A, Chobba IB, Mansour RB, Bekir A, Mejdoub H, et al. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):161.
15. Essawy SS, Abo-Elmatty DM, Ghazy NM, Badr JM, Sterner O. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Marrubium alysson* extracts in high cholesterol-fed rabbits. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014;22(5):472-82.

16. Yousefi K, Fathiazad F, Soraya H, Rameshrad M, Maleki-Dizaji N, Garjani A. *Marrubium vulgare* L. methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. *BioImpacts: BI*. 2014;4(1):21.
17. Zaabat N, Hay A-E, Michalet S, Darbour N, Bayet C, Skandrani I, et al. Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(12):3328-35.
18. Hamedeyazdan S, Sharifi S, Nazemiyeh H, Fathiazad F. Evaluating antiproliferative and antioxidant activity of *Marrubium crassidens*. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2014;4(Suppl 1):459.
19. Edziri H, Mastouri M, Aouni M, Verschaeve L. Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South African journal of botany*. 2012;80:104-9.
20. Sarikurkcu C, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Harmandar M. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*. 2008;99(10):4239-46.
21. Ulukanlı Z, Akkaya A. Antibacterial activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* var. *hirta* grown wild in Eastern Anatolia, Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2011;13(1):105-9.
22. Djahra A, Bordjiba O, Benkherara S. Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie*. 2013;11(6):348-52.
23. Hammami S, Li Z, Huang M, El Mokni R, Dhaouadi H, Yin S. New bioactive labdane diterpenoids from *Marrubium aschersonii*. *Natural product research*. 2016;30(19):2142-8.
24. Zerbe P, Chiang A, Dullat H, O'Neil- Johnson M, Starks C, Hamberger B, et al. Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. *The Plant Journal*. 2014;79(6):914-27.
25. Knöss W, Reuter B, Josef Z. Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochemical Journal*. 1997;326(2):449-54.
26. Piozzi F, Bruno M, Rosselli S, Maggio A. The diterpenoids of the genus *Marrubium* (Lamiaceae). *Nat Prod Commun*. 2006;7:585-92.
27. Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, de Waard P, van Beek TA. Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food chemistry*. 2012;130(3):695-701.
28. Weel KG, Venskutonis PR, Pukalskas A, Gruzdiene D, Linssen JP. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L) grown in Lithuania. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 1999;101(10):395-9.
29. Argyropoulou C, Skaltsa H. Identification of essential oil components of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr., growing wild in Greece. *Natural product research*. 2012;26(7):593-9.

30. Hamdaoui B, Wannes WA, Marrakchi M, Brahim NB, Marzouk B. Essential oil composition of two Tunisian Horehound species: *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium aschersonii* Magnus. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2013;16(5):608-12.
31. Kirimer Ne, Kürkçüoğlu M, Akgül G, Baser KHC, Mahmoud AA. Composition of the essential oil of *Marrubium anisodon* C. Koch of Turkish origin. *Records of Natural Products*. 2015;9(2):234.
32. Demirci B, Baser KHC, Kirimer Ne. Composition of the essential oil of *Marrubium bourgaei* ssp. *caricum* PH Davis. *Journal of Essential Oil Research*. 2004;16(2):133-4.
33. Kürkçüoğlu M, Başer KHC, Tosun A, Dogan E, Duman H. Essential oil composition of an endemic species of Turkey: *Marrubium bourgaei* Boiss. ssp. *bourgaei* (Labiatae). *Journal of Essential Oil Research*. 2007;19(1):34-6.
34. Sähpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*. 2002;79(3):389-92.
35. Hennebelle T, Sähpaz S, Skaltsounis A, Bailleul F. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochemical systematics and ecology*. 2007;35(9):624-6.
36. Özsoy N, Yılmaz-Ozden T, Serbetci T, Kultur S, Akalin E. Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase and thioredoxin reductase inhibitory activities of nine selected Turkish medicinal plants. 2017.
37. Sargin SA, Selvi S, López V. Ethnomedicinal plants of Sarigöl district (Manisa), Turkey. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;171:64-84.
38. OZTURK M, ALTAY V. AN OVERVIEW OF THE ENDEMIC MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS OF TURKIYE-CONSERVATION AND SUSTAINABLE USE. *FULL TEXT PROCEEDINGS BOOK*. 2017;10:11.
39. Topcu G, Kusman T. Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bezmialem Science*. 2014;1:1-25.
40. Güner A. *Resimli Türkiye Florası Cilt-I*. İstanbul: Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları; 2014.
41. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 93; 2007.
42. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116; 2011.
43. Ersoylu H. EDTU Herbaryumu'nda Bulunan Lamiaceae (Ballıbabagİller) Famİlyası'nın Revizyonu. Edirne: Trakya Ünİversİtesi; 2009.
44. Kahraman A, Celep F, Dogan M. Morphology, anatomy and palynology of *Salvia indica* L.(Labiatae). *World Applied Sciences Journal*. 2009;6(2):289-96.
45. Akgül G. *Marrubium vulcanicum* (Lamiaceae), a topotype from North-Eastern Anatolia. *Acta Biologica Turcica*. 2016;29(2):38-42.

46. Davis PH. *Marrubium* L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. VII. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1972. p. 165.
47. Çitoğlu G, Aksit F. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. Biochemical systematics and ecology. 2002;30(9):885-6.
48. Sagitdinova G, Makhmudov M, Tashkhodzhaev B, Mal'tsev I. Labdanoids of *Marrubium anisodon*. Chemistry of natural compounds. 1996;32(1):43-6.
49. Popa D, Pasechnik G. The structure of vulgarol—A new diterpenoid from *Marrubium vulgare*. Chemistry of Natural Compounds. 1975;11(6):752-6.
50. Salei L, Popa D, Doleish L, Lazur'evskii G. The structure of peregrinol, a diterpenoid from *Marrubium peregrinum*. II. Chemistry of Natural Compounds. 1967;3(2):75-8.
51. Takeda Y, Yanagihara K, Masuda T, Otsuka H, Honda G, Takaishi Y, et al. Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *globosum*. Chemical & pharmaceutical bulletin. 2000;48(8):1234-5.
52. Habtemariam S, Gray AI, Waterman PG. Diterpenes from the leaves of *Leonotis ocymifolia* var. *raineriana*. Journal of natural products. 1994;57(11):1570-4.
53. Salei L, Popa D, Lazur'evskii G. Diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. I. Chemistry of Natural Compounds. 1966;2(4):200-1.
54. Salei L, Popa D, Lazur'evskii G. The structure of peregrinin. Chemistry of Natural Compounds. 1970;6(2):202-5.
55. Gordin H. MARRUBIIN. Journal of the American Chemical Society. 1908;30(2):265-71.
56. Fulke J, Henderson M, McCrindle R. Some reactions of the diterpene marrubiin and its congeners. Journal of the Chemical Society C: Organic. 1968:807-10.
57. Masoodi M, Ali Z, Liang S, Yin H, Wang W, Khan IA. Labdane diterpenoids from *Marrubium vulgare*. Phytochemistry Letters. 2015;13:275-9.
58. Savona G, Piozzi F, Aranguéz LM, Rodríguez B. Diterpenes from *Marrubium sericeum*, *Marrubium supinum* and *Marrubium alysson*. Phytochemistry. 1979;18(5):859-60.
59. Rigano D, Grassia A, Borrelli F, Aviello G, Piozzi F, Bruno M, et al. Phytochemical and pharmacological studies on the acetonetic extract of *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. Planta medica. 2006;72(06):575-8.
60. Canonica L, Rindone B, Scolastico C, Ferrari G, Casagrande C. A new diterpenoid with labdane skeleton. Tetrahedron Letters. 1968;9(27):3149-52.
61. Hatam NA, Porzel A, Seifert K. Polyodonine, a prefuranic labdane diterpene from *Marrubium polydon*. Phytochemistry. 1995;40(5):1575-6.
62. Popoola OK, Elbagory AM, Ameer F, Hussein AA. Marrubiin. Molecules. 2013;18(8):9049-60.
63. Mnonopi N, Levendal R-A, Mzilikazi N, Frost C. Marrubiin, a constituent of *Leonotis leonurus*, alleviates diabetic symptoms. Phytomedicine. 2012;19(6):488-93.

64. Mnonopi N, Levendal R-A, Davies-Coleman MT, Frost CL. The cardioprotective effects of marrubiin, a diterpenoid found in *Leonotis leonurus* extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;138(1):67-75.
65. Gilani AH. Antispasmodic and Ca^{++} antagonist potential of marrubiin, a labdane type diterpene from *Phlomis bracteosa*. *Journal of Pharmacy Research*. 2011;4(1):178.
66. Mughal UR, Mehmood R, Malik A, Ali B, Safder M, Tareen RB. Spiraamide, new sphingolipid from *Spiraea brahuica*. *Journal of Asian natural products research*. 2012;14(6):601-6.
67. El Bardai S, Morel N, Wibo M, Fabre N, Llabres G, Lyoussi B, et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta medica*. 2003;69(01):75-7.
68. Paula de Oliveira A, Santin JR, Lemos M, Klein Júnior LC, Couto AG, Meyre da Silva Bittencourt C, et al. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(9):1230-7.
69. Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;108(3):379-84.
70. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*. 2012;83(2):286-92.
71. Sahpaz S, Hennebelle T, Bailleul F. Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural product letters*. 2002;16(3):195-9.
72. Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Piné R, Madani K, Segura-Carretero A. Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*. 2014;61:120-9.
73. Çalış İ, Hosny M, Khalifa T, Rüedi P. Phenylpropanoid glycosides from *Marrubium alysson*. *Phytochemistry*. 1992;31(10):3624-6.
74. Karioti A, Protopappa A, Megoulas N, Skaltsa H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007;15(7):2708-14.
75. Tanker M, Tanker N. *Farmakognozi*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 1998. 269 p.
76. Khalil A, Dababneh BF, Al-Gabbiesh AH. Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal Jordanian plants. *J Food Agric Env*. 2009;7:103-6.
77. Baher Nik Z, Mirza M, Shahmir F. Essential oil of *Marrubium cuneatum* Russell and its secretory elements. *Flavour and fragrance journal*. 2004;19(3):233-5.
78. Belhattab R, Larous L, Figueiredo AC, Santos PA, Costa MM, Barroso JG, et al. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 2006;18(4):369-73.

79. Kadri A, Zarai Z, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(19):3908-14.
80. Zawislak G. Chemical composition of essential oils of *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium incanum* Desr. grown in Poland. *Chemija*. 2012;23(2).
81. Khanavi M, Ghasemian L, Motlagh EH, Hadjiakhoondi A, Shafiee A. Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & CA Mey. and *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. 2005;20(3):324-6.
82. Lazari DM, Skaltsa HD, Constantinidis T. Essential oils of *Marrubium velutinum* Sm. and *Marrubium peregrinum* L., growing wild in Greece. *Flavour and fragrance journal*. 1999;14(5):290-2.
83. Kaurinovic B, Vlaisavljevic S, Popovic M, Vastag D, Djurendic-Brenesel M. Antioxidant properties of *Marrubium peregrinum* L.(Lamiaceae) essential oil. *Molecules*. 2010;15(9):5943-55.
84. Masoudi S, Aghajani Z, Rustaiyan A, Feizbakhsh A, Kakhky AM. Volatile constituents of *Teucrium persicum* Boiss., *Thymus caucasicus* Willd. ex Ronniger subsp. *grossheimii* (Ronniger) Jalas. and *Marrubium crassidens* Boiss. Three Labiatae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2009;21(1):5-7.
85. Petrović S, Pavlović M, Maksimović Z, Milenković M, Couladis M, Tzakouc O, et al. Composition and antimicrobial activity of *Marrubium incanum* Desr.(Lamiaceae) essential oil. *Natural product communications*. 2009;4(3):431-4.
86. Javidnia K, Miri R, Soltani M, Khosravi A. Constituents of the essential oil of *Marrubium astracanicum* Jacq. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*. 2007;19(6):559-61.
87. Nik ZB, Mirza M. Composition of the essential oil of *Marrubium astracanicum* Jacq. *Journal of Essential Oil Research*. 2003;15(5):342-3.
88. Laouer H, Yabrir B, Djeridane A, Yousfi M, Beldovini N, Lamamra M. Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Marrubium deserti*. *Natural product communications*. 2009;4(8):1133-8.
89. Baytop T. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul: Nobel Yayınları; 1999.
90. Sarac N, Ugur A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian Journal of BioSciences*. 2007;4:28-37.
91. Tetik F, Civelek S, Cakilcioglu U. Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *Journal of ethnopharmacology*. 2013;146(1):331-46.
92. Vergara-Galicia J, Aguirre-Crespo F, Tun-Suarez A, Aguirre-Crespo A, Estrada-Carrillo M, Jaimes-Huerta I, et al. Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology*. 2012;3(1):54-60.
93. VanderJagt T, Ghattas R, VanderJagt D, Crossey M, Glew R. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*. 2002;70(9):1035-40.

94. Ghorbani A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran:(Part 1): General results. Journal of Ethnopharmacology. 2005;102(1):58-68.
95. Kahkeshani N, Gharedaghi M, Hadjiakhoondi A, Sharifzadeh M, Khanavi M. Antinociceptive effect of extracts of *Marrubium astracanicum* Jacq. aerial parts. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2017;7(1):73.
96. Stankovic MS. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. Kragujevac J Sci. 2011;33(2011):63-72.
97. Yumrutas O, Saygideger SD. Determination of in vitro antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish et Mey. and *Lamium amplexicaule* L. from South east of Turkey. Journal of Medicinal Plants Research. 2010;4(20):2164-72.
98. Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA, Nagy AA, Abdel-Sattar E. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. International Journal of Diabetes Mellitus. 2015;3(1):37-44.
99. De Jesus R, Cechinel-Filho V, Oliveira A, Schlemper V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. Phytomedicine. 2000;7(2):111-5.
100. Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, Cechinel Filho V. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. Phytomedicine. 1996;3(2):211-6.
101. Davis PH. *Marrubium* L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. VII. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1972. p. 173.
102. Anonymous. European Pharmacopoeia 3rd ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 1996. 121 p.
103. Karioti A, Skaltsa H, Heilmann J, Sticher O. Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*. Phytochemistry. 2003;64(2):655-60.
104. Demiröz T. Endemik *Centaurea goeksunense* Aytaç & H. Duman bitkisinin kimyasal içeriğinin ve biyoaktivite potansiyelinin araştırılması İzmir: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi; 2016.
105. Anonim. Türk Farmakopesi II Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu. Ankara: TC. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Analiz ve Kontrol Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Farmakope Birimi; 2016. 398-400 p.
106. Ulukanli Z, Karabörklü S, Öztürk B, Çenet M, Balcılar M. Chemical composition, antibacterial and insecticidal activities of the essential oil from the *Pistacia terebinthus* L. Spp. Palaestina (Boiss.)(Anacardiaceae). Journal of food processing and preservation. 2014;38(3):815-22.
107. Adams RP. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy 4th ed: Allured Business Media,Carol Stream,IL; 2009.

108. Öztürk B, Konyalıoğlu S, Kantarci G, Çetinkol D. İzmir Yöresindeki Yabani Lavandula stoechas L. subsp. stoechas Taksonundan Elde Edilen Uçucu Yağın Bileşimi, Antibakteriyel, Antifungal Ve Antioksidan Kapasitesi. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2005;15(1).
109. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of immunological methods. 1986;89(2):271-7.
110. Horáková Kn, Šovčíková A, Seemannová Z, Syrová D, Bušányová Kn, Drobná Z, et al. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 2001;30(6):650-64.
111. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):55-63.
112. Young I, Woodside J. Antioxidants in health and disease. Journal of clinical pathology. 2001;54(3):176-86.
113. Gök V, Serteser A. Doğal antioksidanların biyoyararlılığı. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi. 2003:2-4.
114. Badarinath A, Rao KM, Chetty CMS, Ramkanth S, Rajan T, Gnanaprakash K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. International Journal of PharmTech Research. 2010;2(2):1276-85.
115. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of agricultural and food chemistry. 1999;47(10):3954-62.
116. Nagai T, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) Equisetum arvense L. Food chemistry. 2005;91(3):389-94.
117. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology. 1999;299:152-78.
118. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food chemistry. 2001;73(1):73-84.
119. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis. 2002;10(3).
120. Niki E. [3] Free radical initiators as source of water-or lipid-soluble peroxy radicals. Methods in enzymology. 1990;186:100-8.
121. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(7):1815-21.
122. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 1999;26(9):1231-7.

123. Aydın Köse F. Kronik böbrek yetmezliğinde hemodiyaliz ve periton diyalizinin oksidatif stres üzerindeki etkisi. İzmir: Ege Üniversitesi; 2009.
124. Wang KJ, Zhang YJ, Yang CR. New Phenolic Constituents from *Balanophora polyandra* with Radical- Scavenging Activity. *Chemistry & biodiversity*. 2006;3(12):1317-24.
125. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995;28(1):25-30.
126. Amarowicz R, Pegg R, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil J. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*. 2004;84(4):551-62.
127. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(5):1887-92.
128. Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. The deoxyribose method: a simple “test-tube” assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical biochemistry*. 1987;165(1):215-9.
129. Wkler MA, Cockerill FR, Bush K, Dudely M, Etiopoule GM, Hardy DJ, et al. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests; Approved standard.
130. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(11):1749-55.
131. Wayne P. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
132. Kotmakci M, Öztürk İ, Kantarci G, Ermertcan Ş. Characterization and Antimicrobial Activity of Novel Hazelnut Oil Microemulsion Loaded with Mitomycin C. *Lat Am J Pharm Am J Pharm*. 2015;34(3):529-36.
133. Akgül G. Türkiye *Marrubium* L. (Lamiaceae) cinsinin revizyonu. Ankara: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı; 2004.
134. Bruce TJ, Birkett MA, Blande J, Hooper AM, Martin JL, Khambay B, et al. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest management science*. 2005;61(11):1115-21.
135. Birkett MA, Al Abassi S, Kröber T, Chamberlain K, Hooper AM, Guerin PM, et al. Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggat, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry*. 2008;69(8):1710-5.
136. Kiran SR, Devi PS. Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitology research*. 2007;101(2):413-8.

8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında AYDIN’da doğdum. 2015 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. Aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım.

