

***Inula graveolens* (L.) Desf. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR**

Yüksek Lisans Tezi

Hande ARIKAN

Eskişehir 2019

***Inula graveolens* (L.) Desf. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ÇALIŞMALAR**

Hande ARIKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayhan Altıntaş

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hande ARIKAN'ın “*Inula graveolens* (L.) Desf. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar” başlıklı tezi 21/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ	
Üye	: Doç. Dr. Gökalg İŞCAN	
Üye	: Prof. Dr. Osman ÜSTÜN	
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN		
Enstitü Müdürü		

ÖZET

Inula graveolens (L.) Desf. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOĞNOZİK ÇALIŞMALAR

Hande ARIKAN

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Inula graveolens (L.) Desf. Asteraceae familyasından *Inula* (L.) Desf. cinsine ait bir bitkidir ve Türkiye’de doğal olarak yetişmektedir. Ülkemizde iri pire otu adıyla da anılmaktadır. Uzun yıllar boyunca dünyanın pek çok ülkesinde geleneksel tedavide kendine kullanım alanı bulmuştur. Uçucu yağı ve ekstresi üzerinde yapılan pek çok çalışmada antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda öncelikle bitkinin farmakope standartlarında yabancı madde miktar, kül miktar, asitte erimeyen kül ve su miktar tayini yapılmıştır. Ardından gaz kromatografisi (GK) ve alev iyonizasyon dedektörü (AID) kullanılarak uçucu yağ bileşenleri tayin edilmiştir. Farklı zamanlarda toplanmış olmasına rağmen ana bileşenler borneol ve bornil asetat olarak bulunmuştur. Çalışmanın devamında metanol, etil asetat, kloroform ve hekzan kullanılarak ekstreler elde edilmiştir. Ekstrelerin verim hesaplaması yapılmış ve antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayininde Gram negatif suşlar (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*), Gram pozitif suşlar (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) ve mantarlar (*Candida albicans* ve *Candida krusei*) kullanılmıştır. Ekstrelerin en fazla *Salmonella typhimurium* üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Antioksidan aktivite tayin yöntemi olarak 4 farklı metod denenmiştir. DPPH radikalini süpürücü etki tayini, Folin-Ciocalteu reaktifi yöntemi ile total fenolik bileşik tayini, toplam antioksidan statü tayini (TAS) ve toplam oksidan statü tayini (TOS) çalışmaları yapılmıştır. Ekstrelerin antioksidan özellik sergilediği gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Inula*, *Inula graveolens*, *Dittrichia graveolens*, Antioksidan Aktivite, Antimikrobiyal Aktivite

ABSTRACT

PHARMACOGNOSTICAL RESEARCH ON *INULA GRAVEOLENS* (L.) Desf. PLANT

Hande ARIKAN

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayhan ALTINTAŞ

Inula graveolens (L.) Desf. is a plant belonging to the genus *Inula* (L.) of the Asteraceae family and grows naturally in Türkiye. It is also called “iri pire otu” in our country. For many years, it has found its use in traditional treatment in many countries of the world. Many studies on essential oil and extract have been observed to have antioxidant and antimicrobial activity. In our study, firstly, foreign matter, total ash, ash insoluble in hydrochloric acid and determination of water by distillation were determined in the pharmacopeia standards of the plant. Volatile oil components were then determined using gas chromatography (GC) and flame ionization detector (FID). Although collected at different times, the main components were borneol and bornyl acetate. Subsequently, extracts were obtained using methanol, ethyl acetate, chloroform and hexane. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts were calculated. Antimicrobial activity was determined by Gram negative strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*), Gram positive strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) and fungi (*Candida albicans* and *Candida krusei*). The extracts were found to be most effective on *Salmonella typhimurium*. Four different methods have been tried as antioxidant activity determination method. DPPH radical scavenging effect determination, Folin-Ciocalteu reagent method, total phenolic compound determination, total antioxidant status determination (TAS) and total oxidant status determination (TOS) studies were performed. It was observed that the extracts exhibited antioxidant properties.

Keywords: *Inula*, *Inula graveolens*, *Dittrichia graveolens*, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca deneyim, bilgi ve desteğini sabırla benimle paylaşan, karşılaştığım zorluklar ve aksilikler konusunda yardımlarını esirgemeyen sevgili danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayhan ALTINTAŞ'a,

Antioksidan aktivite çalışmaları sırasında beraber çalışma fırsatı bulduğum, tüm sorularımı içtenlikle yanıtlayan Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ceylan HEPOKUR'a

Bilgi ve tecrübesiyle değerli önerilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye,

Çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Gözde ÖZTÜRK'e,

Bitkileri toplama aşamasında beraber arazi çalışması yaptığım Sayın Ragıp ŞENTÜRK'e,

Yüksek lisans öğreniminde sıklıkla fikir tecrübe ve yardımlarına başvurduğum Ecz. Zeynep ORALOĞLU, Ecz. Neşe ÇETİN ve Ecz. İrem YILDIZ'a,

Hayatım boyunca olduğu gibi lisansüstü eğitimim boyunca da her zaman maddi ve özellikle manevi destekleri ile beni bir an olsun yalnız bırakmayan anneme, babama ve kız kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vii
İÇİNDEKİLER	viii
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
Sayfa.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Bitkilerde Antimikrobiyal Aktivite	4
2.1.1.Bitkilerde yer alan antimikrobiyal etkili bileşikler	5
2.1.1.1. Organik asitler	5
2.1.1.2. Fenolik bileşikler.....	5
2.1.1.3. Uçucu yağlar	5
2.1.1.4. Alkaloidler	6
2.1.1.5. Lektinler ve polipeptitler	6
2.2. Bitkilerde Antioksidan Aktivite	7
2.2.1. Serbest radikal ve oksidatif stres kavramı.....	7

2.2.2. Antioksidan maddeler	8
2.3. Asteraceae (Compositae) Familyası Genel Özellikleri.....	9
2.3.1. <i>Inula</i> L. cins özellikleri.....	10
2.3.1.1. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.	12
2.3.1.1.1. Türün botanik özellikleri.....	12
2.3.1.1.2. Türün sistematikteki yeri	13
2.3.1.1.3. Türün Türkiye dağılımı	13
2.3.1.1.4. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. yaygın isimleri.....	14
2.3.1.1.5. Bitkiye ait genel bilgiler	14
2.3.1.1.6. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. üzerine yapılan çalışmalar.....	15
<i>Inula graveolens</i> kimyasal kompozisyonu üzerine yapılan çalışmalar.....	15
<i>Inula graveolens</i> farmakolojik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar.....	16
2.3.1.1.7. Bornil asetat ve borneol	22
Borneol	23
Bornil asetat	23
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	24
3.1. Bitkisel Materyal.....	24
3.2. Yabancı Madde Miktar Tayini	26
3.3. Su Miktar Tayini.....	26
3.4. Uçucu Yağ Miktar Tayini.....	27
3.4.1. Gaz kromatografisi (GK)/(AİD) ve gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi (GK/KS) ile uçucu yağın kimyasal bileşiminin belirlenmesi.....	28
3.4.1.1. Gaz kromatografisi (GK)/alev iyonizasyon dedektörü (AİD)	29
3.4.1.2. Gaz kromatografisi (GK)/Kütle spektrometre (KS)	29

3.5. Ekstrelerin Hazırlanışı.....	29
3.6. Bütün Kül.....	30
3.7. Asitte Erimeyen Kül.....	31
3.8. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	31
3.8.1. Mikroorganizmalar	31
3.8.2. Besiyerleri.....	31
3.8.3. Sterilizasyon	31
3.8.4. Mikroorganizmaların inkübasyonu.....	32
3.8.5. Mikrodilüsyon yöntemi	32
3.9. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	32
3.9.1. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH •) radikalini süpürücü etki tayini .	32
3.9.1.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	33
3.9.1.2. Deneyin yapılışı	33
3.9.2. Folin-Ciocalteu yöntemi ile total fenolik bileşik tayini	34
3.9.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	34
3.9.2.2. Deneyin yapılışı	35
3.9.3. TAS (Toplam antioksidan statü) tayini	35
3.9.4. TOS (Toplam oksidan statü) tayini	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Yabancı Madde Miktar Tayini Sonuçları.....	38
4.2. Su Miktar Tayini İşlem Sonuçları	38
4.3. Uçucu Yağ Miktar Tayini İşlem Sonuçları.....	38
4.3.1. <i>Inula graveolens</i> uçucu yağının kimyasal bileşimi.....	38
4.4. Ekstre Eldesi ve Elde Edilen Ekstrelerin Özellikleri	39
4.5. Kül Miktar Tayini.....	40
4.6. Asitte Erimeyen Kül.....	40
4.7. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	40

4.8. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	42
4.8.1. Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki tayini	42
4.8.2. Toplam fenol miktar tayini deney sonuçları	45
4.8.3. Toplam antioksidan statü tayini deney sonuçları.....	46
4.8.4. Toplam oksidan statü tayini deney sonuçları	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKÇA	54
ÖZGEÇMİŞ	65

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. bitkisinin Türkiye’de dağılımı.....	13
Görsel 3.1. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. çiçeksiz.....	24
Görsel 3.2. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. çiçekli.....	25
Görsel 3.3. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.’e ait çeşitli kesitler.....	25
Görsel 3.4. <i>Inula graveolens</i> (L.) Desf.’e ait kuru drog.....	26
Görsel 3.5. Su miktar tayini aparatı.....	27
Görsel 3.6. Uçucu yağ miktar tayini aparatı (Clevenger).....	28
Görsel 3.7. Elde edilen uçucu yağ.....	28
Görsel 3.8. Ekstrelerin elde edilme aşaması.....	30
Görsel 3.9. Rotavaporda çözücünün uçurulması işlemi.....	30
Görsel 4.1. Mikroplak düzeneği (boyama sonrası).....	41
Görsel 4.2. DPPH radikali giderme çalışmasına ait pipetlemeler.....	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Enzimatik antioksidanlar.....	8
Tablo 2.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	8
Tablo 2.3. Türkiye’de yetişen <i>Inula</i> türlerine bazı örnekler.....	11
Tablo 2.4. Bitkinin sistematikteki yeri.....	13
Tablo 3.1. DPPH radikali ile antioksidan aktivite tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler.....	34
Tablo 3.2. Toplam polifenol madde tayini.....	35
Tablo 3.3. TAS ölçümü kit prosedürü.....	36
Tablo 3.4. TOS ölçümü kit prosedürü.....	37
Tablo 4.1. <i>Inula graveolens</i> uçucu yağının kimyasal bileşimi örnek 01, 02, 03, 04...	39
Tablo 4.2. <i>Inula graveolens</i> bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin verim %’leri.....	40
Tablo 4.3. Bitkiye ait farklı ekstrelerin tabloda belirtilen mikroorganizmalar üzerinde minimum inhibitör konsantrasyon düzeyleri.....	41
Tablo 4.4. Ekstrele ait inhibisyon ve yüzde derişim ($\mu\text{g/mL}$) değerleri.....	43
Tablo 4.5. <i>Inula graveolens</i> ’ten elde edilen ekstrelerin IC50 değerleri.....	45
Tablo 4.6. Ekstrelerin içediği gallik asite eşdeğer (gae) toplam fenol miktarları.....	45
Tablo 4.7. TAS deneyi verileri (mmol Trolox Equiv./L).....	46
Tablo 4.8. TOS deneyi verileri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L).....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Borneol molekül şekli	23
Şekil 2.2. Bornil asetat molekül şekli	24
Şekil 3.1. DPPH radikali molekül yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon	33
Şekil 4.1. Askorbik asit standart grafiği	42
Şekil 4.2. Inula graveolens kloroformlu ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi	43
Şekil 4.3. Inula graveolens etil asetatlı ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi .	44
Şekil 4.4. Inula graveolens metanollü ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi ...	44
Şekil 4.5. Inula graveolens hekzanlı ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi	45
Şekil 4.6. Gallik asit standart grafiği	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan Akciğer Karsinomu
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACHE	: Asetilkolinesteraz
APX	: Askorbat Peroksidaz Enzimi
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CAT	: Katalaz Enzimi
DPPH •	: Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
E	: Etil Asetat
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FOL	: Fusarium Oxysporum F. Sp. Lycopersici
FOM	: Fusarium Oxysporum F. Sp. Melonis
FOT	: Fusarium Oxysporum F. Sp. Tuberosi
G6PD	: Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
GPX	: Glutasyon Peroksidaz Enzimi
GR	: Glutasyon Redüktaz Enzimi
GST	: Glutasyon S-Transferaz Enzimi
H	: Hekzan
HELA	: İnsan Serviks Karsinomu
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
HT 29	: İnsan Kolon Karsinomu
IC50	: %50 inhibisyon sağlayan antioksidan konsantrasyon
K	: Kloroform
KB-3	: Nazofaringeal Karsinoma
KB-V1	: Vinblastin Dirençli Hücreleri
LDH	: Laktat Dehidrojenaz Enzimi
M	: Metanol
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MCF-7	: İnsan Göğüs Adenokarsinomu
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
M.Ö	: Milattan Önce
P-388	: Murin Lemfositik Lösemi

SK-KS/KS	: Sıvı kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
SOD	: Süperoksit Dismutaz Enzimi
T47D	: Göğüs Kanseri Hücreleri
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
WHO	: (World Health Organization) Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya üstünde bulunan her bir varlık bir düzen içinde yaşar. Mitolojiye göre bitkiler tanrılar yoluyla insanlara verilmiş bir ödüldür. Bu inanışa göre bütün bitkiler insanlığın hizmetindedir ve insanın varoluşuyla beraber bitkilerle olan ilişkisi başlamıştır (Tarhan, Arslan ve Şar, 2016).

İnsanlar bitkilerin iyileştirici gücü olduğuna tarih boyunca inanmışlardır ve yine insanlık tarihi boyunca bitkilerin farklı şekilleri şifa bulmak amacıyla veya direkt gıda olarak tüketilmiştir. Dünyanın her yerinde bitkilerin kullanıldığına dair çok sayıda tarihi kanıt rastlanmıştır. 60.000 yıl öncesinde neandertal insanı tarafından hatmi bitkisinin kullanıldığı görülmüştür (Erdoğan ve Everest, 2013).

Bitkilerin tedavide kullanıldığını gösteren ilk kayıtlar milattan önce 3000 yıllarından kalma Sümerlere ait kalıntılar, Mezopotamya'da medeniyetlerin bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavi aradığını kanıtlar. Milattan önce 2500 yıllarında yaşamış olan Rig Veda bitkileri tıbbi amaçla kullanmıştır. Modern tıbbın babası Hipokrat'ın eserlerinde çok sayıda bitkisel ürün anlatılmaktadır. Birinci yüzyılda Dioskorides'e ait De Materia Medica adlı eser modern farmakolojinin temelini oluşturan en eski yapıtlardandır (Ataç, 2004); (Erdoğan ve Everest, 2013).

Ebu-Reyhan'a ait Kitab-al-Saydalafi-al-Tıp adlı eserde yirmi kadar tıbbi bitkiden bahsedilir. İbn-i Sina Tıp Kanunu kitabında 800 kadar bitkisel ve hayvansal tedavi yöntemine yer vermiştir. Al Gafini de bitkilerle tedavi açısından önemli çalışmalarda bulunmuştur (Şarışen ve Çalışkan, 2005).

Yirminci yüzyıl başlarında ilaçların neredeyse yarıya yakını bitkisel kökenli olmasına rağmen yirminci yüzyıl ortalarından sonra bu oran oldukça azalmıştır. 90'lı yıllardan itibaren bitkiler için çok daha farklı kullanım alanları söz konusu olmuştur. Şu anda tıbbi bitki piyasasının yıllık yaklaşık 50 milyar dolardan daha fazla değere sahip olduğu bilinmektedir (Bayram vd., 2010).

Tıbbi amaçlarla kullanılan bitki sayısının 75.000 kadar olduğu tahmin edilmekte, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarında ise 20.000 türün tıbbi kullanımı olduğu belirtilmektedir. 4.000 bitki kökenli drog etkin bir şekilde kullanılmakta, Batı Avrupa'da 400 kadar bitkisel droğun alım-satımı yapılmaktadır. Ülkemizde 500 kadar bitki türü tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). 1997 senesinde yapılmış bir araştırmadan edinilen bilgilere göre; Amerikada bitkisel ilaç

satışının bir önceki seneye göre %59 artışta olduğu görülmüştür. Ayrıca hastaların %3-5 kadarı yalnızca bitkisel tedavi tercih etmektedir. Bu tedavilere Amerika'da yılda 3 milyar dolardan fazla, İngiltere'de ise 50 milyon sterline yakın para harcanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine bakarak insanların %75'ten fazlasının doğal tedavi yöntemlerini tercih ettiğini söylemek mümkündür. Bu veriler bitkisel ilaçlara olan talep ve güvenin en büyük göstergesidir (Şarışen ve Çalışkan, 2005). Ek olarak dünyanın pek çok ülkesinde geniş bir kullanım alanı bulan reçeteli ilaçların etken maddelerini (salisilik asit, morfin, kodein gibi) bitkilerden izole edilmiş maddeler oluşturmaktadır (Erdem ve Eren, 2009); (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Bitkilerin içerdiği kimyasallar yararlı veya zararlı etkilere sahip olabilmektedir (Al-Snafi, 2018). Araştırmalara göre bitkilere olan güven bazen istenmeyen etkilere de neden olabilmektedir. Bitkilerin içerdiği toksik maddeler öldürücü etkiye sahip olabilir. Bu yan etkilere türlü mekanizmalar yol açar; bunlar alerjik reaksiyonlar, kontaminasyona bağlı durumlar veya ilaç-bitki etkileşimleri olabilir. Aynı çalışmada 25 farklı ginseng üzerinde yapılan çalışmalarda ginsenosit ve eleutherosit maddelerinin 15'ten 200 kata kadar değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Şarışen ve Çalışkan, 2005). Bu durum bitkisel ilaç ve maddelere yönelik çalışmaların önemini göstermektedir.

Organik üretilmiş bitkiler ve droglara sürekli olarak ilgi artmaktadır. Son zamanlarda organik ürünler oldukça revaçtadır. Bu durum doğala ve doğaya olan dönüşü açıklamaktadır (Bayram, vd., 2010).

Dünya üstünde genellikle tropikal bölgelerde ölümlerin yüzde elli kadarı enfeksiyondan dolayıdır. Örneğin Afrika kıtasında senede üç yüz bin kadar çocuk *Escherichia coli*, *Shigella* ve *Salmonella*'ya bağlı hastalıklar sebebiyle hayatını kaybeder. Gelişmemiş ülkelerde bu tür ölümler normal karşılanırken gelişmiş ülkelerde de rastlanabilmektedir. Amerikada yapılan bir araştırmada, 1981 senesinde gözlenen enfeksiyon kaynaklı ölümler 9 sene içinde beşinci sıradan üçüncü sıraya ulaşmıştır (Karou, vd., 2007). Mikroorganizmalar zamanla antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları oldukça büyük sıkıntılar doğuracak bir sorun haline gelmektedir (Öztürk, 2002). Bu direnç mekanizmaları nedeni ile yeni antibiyotik arama çalışmaları yoğunlaştırılmış ve bitkiler de araştırmalar için zengin bir potansiyel kaynak teşkil etmiştir.

Bitkilerde bulunan çeşitli organlardan (gövde, yaprak, tomurcuk, meyve, çiçek, tohum gibi) elde edilen uçucu yağlar veya ekstraktların içeriğinde bulunan saponin,

kumarin, alkoloit, flavonoit gibi maddeler antimikrobiyal özellik gösterebilmektedir. Bitkilerin içerdiği maddelerin miktarları kimyasal yapı, iklim, coğrafya, konsantrasyon gibi durumlara bağlı olarak değişebilir (Şengün ve Öztürk, 2018).

Reaktif oksijen türleri, yüksek reaktiviteleri dolayısıyla hasar vermeye eğilimlidirler ve bu nedenle potansiyel olarak toksik, mutajenik veya karsinojeniktirler. Reaktif oksijen türlerinin verdiği hasarın ana hedefleri DNA, lipidler ve protein gibi hücredeki büyük moleküllerdir (Gençaslan, 2007).

Bitkilerin serbest radikal oluşumuna karşı geliştirdiği çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bunlar enzimatik veya enzimatik olmayan savunma mekanizmaları olarak sınıflandırılabilirler. (Arıkan, İpek ve Pırlak, 2017).

Tez çalışmamızın konusu olan *Inula graveolens* (L.) Desf. *Inula* cinsi Asteraceae familyasına ait bir bitkidir. Türkiye’ de iri pire otu ismiyle bilinmektedir (Silinsin, 2016). Asteraceae (Compositae) familyası dünyadaki en büyük bitki ailelerinden biridir. Yaklaşık 25000 kadar takson içerir. Pek çok cins ve türe sahiptir ve dünyanın çok büyük bir kısmında dağılım göstermektedir. Bitkiler içerdikleri çeşitli kimyasallar sayesinde çok sayıda bilimsel çalışmanın da konusunu oluşturmaktadır (Kılıç, 2014). *Inula* türlerinden geleneksel tıbbi amaçla kullanılanlar da bulunmaktadır. (Gökbulut, 2011). Araştırmamızın konusunu oluşturan bitkinin cinsi yapılan revizyon çalışması sonucunda *Dittrichia* olarak güncellenmiştir. *Dittrichia* cinsi Greuter tarafından 1973 yılında tanımlanmıştır. Türkiye’de iki tür ile temsil edilmektedir. Bu türler *Dittrichia viscosa* (Sinonim; *Inula viscosa* (L.) Aiton) ve *Dittrichia graveolens* (Sinonim; *Inula graveolens* (L.) Desf.) şeklindedir. *D. graveolens* Asya ve Avrupa geleneksel tıbbında anti-infektif, anti-inflamatuar, sedatif, patojenlere karşı, hemoroid tedavisinde, astımda, yaralanmalarda uzun sürelerdir kullanılmaktadır (Sevindik, Paksoy ve Aydın, 2017). Fakat çalışmamızda yapılan bu değişikliğe rağmen bitkiden *Inula graveolens* olarak bahsedilecektir.

Çalışmamızda uçucu yağ eldesi çalışması yapılmış ve yağ analiz edilmiştir. Yabancı madde miktar tayini, su miktar ve kül miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları ile de bitkinin yeni etken madde ve ilaç geliştirme çalışmaları için temel olması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Bitkilerde Antimikrobiyal Aktivite

Mikroorganizmaların gelişimlerini ve üremelerini durduran (bakteriyostatik etki) veya öldüren (bakterisidal etki) maddelere antimikrobiyal madde denir. Bu sınıfa giren maddeler; antiseptik, antibiyotik ve inhibitör etkili maddelerdir (Temiz, 2000). Antibiyotikler mikroorganizmaların büyümesini engelleyen veya ölmelerine yol açan maddelerdir. Biyolojik kaynaklı olabildikleri gibi sentetik olarak elde edilebilmektedir. Çok etkili biyoaktif maddelerdir. Etki şekilleri ve etkiledikleri mikroorganizmalar değişkenlik gösterir. Mikroorganizmanın hücre duvar yapısını bozarak, protein sentezini inhibe ederek ya da mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu maddeleri yok ederek etki gösterirler (Topal, vd., 2015).

Antimikrobiyal aktivite çeşitli durumlara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bitki türü, kimyasal kompozisyonu ve konsantrasyonu, hedef mikroorganizma türü ve yükü gibi durumlar aktivitelerin değişkenlik göstermesine yol açabilir. Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar bitkilerden elde edilen maddelerin antioksidan ve antimikrobiyal özellik sergileyebileceğini göstermektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Çin’de kullanılan ilaçların neredeyse yarısını geleneksel bitkisel ilaçlar oluşturur. Gana Nijerya gibi Afrika ülkelerinde sıtmadan kaynaklanan ateşin tedavisinde çocuklarda öncelikle bitkisel tedavi tercih edilmektedir (Karou, vd., 2007). Sentetik antibiyotiklerin keşfi ile beraber bitkilerin mikroorganizmalar üzerinde ilaç şeklinde kullanımı oldukça azalmıştır fakat antibiyotiklere karşı direnç gelişmesi ve bitkilerdeki maddelerin antimikrobiyal etkilerinin bulunması, bitkileri ilaç keşfi için yeniden araştırmaların odağı yapmıştır (Karou, vd., 2007).

Bir diğer önemli husus da özellikle mantarlara yönelik tarım ilaçlarının aşırı kullanımının diğer pestisidlere göre daha fazla risk oluşturmasıdır. Bu nedenle alternatif kontrol metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki ekstreleri içerdikleri zengin biyoaktif kimyasallar sayesinde fitopatojenik mantarları kontrol etmek için kullanılabilir. Ayrıca doğada kolayca parçalanabilirler ve doğayı kirletici etkileri yoktur. Bu doğal ürünlerin mevcut fungusitlerin yerine geçme potansiyelleri vardır. Allelokimyasallar (biyolojik olarak aktif ve doğal) alternatif olarak araştırılmaktadır ve günümüzde herbisit ve fungusit olarak kullanılmaktadır (Omezzine, vd., 2011).

2.1.1.Bitkilerde yer alan antimikrobiyal etkili bileşikler

2.1.1.1. Organik asitler

Organik asitler mikroorganizmalar üzerinde etki gösterip gıdaların ömrünü uzatarak dikkat çekmişlerdir (Çelikyurt ve Arıcı, 2008). Organik asitler pH'ı değiştirirler böylelikle hammaddenin taşıdığı veya bulaşma yolu ile geçen mikroorganizmaların gelişimini engeller veya üremesini durdururlar. Bu özellikleri gıdalarda koruyucu olarak kullanılmalarını sağlamıştır. Limon soğan, üzüm gibi çeşitli bitkilerin antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve yapılarında bulunan organik asitlerin bu etkiyi sağladığı görülmüştür. Süksinik asit, sitrik asit, malik asit, tartarik asit, benzoik asit, formik asit, laktik asit, propiyonik asit gibi organik asitler meyve ve sebzelerin yapısında doğal olarak bulunabilmektedir ve mantarlarla mikroorganizmaların yaptığı bozunmayı önlemek için kullanılabilmektedir (Şengün ve Öztürk, 2018). *Escherichia coli* ve *Salmonella* üzerinde etkili olduğu gözlenen organik asit türleri bulunmaktadır (Yılmaz ve Hunt, 2017).

2.1.1.2. Fenolik bileşikler

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerden olan fenolik bileşikler bitkiye koku, renk, lezzet vermek gibi çeşitli fonksiyonlar barındırırlar. Aynı zamanda bulundurdıkları hidroksil grupları bakterilerin hücre zarını etkileyerek antibakteriyel özellik sergilemektedir (Şengün ve Öztürk, 2018).

Fenolik bileşenler flavanoit ve fenolik asit olmak üzere iki alt başlıkta toplanır. Fenolik asitler de kendi arasında benzoik asit ve sinamik asit olmak üzere ikiye ayrılır. Flavonoitler ise 6 grupta toplanır. Bunlar; flavanoller, flavanonlar, flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler şeklindedir (Çimen, 1999). Polen, çiçek, yaprak, gibi çeşitli bitki kısımlarında bulunabilen flavonoitler güçlü antioksidan aktivite gösterebilen bileşiklerdir. 4000 kadar yapısı aydınlatılmış flavonoit bulunmaktadır. Kersetin, kateşin, epikateşin, genistein, mirisetin çeşitli flavonoitlere örnektir (Koca ve Karadeniz, 2005).

2.1.1.3. Uçucu yağlar

Su distilasyonu, buhar distilasyonu, kuru distilasyon, sıkma gibi çeşitli yöntemlerle elde edilebilen ve oda ısısında sıvı halde bulunabilen maddelerdir. Salgı tüyü salgı kanalı veya salgı cebi gibi farklı yapılarda görülebilir, bitkilerin çiçek, meyve, kök, yaprak gibi farklı organlardan elde edilebilirler. Kolayca kristalleşirler, genellikle

renksizdirler ve güzel kokuları bulunmaktadır bu özellikleri nedeniyle esans olarak da adlandırılabilirler. Su ile karışmazlar (Kılıç, 2008).

Tıbbi bitkilere ait uçucu yağların bileşimlerinin araştırılması bilimsel ve ekonomik açılardan oldukça önemlidir. Günümüzde antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin artmış olması yeni antibiyotik keşfini ve doğal olarak bitkilere yönelik çalışmaların sayısının artmasını zorunlu kılmıştır (Erdoğan, 2014). Mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki veya ölmelerine sebep olan etki son bulgulara göre uçucu yağ içinde bulunan başlıca bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Boyraz ve Özcan, 1997).

Bitkilerden elde edilen çeşitli uçucu yağlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda antibakteriyel aktivite gözlenmiştir. Nane, kimyon, rezene ve defne uçucu yağları *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*'i inhibe etmiştir (Koyuncu, Yıldırım ve Duranoğlu, 2008). Çalışmamızın konusunu oluşturan *Inula graveolens* uçucu yağı üzerinde daha önce yapılan pek çok çalışmada mikroorganizmalar üzerinde aktivite gözlenmiştir. Çalışmalara ve sonuçlara değinilmiştir.

2.1.1.4. Alkaloitler

Alkaloitler bilinen en eski ilaçlardandır ve çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir, geniş kapsamlı biyolojik etki gösterirler. Alkaloitler yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilmekle beraber bazı organizma ve hayvanlar tarafından da üretilebilmektedir (Waller, 2012); (Gencay, 2013).

Heterosiklik yapılı nitrojen içeren bileşik anlamına gelmektedir, bu tanım aminler, aminoasitler, peptitler, proteinler, nükleikasitler, nükleotitler, porfinler, vitaminler, nitro ve nitroz bileşikleri gibi azotlu bileşikler hariç bugüne kadar alkaloitler olarak kabul edilen tüm bileşikleri kapsamaktadır. Bugün alkaloitlerin çoğu hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal özellik sergileyen bir alkaloit olan berberinler tripanozom ve plazmodyuma karşı etkilidir (Cowan, 1999).

2.1.1.5. Lektinler ve polipeptitler

Peptitler ilk kez 1942 yılında belgelenmiştir. Antibikrobiyal aktivite göstermektedirler. Bu büyük moleküllerin bakteri ve mantarlar üzerindeki etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise HIV Human Immunodeficiency Virus (Insan Immün Yetmezlik Virüsü) virüsü üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır. Arpa-buğdayda yer alan tionin peptidleri 47 aminoasitten oluşurlar ve

çeşitli maya türleri, Gram negatif ve pozitifler üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu bilinmektedir (Cowan, 1999).

Lektinler ise şekerlere bağlı olarak bulunabilen protein veya glikoprotein yapısındaki maddelerdir. Endojen ve eksojen lektinler olarak sınıflandırılabilirler. İlk kez Stillmark tarafından zehirli bir bitkiden elde edilen lektinlerin kanser tedavisinde uzun süredir kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Öztabak, 2005); (Çetin ve Özçelik, 2007).

2.2. Bitkilerde Antioksidan Aktivite

Reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda üretildiği zaman organizmalar doğal antioksidan savunma mekanizmalarını kullanarak bu durumdan kurtulmak için antioksidan bileşikler üretirler. Bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak bilinen maddeler çok miktarda üretilir ve bu sekonder metabolitler beslenme yolu ile vücuda alınarak insanlarda da aynı antioksidan aktiviteyi gösterebilirler. Antioksidanların bu öneminin keşfinden sonra tüketiminin artırılması günümüzde sıklıkla önerilmektedir (Yavaşer, 2011).

2.2.1. Serbest radikal ve oksidatif stres kavramı

Kuantum kimyası bir bağın yapısında iki elektron bulunduğunu söyler böylelikle kararlı elektron çiftleri oluşmuş olur. İnsan vücudundaki neredeyse bütün elektronlar kararlı elektron çiftleri şeklinde bulunur. Bağ kopması durumunda elektronlar bir atomun yapısına katılarak beraber kalırlar ya da her elektron farklı bir atoma gidecek şekilde uzaklaşırlar. Beraber kalırlarsa oluşan atom iyon dönüşür veya ayrılma durumunda serbest radikal meydana gelir. Yüksek enerjiye sahip elektronlar, eşleşmiş elektron çiftlerini ayırarak fonksiyonlarının bozulmasına neden olur. Lipit, protein, nükleik asit gibi vücutta bulunan bileşikler serbest radikallerin tetiklediği oksidatif reaksiyonlar sonucu zarar görürler. Bu olayların sonucu olarak da vücutta pek çok biyolojik sorun meydana gelir (Aydemir ve Sarı, 1999). Kısacası oksidan-antioksidanlar arasındaki dengesizlik hücre yapısının bozulmasından başlayarak çok ciddi hasarların meydana gelmesine yol açabilir (Yavaşer, 2011).

Serbest radikallerin hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipit peroksit radikalleri gibi farklı kimyasal türleri bulunmaktadır. Oksijenden türeyen serbest radikaller en önemlilerindendir. Hücrelerde çeşitli sebeplerden dolayı oluşabilirler. Bunlar; parakuat, alloksan gibi kimyasallar, ilaç zehirlenmeleri, radyasyon, hava kirliliğine neden olan maddeler, sigara, çeşitli sitotoksik ajanlardır. Bu yüzden toksikoloji de serbest radikaller

ile ilgilenir (Mercan, 2004). İnflamasyon, yaşlanma, aşırı oksijen basıncı, ozon, azotdioksit gibi unsurlar da metabolizmadaki serbest radikal üretiminde artışa neden olur (Akagün, 2009).

2.2.2. Antioksidan maddeler

Bitkiler oksidatif strese maruz kaldıkları zaman detoksifikasyonu sağlayan çeşitli antioksidanlara ve çeşitli antioksidan mekanizmalara sahiptirler (Büyük, vd., 2012).

Antioksidanlar okside olabilen maddelere oranla düşük konsantrasyonlarda bulunabilir ve oksidasyonu önleyici veya geciktirici maddeler olarak tanımlanabilirler. Temel olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Enzimatik olmayan antioksidanlar tokoferoller, askorbik asit, karotenoidler, glutatyon, askorbat ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar ise (SOD) süperoksit dismutaz, (CAT) katalaz, (APX) askorbat peroksidaz, (GPX) glutatyon peroksidaz, (GR) glutatyon redüktaz, (GST) glutatyon S-transferaz ve (G6PD) glukoz 6-fosfat dehidrogenaz şeklindedir (Arıkan, İpek ve Pırlak, 2017). Bu görevi yerine getirirken çeşitli şekillerde (toplayıcı, bastırıcı, zincir kırıcı, onarıcı, etki ederler (Akagün, 2009).

Antioksidanları Tablo 2.1 ve 2.2'deki gibi göstermek mümkündür.

Tablo 2.1. Enzimatik antioksidanlar (Büyük, Soydam-Aydın ve Aras, 2012.)

Enzimatik antioksidanlar, görevleri ve bulunduğu organeller	
Süperoksit Dismutaz	O ₂ 'yi H ₂ O ₂ 'ye dönüştürür. Bulunduğu organel: Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Katalaz	O ₂ 'yi H ₂ O ₂ 'ye dönüştürür. Bulunduğu organel: Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Fosfolipit Hidroperoksit	Hidroperoksit GPx ve Peroksidazlar. Bulunduğu organel: Kloroplast, sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum

Tablo 2.2 Enzimatik olmayan antioksidanlar (Büyük, Soydam-Aydın ve Aras, 2012.)

Enzimatik olmayan antioksidanlar, görevleri ve bulunduğu organeller	
Karotenoitler	O ₂ ve OH 'ı temizler. Bulunduğu organel: Sitozol ve vakuol
E vitamini	Lipit peroksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini O ₂ ve OH 'ı temizler. Bulunduğu organel: Kloroplast membranları
Askorbik Asit	O ₂ , OH, H ₂ O ₂ 'yu temizler.

	Bulunduğu organel: Kloroplast, apoplast, vakuol, sitozol
Glutatyon	-OH ve O ₂ 'nin direk temizlenmesinde yararlıdır. Bulunduğu organel: Sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri
Fenolik Bileşikler	Hidrojen ve elektron verici özellik gösterirler. Aynı zamanda zincir kırıcı ve şelat yapıcı özellikleri de bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde güçlü antioksidan özellik gösterirler. Bulunduğu organel: Sitozol, vakuol

Bitkilerde en fazla sayıda bulunan sekonder metabolit olan fenolik bileşiklerden 4000 kadarının yapısı aydınlatılmıştır ve gün geçtikçe yapısı aydınlatılan bileşik sayısı artmaktadır. Bitkisel ürünlerin antioksidan özellik göstermelerinin sebebi yapılarında fenolik bileşik taşımalarıdır (Bacanlı, vd., 2015)

Flavonoidler çeşitli oksitleyici türleri (süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve peroksit radikalleri) üzerinde süpürücü etki göstermektedir. Çok sayıda bitki bileşeninin serbest radikal temizleyici veya antioksidan aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Fenoller çok önemli bitkisel bileşenlerdir. Pek çok bitki türünün antioksidan aktivitesi ile total fenol miktarı arasında pozitif bir ilişki vardır, sebebi hidroksil gruplarının radikal süpürücü etkisidir. Fenolik bileşenlerin efektif hidrojen donörü olduğu rapor edilmiştir bu da antioksidan özellik sergilemelerine sebep olur (Al-Fartosy, 2011).

2.3. Asteraceae (Compositae) Familyası Genel Özellikleri

Asteraceae familyasının dünya genelinde 1600 kadar cins ve 22750 tür içerdiği bilinmektedir. Türkiye'nin de en zengin familyalarından biridir. Ülkemizde 130'a yakın cins ve 1100'e yakın tür barındırır (Gökbulut, 2011).

Antartika hariç dünyanın her yerinde familyaya rastlamak mümkündür. Türlerin çeşitliliği güneybatı Amerika ve Meksika'da, Brezilya'nın güney kesimleri ve Güney Amerika Andes Dağları arasındaki bölgede, Akdeniz bölgesinde, Asyanın iç kesimleri ve güneybatı bölgesi ile Güney Afrika ve Avustralya'da fazladır (http-1).

Yıllık, iki yıllık veya çok yıllık bitkilerdir (Davis, 1975). Bitkilerin büyük bir kısmı otsu yapıdayken, çalı ve ağaçlar sayıca daha azdır (Gökbulut, 2011). Dokular bazen lateksli (süt taşıyıcı) bazense latekssizdir. Yapraklar alternat veya bazen karşılıklı dizilim gösterir, genelde tabandadır, nadiren stipulaya benzeyen, bütün, dişli, loplu, derin parçalıdır. Bireysel çiçekler genellikle çok sayıdadır (nadiren tektir), sapsızdır ve koruyucu involukrum ile çevrelenmiş kapitulum içine kümelenmiştir. Kapitula bazen

kapituluma benzer baş kısma benzer ikinci kapitulum içine gizlenmiştir. Çiçek tablası çıplak, palealı, uzun tüylerle kaplı veya kıllı olabilir. Çiçekler epiğindir, ovaryumu alt durumlu, epiğin bir çiçekte ovaryum çiçek tablası içine gömülüdür, çiçek örtüsü ve stamenler çiçek tablasına ovaryumdan üst bir seviyede bağlıdır, bu şekilde ovaryum alt durumludur. Korollanın petalleri birleşiktir, tübüler, filiform, ligulate olabilir veya nadiren iki dudaklı, genellikle 3 veya 5 dişlidir, nadiren komple eksiktir. Stamenler epipetal yapıda, filamentler genelde bağımsızdır. Ovaryum alt durumlu, 1 hücreli, bazal anatrop ovül şekli genelde iki dala bölünmüş gibidir, disk çiçeklerin taşıdığı tüyler anter silindirinden polenleri süpürür. Meyve akendir (Davis, 1975).

Asteraceae familyası; Tubuliflorae (Asteroideae, Tubiflorae) ve Liguliflorae (Cichorioideae) olmak üzere iki alt familyaya ayrılır. Tubuliflorae alt familyasında kapitulumdaki çiçeklerin hepsi veya ortadakiler tüp şeklinde, çevresindekiler dilsidir ve eczacılıkta kullanılanlar bu familyada bulunur. Liguliflorae alt familyasında uçucu yağ nadiren görülür (Gökbulut, 2011). Familyaya ait bitkiler gıda maddesi olarak, ilaç elde etmede hammadde olarak süs bitkisi olarak vb. çeşitli amaçlarla kullanılabilir (Süslü, vd., 2010).

2.3.1. *Inula* L. cins özellikleri

Yüzden fazla tür içeren, asya ve avrupanın ılıman bölgelerinde yaşayan ve çeşitli amaçlarla faydalanan bitki ilk kez Yunan ve romalı antik tıpçılar tarafından kullanılmıştır (Seca, vd., 2014). *Inula* cinsi ilk kez Linnaeus tarafından 1753-54 yıllarında tanımlanmıştır (Şeker ve Çetin, 2013).

Çoğunlukla uzun ömürlü bitki veya yarı çalı, fakat bazen yıllık veya iki yıllık bitkilerdir. Kökler dik veya yükselen yapıda, genellikle dallanmış, nadiren gövdesizlerdir. Yaprakların tamamı tırtıklıdır, bitki tabanı sıklıkla saplıdır. Kapitula tek olabilir veya bazen birkaç tanedir, heterogam, radiat veya plak ya da disk şeklindedir, bazen homogam ve disk şeklindedir. Involukrum yarı küre şeklinde veya çan biçimindedir; brakteler çoklu seri halinde, kiremitsi, otsu veya zarımsıdır. Çiçek tablası çıplaktır, düz veya biraz konvektir. Dişi çiçekler nadiren tamamı eksik vaziyettedir, az veya çok sayıda 1-2 seri içinde, tüp şeklinde, meyilli ve tepede 3 dişli haldedir veya bariz şekilde dile benzer yapıdadır, sarı veya turuncudur. Disk çiçekleri tüp şeklindedir, tepede 5 lopludur, sarıdır. Akenler tepede sütun şeklinde veya dar, açısız veya damarlı, pappus tüyler kısa sert tüylerden dolayı pürüzlüdür, kısa sakalsı tüyü veya kuş tüyü gibi yumuşak ince uzun sık tüylüdür, bağımsız veya tabanda birleşik haldedir, daimî

kalıcıdır (Davis, 1975). Asteraceae familyasının önemli üyeleri olan *Inula* cinsi, kuzey yarımkürede geniş çapta dağılmıştır (Blanc, vd., 2004).

Inula cinsine ait olan bitki yapılan taksonomik bir revizyon çalışması ile *Dittrichia* cinsine dahil edilmiştir. *Dittrichia* cinsi GREUTER tarafından 1973 yılında tanımlanmıştır. *Inula* cinsi ile oldukça yakındır ve büyük benzerlikler göstermektedir ancak aken (meyve) yapısı ve papus kılları gibi bazı noktalarda farklılıklar göstermektedirler. Fakat çalışmamızda bitkiden *Inula* olarak bahsedileceği daha önce de belirtilmiştir.

Tübitak taksonomik tür veritabanından edinilen bilgilere göre Türkiye’de yetişmekte olan 27 tür bulunur. Bunlardan 7 tanesi endemiktir. Çalışmamızın konusunu oluşturan *Inula graveolens* endemik değildir. Aşağıdaki tablo 2.3.’te Türkiye’de doğal olarak yetişen *Inula* türleri ve Türkçe isimleri bir arada verilmiştir.

Tablo 2.3 Türkiye’de yetişen *Inula* türlerine bazı örnekler

<i>Inula acaulis</i> Schott et Kotschy ex Boiss. (bodur andızotu)	<i>Inula acaulis</i> var <i>acaulis</i> <i>Inula acaulis</i> var <i>caulescens</i>
<i>Inula anatolica</i> Boiss.* (kaya andızı)	
<i>Inula aschersoniana</i> Janka (kaya yolotu)	
<i>Inula aucherana</i> DC. (çorak andızotu)	
<i>Inula britannica</i> L. (çayır andızı)	
<i>Inula conyzae</i> (Griess.) Meikle (gölge andızotu)	
<i>Inula crithmoides</i> L. (keşir çorağı)	
<i>Inula discoidea</i> Boiss.* (dilsiz andızotu)	
<i>Inula ensifolia</i> L. (kılıç andızotu)	
<i>Inula fragilis</i> Boiss. & Hausskn.* (gevrek andızotu)	
<i>Inula germanica</i> L. (ekin andızotu)	
<i>Inula graveolens</i> (Linnaeus) Desf. (deli sarıot)	
<i>Inula helenium</i> L (andızotu)	<i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>orgyalis</i> (Boiss.) Grierson <i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>pseudohelenium</i> <i>Inula helenium</i> L. subsp.

	<i>turcoracemosa</i>
	<i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>vanensis</i> Grierson*
<i>Inula heterolepis</i> Boiss. (ak andızotu)	
<i>Inula inuloides</i> (Fenzl) Grierson (yitik andızotu)	
<i>Inula macrocephala</i> Boiss. & Kotschy ex Boiss.* (muş andızotu)	
<i>Inula mariae</i> Bordz. (yayla andızoyu)	
<i>Inula montbretiana</i> DC. (kökçayı)	
<i>Inula oculus-christi</i> L. (yolotu)	
<i>Inula orientalis</i> Lam. (şark andızotu)	
<i>Inula peacockiana</i> (Aitch. & Hemsl.) Krovin (uzun andızotu)	
<i>Inula sarana</i> Boiss.* (yar andızotu)	
<i>Inula salicina</i> L. (su andızotu)	
<i>Inula sechmenii</i> Hartvig & Strid* (bey andızotu)	
<i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel (kanatlı andızotu)	<i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel subsp. <i>Australis</i>
	<i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel subsp. <i>thapsoides</i>
<i>Inula viscidula</i> Boiss. & Kotschy (püs andızotu)	
<i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton (sümenit)	

* Endemik türleri ifade etmektedir (Gökbulut, 2011); ([http-2](http://2)).

2.3.1.1. *Inula graveolens* (L.) Desf.

2.3.1.1.1. *Türün botanik özellikleri*

Çok dallı, ağır kokulu, tek yıllık, 1 metreye kadar büyüeyebilen, küçük salgı tüyleri ve piloz tüylerle kaplıdır. Yapraklar şeritsi tepede sivri tabanda daralmış şekildedir, yaprağın kenarları bütünüyle veya bir kısmı tırtıklıdır. Kapıtula kısa radyat ve kapıtula rasem içinde serbestçe yayılır. İnvolukrum 50-75 cm genişliğindedir; involukral brakte şeritsi-mızraksı, kiremitsi, 3 sıralı; dıştaki otsu yapı 0,75 mm, içteki membran 6-7 mm'dir. Kapitulunun kenarında yer alan dilsî çiçekler 6-8 mm, ligula 2-2,5 mmdir ve hemen hemen involukreyi aşar. Kapitulunun ortasındaki tüpsü çiçekler 4-5 mmdir ve

bazen kururken kırmızıya döner. Aken 2mm ince kısa saplı sık salgı tüylüdür. Papus kahverengiye benzer renkte kısa sert tüylerden dolayı pürüzlü 4-5 mm dir.

Bitkinin sinonimleri; *I. graveolens* (L.) Desf, *Erigeron graveolens* L., *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter, *Cupularia graveolens* (L.) Godr. & Gren'dir. Tür literatürde sıklıkla *Inula graveolens* (L.) Desf. olarak ifade edilir.

2.3.1.1.2. Türün sistematikteki yeri

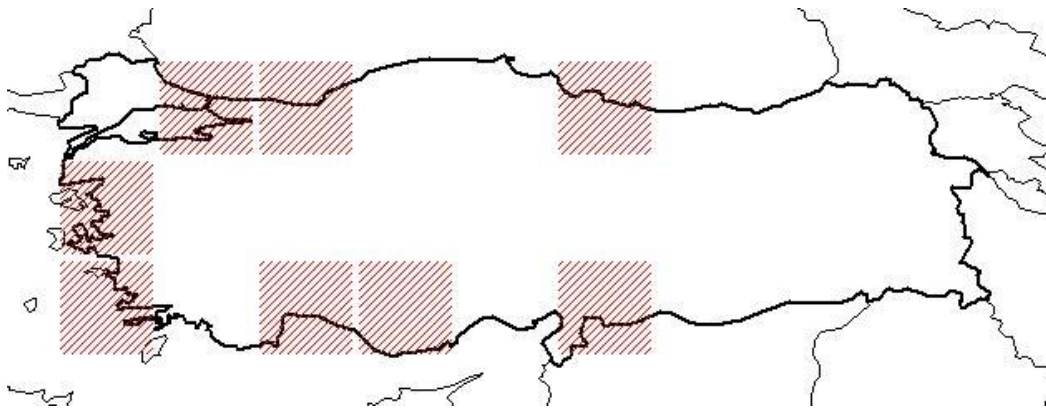
Bitkiye ait sistematik tablosu aşağıda Tablo 2.4.'te verildiği gibidir.

Tablo 2.4. Bitkinin sistematikteki yeri (Al-Snafi, 2018)

Alem	Bitki
Alt-alem	Tracheobionta
Süperdivizyon	Spermatophyta
Divizyon	Magnoliaphyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Asteridae
Takım	Asterales
Aile	Asteraceae / Compositae
Cins	<i>Dittrichia</i> / <i>Inula</i>
Tür	<i>Inula graveolens</i> veya <i>Dittrichia graveolens</i>

2.3.1.1.3. Türün Türkiye dağılımı

Bitkinin Türkiye'deki dağılımı aşağıdaki harita üzerinde gösterildiği gibidir.



Görsel 2.1. *Inula graveolens* (L.) Desf. bitkisinin Türkiye'de dağılımı (http-4)

2.3.1.1.4. *Inula graveolens* (L.) Desf. yaygın isimleri

Arapçada; Inula, Shuwaser, Suawaid, Rasan, Teion

İngilizcede; Camphor Inula, Cape khakiweed, Stinkingfleabane, Stinkweed, Stinkwort,

Almancada; Drüsiger alant, Klebriger alant

Iran dilinde; Atre pazii

İsveç dilinde; Kamferınula (Al-Snafi, 2018) olarak anılmaktadır.

2.3.1.1.5. *Bitkiye ait genel bilgiler*

Bitki popüler ismini güçlü ve karakteristik bir kokuya sahip uçucu bir yağın varlığına borçludur. Bu, bitkinin tüm kısımlarında bulunan küçük salgı kılları tarafından salgılanır. Toz ve diğer parçacıklar, yaprakların yapışkan yüzeylerine kolayca yapışır (Meadly, 1965). İlk olarak Akdeniz yöresinde bulunmuş ve benzer iklimdeki dünyanın çeşitli yerlerine buradan yayılmıştır (http-3). Afrika’da dağılım gösterdiği ülkeler; Mısır, Cezayir, Libya, Fas, Tunus, Asya’da dağılım gösterdiği ülkeler; Irak, İran, Filistin, Ürdün, Lübnan, Suriye, Türkiye, Pakistan, Avrupa’da dağılım gösterdiği ülkeler; Arnavutluk, Bosna, Bulgaristan, Hırvatistan, Yunanistan, İtalya, Makedonya, Karadağ, Sırbistan, Fransa, Portekiz, İspanya, Avusturya, Belçika, Çek Cumhuriyeti, Almanya, Hollanda, İsviçre, İngiltere, Slovenya şeklindedir. Ayrıca Avusturalya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika’da bitkiye rastlamak mümkündür (Al-Snafi, 2018).

Akarsu kenarlarında kumlu ve çakıllı topraklarda yetişir. *Inula graveolens* (L.) Desf. Türkiye’de “iri pire otu” olarak bilinir (Silinsin, 2016). Tercih edilen toprak tipleri arasında kumlu ve diğer hafif dokulu topraklar bulunur. Ağır metallerle kontamine olmuş mayın yağmuru üzerinde büyüyebilir ve biyolojik olarak civa, çinko ve nikel biriktirebilir. İklimsel olarak bitki, çoğunlukla kışın düşen ve yıllık 300-800 mm yağış alan ılıman bir Akdeniz tipi iklime adapte olmuştur (http-5).

Hayvanlar için lezzetli değildir ve besin olarak tercih edilmez. Çiftlik hayvanları için zehirli olabilir ve insanlarda da alerjik kontakt dermatite yol açabilir. Pek çok bitkiye göre de farklı bir hayat döngüsüne sahiptir çünkü bahar veya yaz aylarında çiçeklenen pek çok tek yıllık bitkinin aksine eylülünden aralığa dek çiçek ve tohum taşır (http-3).

Fitokimyasal çalışmalar *Inula graveolens*'in polifenol, tanen, flavonoit, yağ, steroidal triterpenoitler, seskiterpen ve antrakinon içerdiğini göstermiştir. Araştırmacılar *Inula graveolens* antimikrobiyal, insektisidal, anti-platelet agregasyonu, antiproliferatif, antidiyare, antipiretik, analjezik, antiinflamatuvar ve antikolinerjik etkinlik gösterdiğini bildirmiştir (Al-Snafi, 2018).

Inula graveolens aromaterapide yaygın olarak astım tedavisinde bronkospazmolitik ve mukolitik olarak kullanılır. Ayrıca Irak'ta yaygın olarak romatizmal ateşin tedavisinde, infant konvülsiyonlarında, diş ağrısında, kan şekerini düşürmede, kan pıhtısının tedavisinde ve sindirim sorunlarında kullanılmaktadır. İran geleneksel tıbbında inflamasyonlara karşı, romatizmaya karşı, tümöre karşı, patojen ve enfeksiyonlara karşı özellikle leishmaniosis tedavisinde kullanılır. Bitki ayrıca üriner sistem enfeksiyonları, hemoroid, soğuk algınlığı ve yara iyileşme sürecinde kullanılır. Uçucu yağı düşük konsantrasyonda inhale edildiğinde mukolitik, sinüzitte ve solunum sistemine bağlı inflamasyonlarda, dekonjestan, mukusun azaltılmasında ve astıma bağlı diğer durumlarda kullanılır. Topikal olarak okaliptüs, lavanta, biberiye ile karıştırılarak aşırı aktif yağ bezlerinin neden olduğu aknenin önlenmesinde kullanılır, tıkanmış gözeneklerdeki sebümü çözer. Uçucu yağ ayrıca lenf dolaşımını ve immün sistemi destekler, akneye bağlı deri inflamasyonunu azaltır (Al-Snafi, 2018). Toprak üstü kısımları (yaprak, sap vb) tavuklarda bitleri tedavi etmek için kullanılır (http-6).

2.3.1.1.6. *Inula graveolens* (L.) Desf. üzerine yapılan çalışmalar

Yapılan çalışmaları bitkinin kimyasal kompozisyonu ve farmakolojik aktivitesine göre 2 grupta toplamak mümkündür.

***Inula graveolens* kimyasal kompozisyonu üzerine yapılan çalışmalar**

Yapılan bir çalışmada Yunanistan'dan toplanan *Inula graveolens* toprak üstü kısımları gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiş ve ana bileşenler epi- α -kadinol (%30,2) ve bornil asetat (%25,4) olarak bulunmuştur (Petropoulou, Tzakou ve Verykokidou, 2004).

Yapılan başka bir çalışmada Cezayir'den toplanan bitkinin taze toprak üstü kısımlarından cleveger apareyinde hidrodistilasyon yoluyla elde edilen uçucu yağ analiz edilmiştir ve 30 bileşik izole edilmiş, ana bileşenler izobornilasetat (%50,8), borneol (%18,3) ve τ -kadinol (%6,2) olarak belirlenmiştir (Boudouda, vd., 2013).

Yapılan başka bir çalışmada Lübnan'dan toplanan iki farklı yabani popülasyona ait *Inula graveolens* gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Analiz

edilen toplam kompozisyonun %90 kadarını oksijenli bileşenler oluşturmaktadır. Dört ana bileşen olarak bornil asetat (%70,6–72,3), t-kadinol (%1,4–13,4), borneol (%2,7–12,4) ve karyofillen oksit (%1,9–2,3) ve beraberinde 21 bileşik izole edilmiştir. İki farklı popülasyondan elde edilen yağlar, yüksek bir bornil asetat içeriğine sahiptir, ancak borneol ve t-kadinol açısından farklılık göstermiştir. Çalışma sonucu göstermiştir ki Lübnan menşeli *Inula graveolens* uçucu yağları oksijenli bileşikler açısından oldukça zengindir (Ghosn, vd., 2006).

Farklı bir çalışmada uçucu yağ gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ile belirlenmiş ve 50 bileşenden %91 kadarı isimlendirilmiştir. Ana bileşenler olarak borneol (%60,7 oranında), β -karyofillen (%8,3 oranında) ve bornil asetat (%6,8 oranında) belirlenmiştir (Mirza ve Ahmadi, 2000).

***Inula graveolens* farmakolojik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar**

Yapılan bir çalışmada *Inula graveolens* toprak üstü kısımlarının uçucu yağı, yağın Sabouraud's dekstroza agar içinde seri olarak dilüe edilmesiyle in vitro olarak *Candida albicans* izolatlarına karşı çalışılmış ve 10 *Candida albicans* izolatı için uçucu yağın minimum inhibitör konsantrasyon değeri 30,675 mg/ml olarak bulunmuştur (Aghel, Mahmoudabadi ve Darvishi, 2011).

Başka bir çalışmada *Inula graveolens* uçucu yağının antibakteriyel etkileri dokuz farklı mikroorganizmaya karşı incelenmiştir. Bunlar; Gram-pozitif bakteriler de dahil olmak üzere ATCC tipi mikrobiyal türler (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*), Gram negatif bakteriler (*E. coli*, *P. aeruginosa*), maya (*C. albicans*, *C. glabrata*) ve mantarlar (*A. niger*, *A. parasiticus*) şeklindedir. Tüm test edilen tüm mikroorganizmalara karşı minimum inhibitör konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon değerleri sırasıyla 0,25–4 ve 1-8 mg/ml aralığındadır. *E. faecalis* ve *C. glabrata*, en düşük minimum inhibitör konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon değerlerine sahip en duyarlı mikroorganizmalarken 0,5 ve 1 mg/ml, en az duyarlı mikroorganizmalar *S. aureus* ve *E. coli* olarak bulunmuştur. (4 ve 8 mg/ml). Antioksidan etkiye bakıldığında ise *Inula graveolens* yağ aktivitesinin incelenmesinde, 10 μ l yağ, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal konsantrasyonunu 1mM troloks'inkinden daha yüksek bir etkinlikle 70 dakika gibi bir sürede azaltmıştır. *Inula graveolens*'e ait yağ DPPH radikalini %32,3'e düşürmüştür (Mahmoubi, 2011).

Yapılan bir çalışmada *Inula graveolens* uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesi, hücresel düzeyde etki incelenerek *Staphylococcus*'a (ATCC 6538P) karşı MIK ve MBK

değerleri değerlendirilmiştir. Zaman ve tedavi dozunun hücre canlılığı üzerindeki etkileri, zaman öldürücü ve bakteriyoliz analizleri ile belirlenmiştir. Transmisyon elektron mikroskobu ile belirgin yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Uçucu yağlar için bakterisit bir inhibisyon modu oluşturulmuş, *S. aureus*' un hücre canlılığını hızla azaltmıştır (5 mg/ml). Hücre çeperinin kalınlaşması ve sitoplazmik içeriklerin toplanması, uçucu yağların MIK ile muamele edilmiş *S. aureus* hücrelerinde gözlenmiştir. Sonuçlar, sitoplazmik membranın ve hücre duvarının, *Inula graveolens* uçucu yağlarının toksik etkisinde kaldığını göstermektedir. Bununla birlikte, sıcak ve soğuk suyla ekstraksiyon ve sonra liyofilizasyon ile elde edilen *Inula graveolens* ekstrelerinin *S. aureus* ve *S. faecium* hücrelerine karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir. (Guinoiseau, vd., 2010).

Uçucu yağlar ile antibiyotiklerin beraber kullanılması bakteriyel direncin üstesinden gelmek için yeni denenmeye başlayan bir metoddur. Yapılan bir başka çalışmada antibakteriyel etkisi bulunan uçucu yağların geleneksel antibiyotikler ile kombinlenmesinin sinerjistik ve aditif etkisi olabileceği gözlenmiştir. Çalışma için çok yüksek antibakteriyel etkinliği olmayan *Inula graveolens* (L.) Greuter seçilmiştir. Yağın içeriğinde en fazla bornil asetat ve borneol bulunmaktadır. Uçucu yağ broth mikrodilüsyon yöntemi ile MIK ve MBK değerlerini tayin etmek için on üç bakteri modeline karşı değerlendirilmiştir. Gram pozitif olanların Gram negatiflere göre daha hassas olduğu gösterilmiştir. Referans antibiyotik olarak tetrasiklin, streptomisin ve kloramfenikol kullanılmıştır. En iyi antibakteriyel aktivite uçucu yağın kloramfenikol ile beraber kullanılmasıyla elde edilmiştir. Kombinasyonda sinerjistik etki yüzde 60 olarak kaydedilmiştir. En yüksek aditif etki yüzdesi 44,4 ile tetrasiklin kombinasyonunda görülmüştür. En yüksek antagonistik etki yüzde 55,6 ile streptomisin kombinasyonunda görülmüştür. Kombinasyonların en fazla *P. mirabilis* ATCC 12453'e karşı etkili olduğu görülmüştür (Miladinovic, vd., 2016).

Bir başka çalışmada *Inula graveolens*in toprak üstü kısımlarının metanollü ve asetonlu ekstresi *Shigella dysenteriae* [PTCC1188], *Pseudomonas aeruginosa* [PTCC1430], *Escherichia coli* [PTCC1399], *Staphylococcus aureus* [PTCC1431], *Bacillus cereus* [PTCC1015], *Salmonella typhimurium* [ATCC1596], *Staphylococcus epidermidis* [PTCC1114], *Enterococcus faecalis* [PTCC1393], *Klebsiella pneumoniae* [PTCC1291] bakterilerine karşı değerlendirilmiştir. Metanolik ekstrenin *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine karşı daha

etkili olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada antioksidan aktiviteye de bakılmış, *Inula graveolens*'in toprak üstü kısımlarının metanolik ve asetonlu ekstresinin aktivitesi DPPH radikali kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Metanolik ekstre özellikle asetonlu ekstreye göre daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. (Mazandarani, Ghafourian ve Khormali, 2014).

Bir başka çalışmada *Inula graveolens* ve *Inula viscosa* yaprakları beraber kullanılmış olup kloroform petrol eteri ve etanol ile ekstre edilmişlerdir. Fitokimyasal incelemeye bakılarak her iki türde de flavonoit, tanen, steroidal triterpen varlığından bahsedilebilir. *Inula graveolens*'e ait petrol eteri, kloroform ve etanol özütlerinin antimikrobiyal etkileri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherishia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*'a karşı (dimetil sülfoksit içerisinde 20, 40 ve 80 µl %5 konsantrasyonda) araştırılmıştır. Ekstreler *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı konsantrasyona bağlı antimikrobiyal etkiler göstermiştir. En etkili ekstre petrol eteri ekstresi olarak kaydedilmiş ancak tüm ekstreler yüksek konsantrasyonlarda (dimetil sülfoksitde %5 konsantrasyonun %40'ı) *Escherishia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkiler göstermiştir. (Al-Snafi, 2018).

Yapılan farklı bir çalışmada *Inula graveolens* yağının insektisidal aktivitesi araştırılmıştır. Kullanılan yağdaki ana bileşenler ve oranları; bornil asetat (%63,9), borneol (%25,6), ve kafur (%3,6) şeklindedir. Ölü sinek yoğunluğu uçucu yağa maruziyetten 15, 30, 60, 90, 120 dakikalar sonra sayılmıştır. Yetişkin *Mayetiola destructor* sineği üzerinde %0, 10, 16,66 ve 33,33 ve 50 oranlarında öldürücü etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Lamili, vd., 2001).

Bir başka çalışmada *Inula graveolens* yapraklarının metanollü ekstresinin antioksidan aktivitesi DPPH radikali kullanılarak değerlendirilmiştir. Ekstrenin IC50 (%50 inhibisyon sağlayan antioksidan konsantrasyon) değeri 86,67 ± 1,59 mg/l olarak bulunmuştur (Boudkhili, vd., 2011).

Asfhar, vd. (2015)'in yapmış oldukları bir çalışmada total fenolik, flavonoit ve flavonol içerik ve antioksidan aktivite *Inula graveolens* için değerlendirilmiştir. *Inula graveolens*'e ait farklı organlarda total fenol ve flavanoit miktarları farklıdır, yaprak ve çiçeklerde köklere göre belirgin derecede oranları fazladır. Flavonol miktarı ise çiçek yaprak ve köklerde belirgin derecede farklı değildir, en düşük köklerde gözlenmiştir.

Bitkinin farklı organlarının özütlerinde antioksidan aktivite ile fenolik bileşikler arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur.

Yapılan bir başka çalışmada *Inula graveolens* metanolik ekstresi doza bağlı bir şekilde trombosit agregasyon inhibitörü özelliği göstermiştir. Maksimum inhibisyon heparin ile kıyaslandığında 400 µg/ml dozunda gözlenmiştir. Aynı çalışmada *Inula graveolens* metanolik ekstresinin ishal önleyici etkisi sıçanlarda incelenmiştir. 200 mg doz ve 400 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde, dışkılama oranını azaltarak ve aktif kömürün normal saline grubu ile kıyaslandığında bağırsaktan geçiş süresini azaltarak, ekstre önemli derecede diyare önleyici etki göstermiştir. Etki doza bağımlıdır ve loperamide benzer şekildedir (15 mg/kg). Yine aynı çalışma içerisinde *Inula graveolens* metanolik ekstresinin antipiretik aktivitesi sıçanlarda incelenmiştir. Metanolik ekstre (400 mg/kg) sıçanlarda maya kaynaklı vücut sıcaklığı yükselmesinde belirgin derecede doza bağımlı antipiretik aktivite göstermiştir. *Inula graveolens* metanolik ekstresinin antiinflamatuvar ve antinosiseptif aktivitesi farelerde incelenmiştir. Metanolik 400 mg/kg dozda diklofenak sodyum (50 mg/kg) ile kıyaslandığında ekstre belirgin derecede antiinflamatuvar ve antinosiseptif etki göstermiştir. Ekstre doza bağımlı şekilde pati ve kulaktaki ödemi yok etmiştir. Doza bağımlı analjezik etki kimyasal (writhing test) ve termal (hot-plate test) uyarılarına karşı elde edilmiştir. Ekstre kanın ısı ile indüklenmiş trombosit agregasyonuna karşı da değerlendirilmiştir (Al-Fartosy, 2013).

Bitkilerin antiproliferatif etkisi üzerine yapılan bir çalışmada *Inula graveolens* bitkisinden elde edilen ekstre MCF-7 hücre hattına karşı güçlü antiproliferatif (IC₅₀ 3,83 mg/ml) ve sitotoksik aktivite (IC₅₀ değeri 5,83 mg/ml) gösterirken, 50 mg/ml'de A549 ve HL60 hücrelerine karşı aktivite göstermemiştir (Abu-Dahab ve Afifi, 2007).

Bazı *Inula* türlerinin antifungal antibakteriyel antiviral sitotoksik aktiviteler ve oksidatif stres ve genotoksisiteye karşı koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada *Inula viscosa*, *Inula graveolens* ve *Inula crithmoides* (Asteraceae) bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve metanollü ekstrelerde *Fusarium oxysporum*'un üç fitopatojenik izolatu, FOM (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*), FOL (*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*), FOT (*F. oxysporum* f. sp. *tuberosi*) ve *Trichoderma* türlerine karşı (*Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride*) antifungal aktivite değerlendirilmiştir. *Inula graveolens* solventin türüne bağlı olarak (en fazla metanollü ekstrede en az kloroformlu ekstrede olmak üzere) çiçekten elde edilen ekstrenin aktivitesi kök ve yapraktan elde edilen ekstrede daha aktif olacak şekilde antifungal

aktivite göstermiştir. Organik bileşikler biyofungisit olarak fitopatojenik mantarlar üzerinde kullanılabilir. Yine de bu tür ekstraların etkinliği mantarın gösterdiği dirence de bağlıdır. Daha fazla çalışma yapılarak bitki ekstresinin etkinliği gözlemlenebilir (Omezzine, vd., 2011).

Bitki üzerinde yapılan farklı bir fitokimyasal araştırmada biyolojik aktif ikincil metabolitlerin izolasyonu yapılmıştır. Bunlar ödesmanolitler, guaianolitler, psödoguaianolitler, ksantanolitler, dimerik seskiterpenler, flavonoidlerdir. *Inula graveolens* uçucu yağı antimikrobiyal, antikandida, asetilkolinesteraz inhibitör aktivitelere sahiptir. Yağ buhar distilasyonu ile elde edilmiş ve gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Bitkiden elde edilen yağın ana bileşeni olan bornil asetat HeLa (insan serviks karsinomu), HT 29 (insan kolon karsinomu), A549 (insan akciğer karsinomu) normal hücreleri üzerinde çalışılmıştır. Sitotoksiste, LDH (laktat dehidrojenaz) sitotoksiste tespit kiti ile gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ ve bornil asetat hücreler üzerinde belirgin derecede etki göstermiştir. HeLa hücre dizisinde bornil asetat ve uçucu yağ standart olarak kullanılan sisplatine göre daha iyi aktivite göstermiştir. HT-29 hücrelerinde de aynı etki gözlenmiş, uçucu yağ ve bornil asetat, A549 hücre hatlarında en büyük tümör özgüllüğünü göstermiştir. Uçucu yağ, MCF-7 (insan göğüs adenokarsinomu) kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli bir inhibisyon etkisine sahiptir. Esansiyel yağ, standart sisplatin ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda üstün inhibisyon etkisi göstermiştir. Bornil asetat ayrıca sisplatinden daha iyi aktivite göstermiştir. Bu çalışmada tüm tümör hücrelerinde doza bağlı bir düşüşün, uçucu yağ ve bornil asetat ile indüklendiği gösterilmiştir. Sonuç olarak *Inula graveolens* uçucu yağı potansiyel bir anti-kanser ajan olabilir denilmiştir (Karan, vd., 2018).

Yapılan farklı bir çalışmada flavonoidler ve fenolik bileşiklerin yaygın olarak bitkilerde dağınık halde bulunmasına ayrıca antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik vb etkileri bulunmasına değinilmiştir. *Inula graveolens*'ten elde edilen metanolik ekstrenin antioksidan aktivitesi β -karoten bleaching (ağartma) metodu ile tespit edilmiştir. *Inula graveolens* metanolik ekstresinin antioksidan aktivitesinin hem fenolik hem de flavonoid bileşiklerin daha yüksek içeriğine bağlanabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma *Inula graveolens*'in antioksidan aktiviteye sahip olduğunu öne sürmektedir (Al-Fartasy, 2011).

Alınan pek çok tedbire rağmen gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın kanser türlerinden birisi olan göğüs kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada *Inula*

graveolens (L.) Desf. ve *I. viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) antiproliferatif aktivitelerine bakılması amacı ile MCF7 ve T47D göğüs kanser hücrelerine karşı incelenmiştir. Sisplatin ve doksorubisin ile kıyaslandığında *Inula viscosa*'nın inaktif olmasına karşın *Inula graveolens* etanollü ekstrelerinin kanserli hücrelere karşı büyük ölçüde aktif olduğu gözlenmiştir. *Inula graveolens* etanolik ekstresinin antiproliferatif aktivitesi MCF7 ve T47D hücre zincirleri üzerinden incelenmiş ve ekstrinsik proapoptoz yolu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kasabri, vd., 2017).

Yapılan başka çalışmada araştırmacıların iki farklı zamanda bitki üzerinde çalıştığı görülmüştür. 1992 yılında yapılan ilk çalışmada 3 α -hidroksi-ödesm-4-en-12,6 β -olit isimli yeni seskiterpen laktonu keşfedilmiştir. Beraberinde çok sayıda bilinen seskiterpen asidi, flavonoit ve aromatik bileşik keşfedilmiştir. 1993 yılında yapılan çalışmada ise bitkinin toprak üstü kısmında yeni bir ödesmanolit "11,13 dihidroivalin" izolasyonu sağlanmıştır. Bununla beraber bilinen 4 seskiterpen laktonu, ivalin, inuviscolit, 8-epiinuviscolit, 8-epiksantin-1 β -epoksit de izole edilmiş, elde edilen isolatlar P-388 (murin lenfositik lösemi), KB-3 (nazofaringeal karsinoma) ve KB-V1 (vinblastin dirençli) hücrelerine karşı sitotoksik aktivite bakımından değerlendirilmiştir. İvalin kayda değer bir aktivite göstermiştir. İvalinden hazırlanan ivalin asetatın neredeyse eşit derecede aktif olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile beraber keşfedilen 11,13-dihidroivalin ve inuviscolit ise inaktif bulunmuştur. Ayrıca çalışmadan elde edilen isolatlar *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Escherichia coli* (ATCC8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 1539), *Enterococcus* (clinical isolate), *Streptococcus* (klinik izolat) ve *Candida albicans* (ATCC 10231) suşlarına karşı da değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda karabron, inuviscolit ve 7-O-metilaromadendrin isolatlarının *S. epidermidis* üzerinde zayıf etkiye sahip olduğu görülmüştür (Topçu, vd., 1993).

Yapılan bir başka çalışmada *Inula graveolens* bitkisinin AChE (asetilkolinesteraz) aktivitesi araştırılmıştır. Uçucu yağ eldesi buhar distilasyonu ile sağlanmıştır. *I. graveolens* (Asteraceae) yağında dokuz bileşen tanımlanmıştır ve ana bileşenler bornil asetat (%54), borneol (%20) ve kamfen (%4,9) gibi bisiklik monotерpenlerdir. Uçucu yağların ve bileşenlerinin mikrotplate assay methodu ile AChE inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. *Inula graveolens* yağının inhibe edici aktivitesi, *Artemisia dracunculus* (lot7) yağının beşte biri ve IC50 değeri 0,27 mg/mL olarak bulunmuştur.

Böylece ilk defa bitkinin AChE inhibitör aktivitesine ulaşılmıştır (Dohi, Teresaki ve Makino, 2009).

Yapılan başka bir çalışmada *Inula graveolens*, *Laurus nobilis*, *Pistacia lentiscus* ve *Satureja montana* türlerinin uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi analizi ile belirlenmiştir. *Inula graveolens*'ten elde edilen uçucu yağın ana bileşeni bornil asetat olarak belirlenmiştir. *Campylobacter jejuni* CECT 7572 üzerinde standart agar-disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite gözlenmiş ve MİK değerlerinin değerlendirilmesine bakılarak en aktif uçucu yağın *Inula graveolens*'ten elde edilen uçucu yağ olduğu görülmüştür (Dienane, vd., 2012).

Yapılan bir başka çalışmada bitkinin fitotoksik aktivitesi yani farklı bitkilerin büyümesi üzerindeki inhibe edici etkisi üzerinde durulmuştur. THA (2,3,11β, 13-tetrahidroaromatikin) ve ilişik asidin izolasyonu sonucu bu iki bileşen kaynaklı selektif ve belirgin fitotoksik aktivite gözlenmiştir (Abu Irmaileh, vd., 2015).

Bitkinin fenolik profili ve antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada bitkinin yapraklarından elde edilen etanollü ve sulu ekstresi kullanılmıştır. DPPH radikali ile antioksidan kapasitesine bakılmış, SK-KS/KS (sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi/kütle spektroskopisi) analizleri ile de ekstrenin fenolik kompozisyonu tayin edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında ana fenolik bileşenler olarak klorojenik asit, kinik asit, hiperozit, protokateşik asit ve kersetin ana fenolik bileşikler olarak bulunmuştur. Bitkinin antioksidan aktivitesinin fenolik bileşiklere bağlanabileceği belirtilmiştir (Silinsin ve Bursal, 2018).

Çeşitli *Inula* türleri üzerine yapılan bir çalışmada *Inula graveolens* metanolik ekstresinin antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Çalışmadan elde edilen verilerde %96 oranında demir iyonu bağlama ve sırasıyla %93,43 ve %91,38 oranlarında süperoksit anyonu ve hidroksil radikali bağlama yeteneği olduğu gözlenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre metanolik ekstrenin oksidatif stresle ilişkili hastalıklar üzerinde etkili olabileceğini söylemek mümkündür (Kaur ve Chalal, 2014).

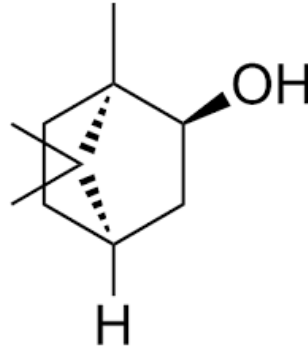
2.3.1.1.7. Bornil asetat ve borneol

Uçucu yağın ana bileşenleri bornil asetat ve borneolden aşağıda kısaca bahsedilmiştir. Bitkinin uçucu yağının yüksek oranlarda aşağıdaki bileşikler içerdiği, bileşikler üzerinde daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alındığında yeni

çalışmaların kapısını aralayabilir ve bitki uçucu yağının çeşitli etkilerinin ortaya konulmasını sağlayabilir.

Borneol

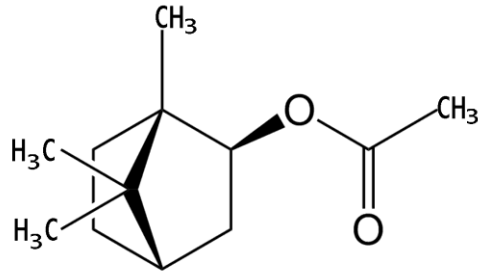
Bisiklik monoterpen bir bileşik olan borneol pek çok bitkinin uçucu yağında bulunabilen bir bileşiktir. Japon ve Çin geleneksel tıbbında analjezik ve anestezi olarak kullanılmıştır (Granger, Campbell ve Johnston, 2005). Sinonimleri: bisiklo (2.2.1) heptan-2-ol; 1,7,7-trimetil-endo, borneokafur, dl-borneol, bornil alkol, 1,7,7-trimetilbisiklo (2.2.1) heptan-2-ol şeklindedir. Formülü $C_{10}H_{18}O$ 'dur. FDA (Food and Drug Administration) tarafından çeşni olarak onaylanmıştır (Bhatia, Letizia ve Api, 2008). Farmakolojik olarak çoğunlukla sentetik borneol kullanılır (Yan-Yu, Qi-Neng ve Zhi-Peng, 2007). Uçucu yağlardan elde edilen renksiz, kristalimsi bu monoterpen bileşen antibakteriyel, antifungal, antispazmotik ve sakinleştirici etkilere sahiptir (Tabanca, vd., 2001).



Şekil 2.1. Borneol molekül şekli (<http-7>)

Bornil asetat

$C_{12}H_{20}O_2$ kapalı formülüne sahiptir. Endo-1,7,7-Trimetilbisiklo (2.2.1) hept-2-ol asetat diğer ismiyle bilinen bileşiktir. Renksiz kristaller veya renksiz sıvı halindedir. Suda az çözünürken %96 lık etanolde kolaylıkla çözünür (European Pharmacopoeia 2015). Bornil asetatın antioksidan aktivitesi (Kim, vd., 2013), antiinflamatuvar aktivitesi (Yang, vd., 2014), analjezik etkisi (Wu, vd., 2005) olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bornil asetat molekül şekli (<http-8>)

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Bitkisel Materyal

Inula graveolens 2017 Temmuz 2017 Eylül ve 2018 Eylül olmak üzere 3 farklı zamanda toplanmıştır. Örnekler Bursa İnegöl ilçesinde yol kenarlarından alınmıştır, nemsiz ve karanlık yerde kurutulup muhafaza edilmiştir. Kimyasal ve biyolojik aktivite deneyleri için toprak üstü kısımlar (herba) kullanılmıştır.



Görsel 3.1. *Inula graveolens* (L.) Desf. çiçeksiz



Görsel 3.2 *Inula graveolens* (L.) Desf. çiçekli



Görsel 3.3. *Inula graveolens* (L.) Desf. 'e ait çeşitli kesitler (<http> 9)

3.2. Yabancı Madde Miktar Tayini

Bitkiye ait kuru drogdan 50 g tartılmış, düz bir zemin üzerine serilmiştir. Yabancı madde olup olmadığı incelenmiştir. Droгда bulunan yabancı maddeler uzaklaştırılıp tartılmış ve yüzdesi hesaplanmıştır. (İncelemede 2018 Eylül ayında toplanan çiçekli materyal kullanılmıştır.)



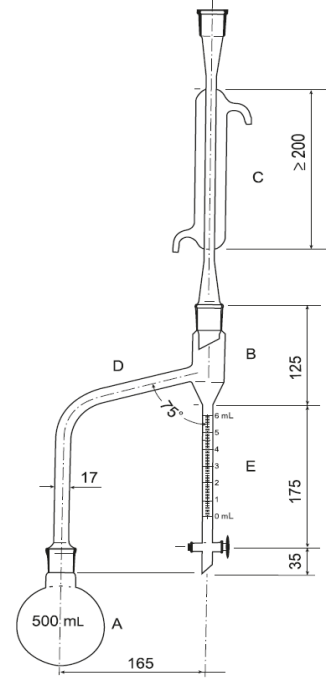
Görsel 3.4. *Inula graveolens* (L.) Desf. 'e ait kuru drog

3.3. Su Miktar Tayini

250 ml hacminde 2 ayrı balona 200 ml tolüen R ve üzerine 2 ml distile su eklenmiştir. Su distilasyon apareyi yerleştirilerek işleme başlanmıştır. İşlem dereceli kısımda su miktarı değişiklik göstermeyene kadar yaklaşık 15-20 dk sürmüş ve süre sonunda sistem soğutulmuştur. Apareyde tolüen tarafından absorblanmayan su miktarı kaydedilmiştir (a). Devamında su miktar tayini için ayrılan drogdan 10 gram örnek tartılıp aynı balona yüklenerek işleme başlanmıştır. Su miktarının gözlemlendiği dereceli kısımda değişiklik olmadığı süre sonunda sistem soğumaya bırakılmıştır. Ardından toplanan su miktarı okunmuştur (b). Okunan değerden ilk elde edilen değer çıkarılmıştır. Bulunan sonuca göre 100 gram droğun taşımış olduğu su miktarı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. (İncelemede 2018 Eylül ayında toplanan çiçekli materyal kullanılmıştır).

$$\% \text{ Su Miktarı} = [(b-a) / 10] \times 100 \quad (3.1.)$$

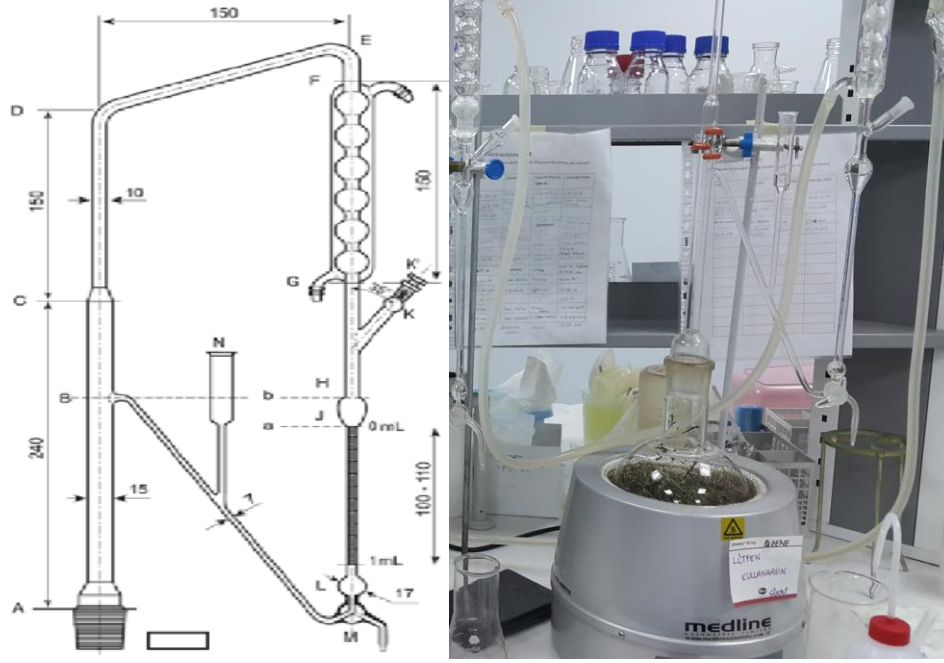
- a: birinci distilasyonda elde edilen suyun milimetre olarak miktarı
b: İkinci distilasyonda elde edilen toplam suyun milimetre olarak miktar



Görsel 3.5. Su miktar tayini aparatı

3.4. Uçucu Yağ Miktar Tayini

Öncelikle apareylerin 3 saat süresince yıkama işlemi yapılmıştır. Bitkisel materyalden 4 ayrı 50 gram ağırlığında drog tartılıp 2 litrelik cam balona konulmuştur. Üzerine 1000 ml distile su eklenip 3 saat süreyle laboratuvar ölçekte clevenger apareyi ile distilasyon işlemi yapılmıştır. Sonrasında bir süre soğumaya bırakılmıştır. Apareyin uçucu yağı toplandığı yerde uçucu yağ damlacıkları gözlenmiştir. Sonrasında elde edilen uçucu yağlar +4°C’de muhafaza edilmiştir.



Görsel 3.6. Uçucu yağ miktar tayini aparatu (Clevenger)



Görsel 3.7. Elde edilen uçucu yağ

3.4.1. Gaz kromatografisi (GK)/(AİD) ve gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi (GK/KS) ile uçucu yağın kimyasal bileşiminin belirlenmesi

Uçucu yağ eldesi ve analizi GK/AİD (gaz kromatografisi/alev iyonlaşma dedektörü) ve GK/KS (gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi) sistemleri kullanılarak bulunmuştur.

3.4.1.1. Gaz kromatografisi (GK)/alev iyonizasyon dedektörü (AİD)

Uçucu yağa ait bileşiklerin rölatif yüzdelерinin belirlenmesi amacıyla GK sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla Agilent 6890N GK sistemi, HP-Innowax (60 m × 0.25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) ile işlem gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında enjeksiyon port sıcaklığı 250 °C’dir ve 300 °C sıcaklıkta AİD tip detektör kullanılmıştır.

3.4.1.2. Gaz kromatografisi (GK)/Kütle spektrometre (KS)

Uçucu yağa ait bileşiklerin kütle spektrumları GK/KS kullanılarak analiz edilmiştir. Agilent 5975 GK/KSD sistemi, HP-Innowax (60 m × 0,25 mm Ø, 0,25 µm film kalınlığı) polar kolon ve taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu 250°C’dir. 70 eV elektron enerjisi ile 35-450 m/z kütle ağırlığındaki maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. 60°C’de 10dk, 4°C/dk artışla 220°C’ye, 220°C’de 10 dk, 1°C/dk artışla 240°C’ye yükselen toplam 80 dakikalık sıcaklık programı uygulanmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” ve Wiley GK/KS, MassFinder 3.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmıştır (McLafferty ve Stauffer, 1989), (Koenig ve Joulain, 2004).

3.5. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyalin toprak üstü kısımları kabaca ufaltıldıktan sonra 20 g olarak tartılmıştır. Sonrasında etil asetat, hekzan, kloroform ve metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 24 saat sürmüştür. Elde edilen ekstreler rotavaporda (<40°C) ‘de yoğunlaştırılmıştır. Ardından verimlilik hesaplaması yapılmıştır.





Görsel 3.8. Ekstrelerin elde edilme aşaması



Görsel 3.9. Rotavaporda çözücünün uçurulması işlemi

3.6. Bütün Kül

Daha önceden temizlenmiş krozenin tartımı alınmıştır. Ardından 600 °C kül fırınında yarım saat yakılmış, desikatörde soğutma işlemi yapılmıştır. İkinci tartım alınıp ikinci kez kül fırınında 600 °C 'de yarım saat yakılıp tekrar desikatörde soğutulmuştur ve tartılmıştır. Aynı işlem üçüncü kez tekrarlanıp ve üç aşamalı işlem sonunda kroze ortalaması alınıp kaydedilmiştir.

Drog sabit ağırlığa getirilmiş kroze içinde 1 gram olacak şekilde tartılmıştır. Sonra sıcaklığı 600 °C olarak ayarlanmış kül fırınında 1 saat süreyle yakılmış, buradan desikatöre alınan numunelerin soğuması beklenmiştir. Ardından tartım alınıp boş krezelerin ağırlık ortalama darası çıkarılarak elde edilen kül miktarı bulunur ve yüzde cinsinden ifade edilmiştir.

3.7. Asitte Erimeyen Kül

Bütün kül işleminden kalan külün üzerine 15 ml distile su ve 10 ml HCl eklenmiştir. Üstüne saat camı konularak 10 dakika yavaş yavaş kaynatılmış desikatörde soğutulmuştur. Sonra kül bırakmayan süzgeç kâğıdından süzme işlemi yapılmıştır. Süzüntü nötr olana kadar sıcak distile su ile yıkanıp, .ph metre ile takip edilmiş, nötrleşme işlemi sona erdikten sonra filtre kâğıdının kroze içinde kuruması beklenmiştir. Ardından 600 °C'ye ayarlanmış kül fırınında 3 saat yakma işlemi yapılmıştır. Desikatörde soğuması beklenmiş, Sabit tartıma getirilen küller yüzde miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.8. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Çalışmalar; mikroorganizmalar, besiyerleri, sterilizasyon, inkübasyon işlemi ve mikrodilüsyon yöntemi olarak sınıflandırılabilir.

3.8.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*), Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) ve mantarlar (*Candida albicans* ve *Candida krusei*) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, American Type Culture Collection)'dan liyofilize halde temin edilmiştir.

3.8.2. Besiyerleri

MHA (Mueller Hinton Agar) ve PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerleri hazır olarak temin edilmiş ve distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır (CLSI, 2007).

3.8.3. Sterilizasyon

Deneyler boyunca kullanılan laboratuvar malzemeleri, besiyerleri ve kontamine olan malzemeler 121°C'de, 1,5 atm basınç altında 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

3.8.4. Mikroorganizmaların inkübasyonu

Aktivite çalışmalarında kullanılan *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Bacillus subtilis* (NRRL B-4378) MHA, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 için de PDA besiyeri olarak kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri +4 °C’de saklanmıştır. Saflık bakımından kontrolleri yapıp, %15’lik gliserol içinde -85 °C’de saklanan mikroorganizmalar hazırlanan besiyerlerine ekilmiştir. Etüvde 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek çoğaltılmışlardır. Gelişen kültürler McFarland No: 0.5 tüpüne göre bulanıklık ayarı turbidometre kullanılarak yapılmıştır (CLSI, 2007).

3.8.5. Mikrodilüsyon yöntemi

Deneylerde 96 kuyucuklu “U” tipi mikro plakaları kullanılmıştır. Standart maddeler için 12 kuyucuğun birincisine stok çözeltisinden başlangıç konsantrasyonu 20 mg/mL olan çözeltiden 100’er µL olacak şekilde eklenmiştir. 100 µL alınarak çift katlı seri dilüsyon yapılmıştır. Yoğunluğu ayarlanmış mikroorganizmalar MHA ve PDA ile seyreltilmiş ve plakalara 100’er µL uygulanmıştır. Hazırlanan plakalar 37° C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda 20 µL resazurin çözeltisi ilave edilmiş ve 37° C’de 3 saat inkübasyona bırakılarak renklenme ile teşhisi sağlanmıştır. Sonuçlar minimum inhibisyon konsantrasyonları mg/ml şeklinde belirlenmiştir (CLSI, 2006). Besiyeri ve mikroorganizmaların bulunduğu kuyucuklar üreme kontrolü, sadece besiyerinin bulunduğu kuyucuklar sterilite kontrolü, bakteriler için siprofloksasin ve funguslar için ketakonazol antibiyotiklerinin bulunduğu kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Deneyler iki tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar ortalamaları olarak verilmiştir.

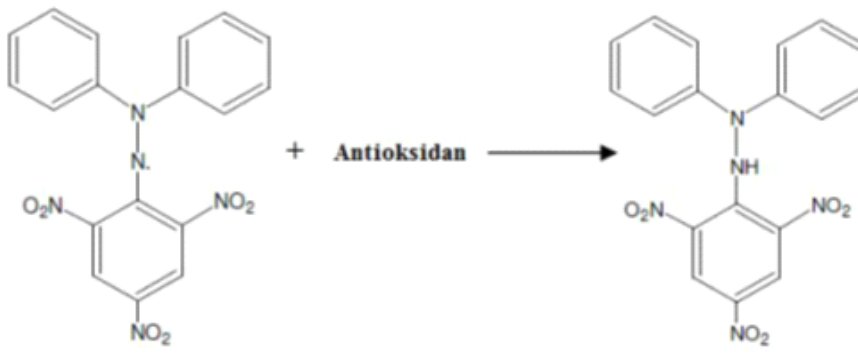
3.9. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

3.9.1. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH •) radikalini süpürücü etki tayini

Bu yöntem ilk defa Blois (1958) tarafından ortaya atılmıştır (Ardağ, 2008). DPPH radikali (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 515 nm’de maksimum absorbansa sahiptir (Albayrak, Sağdıç ve Aksoy, 2010). Koyu menekşe renklidir (Büyüktuncel, 2013) ve antioksidanla karşılaştınca renk kaybolur. Bu olay absorbans değeri sabit kalana dek sürer (Albayrak, Sağdıç ve Aksoy, 2010). Oldukça basit ve kullanımı yaygın olan bir metottur fakat ışık, kirlilik gibi çevresel faktörlere hassasiyet göstermektedir (Okan, vd.,

2013).

Deney esnasında radikalın 100 µM lık etanolik çözeltisi kullanılmıştır. Numune DPPH radikali ile muamele edildikten sonra 50 dakika süresince karanlıkta bekletilmiş ardından 517 nm’de asbsorbans ölçümü yapılmıştır, standart olarak askorbik asit kullanılmıştır (Berköz ve Yalın, 2009).



Şekil 3.1. DPPH radikali molekül yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon (Yavaşer, 2011)

3.9.1.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

0,1 mM DPPH • çözeltisi: 3,94 mg DPPH tartılıp etanol ile çözülüp hacmi 100 ml’ ye tamamlanmıştır.

Askorbik asit çözeltisi: 4,40 mg askorbik asit 5 ml saf su ile çözülerek 50000 µM’ lik askorbik asit standartı elde edilmiştir. Bu çözeltiden 25 kat dilüsyon ile 200 µM’ lik standart, buradan da 7 kat seri dilüsyon yapılarak askorbik asit konsantrasyonları oluşturulmuştur.

Ekstreler: 1000 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltilerden 96-kuyucuklu plakların kuyucuklarına sırasıyla 100’er µl aktarılmıştır ve her ekstre kendi çözücüsü ile iki katlı 7 seri dilüsyon yapılarak seyreltilmiştir.

3.9.1.2. Deneyin yapılışı

Hazırlanan bitki ekstralarının DPPH radikalini süpürücü etkilerini belirlemek amacıyla yapılan pipetlemeler Tablo 3.1.’de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak hazırlanan askorbik asit çözeltisi konsantrasyonları ve ekstralardan hazırlanan konsantrasyonlar ve negatif kontrol olarak çözücüler ve kör olarak da etanolden 500’er µl bulunan tüplerin kör hariç hepsine hazırlanan DPPH • çözeltisinden 500’er µl eklenmiştir. Mikroplaklara hazırlanan tüm bu çözeltilerden 200’er µl alınmıştır ve 30

dakika süreyle karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. UV absorbans 517 nm’de mikropate spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında okunmuştur. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma (n=3) olarak ifade edilmiş ve doğal antioksidan olarak kullanılan askorbik asit ile karşılaştırılmıştır. Numuneler ve standartların radikal süpürücü aktivitesi negatif kontrole oranla % olarak verilmektedir ve aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Yu, vd., 2002).

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{\text{kontrol absorbansı} - \text{numune absorbansı}}{\text{kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (3.2.)$$

Tablo 3.1. DPPH radikali ile antioksidan aktivite tayini için deney esnasında yapılan pipetlemeler

	Kontrol	Numune	Standart
Çözücüler	500 μ l	-	-
DPPH• Çözeltisi	500 μ l	500 μ l	500 μ l
Ekstreler	-	500 μ l	-
Standart	-	-	500 μ l

3.9.2. Folin-Ciocalteu yöntemi ile total fenolik bileşik tayini

İlk kez 1965 yılında Singleton ve Rossi önermiş ve sonrasında geliştirilmiştir (Ardağ, 2008). Bitki özlerindeki polifenoller, görünür ışık spektrofotometrisi ile ölçülebilen mavi bir kompleks oluşturmak için spesifik redoks reaktifleriyle (Folin-Ciocalteu reaktifi) reaksiyona girer. Folin-Ciocalteu yöntemi birkaç farmakopede anlatılmıştır. Reaksiyon, fosforungstik-fosfomolibdenum kompleksi tarafından oluşturulan mavi bir kromofor oluşturur; buradaki kromoforların maksimum absorpsiyonu, alkalın çözeltisine ve fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna bağlıdır (Blainski, Lopes ve Mello, 2013). FC reaktifi fosfotungstik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitler mavi renkli bileşiklere indirgenir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup spektrofotometrede takip edilir (İşbilir, 2008). Gallik asit standart olarak kullanılmaktadır (Dinçer ve Akçay, 2000).

3.9.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

%20’lik Na_2CO_3 çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartılmıştır, saf su ile çözülüp hacmi 50 ml’ye tamamlanmıştır.

1:10 Folin-Ciocalteu reaktifi: 1 mL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 ml saf su

eklenerek 1:10 oranında seyreltilmiştir. Tayin öncesi hazırlanarak taze olarak kullanılmıştır.

Standartlar: 10 mg gallik asit 1 ml saf su ile çözülerek 10000 µg/ml’lik gallik asit standartı elde edilmiştir. Bundan 1000 µg/ml’lik standart hazırlanarak saf su ile çözülmüştür. 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 µg/ml’lik gallik asit standartları seri dilüsyon ile oluşturulmuştur.

Ekstreler: Ekstrelerden 1000 µg/ml konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmıştır. 1000 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan bitki ekstraktları 1: 50 oranında seyreltilerek 20 µg/ml konsantrasyonlar oluşturulmuştur.

3.9.2.2. Deneyin yapılışı

Tablo 3.2’de belirtilen pipetlemeler 96 kuyucuklu mikropakta yapılmıştır. Mikropaklar oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. 700 nm’de absorbans ölçülmüştür. Her örnek için ölçümler iki kere tekrarlanmıştır (n=2). Sonuçlar gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.2. Toplam polifenol madde tayini

	Kör	Numune	Standart
Çözücüler	12,5 µl	-	-
Ekstreler	-	12,5 µl	-
Standart	-	-	12,5 µl
1:10 FC Reaktifi	62,5 µl	62,5 µl	62,5 µl
%20’lik Na ₂ CO ₃ Çözeltisi	125 µl	125 µl	125 µl

3.9.3. TAS (Toplam antioksidan statü) tayini

Toplam antioksidan statüyü belirlemek için Rel Assay Diagnostics tarafınca üretilen kit kullanılmıştır. Metodun işleyişine göre ekstrede bulunan antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS [2,2’-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] radikal şeklinden renksiz ve indirgenmiş ABTS formuna geçer. 660 nm’de absorbansın değişimi ekstrenin toplam antioksidan kapasitesi ile ilişkilidir. Tayin, vitamin E analogu olan ve Troloks eşdeğeri (Troloks Equivalent) olarak adlandırılan kararlı standart antioksidan çözelti olarak kullanılan referans madde ile kalibre edilmiştir. TAS ölçümü

kit prosedürüne uygun olarak aşağıda verilen tablo 3.3'teki gibi yapılmıştır. Sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.

Tablo 3.3. *TAS ölçümü kit prosedürü*

Örnek veya Standart	9 µl
Reaktif 1 (Tampon çözeltisi, Asetat tamponu) (**Karıştırılıp absorbans A1 530 nm 'de okundu.)	150 µl
Reaktif 2 (Prochromogen Çözeltisi, ABTS) (**37° C 5 dk inkübasyondan sonra A2 530 nm 'de okundu.)	225 µl

Hesaplama

$$A2-A1= \Delta A$$

(3.3.)

Absorbanslar arasındaki fark alındıktan sonra aşağıda verilen eşitlik 2'ye göre hesaplanır.

$$x = \frac{\Delta A(\text{örnek})}{\Delta A(\text{standart})} \times 20$$

(3.4.)

3.9.4. TOS (Toplam oksidan statü) tayini

Deney Erel tarafından geliştirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde R1 (H₂SO₄) reaktifi içinde ksilenol orange, gliserol ve NaCl çözündürülerek pH 1,75'e ayarlanır. R2 reaktifi (H₂SO₄) ise içerisinde demir amonyum sülfat heksahidrat ve o-dianizidin dihidroklorür çözünmesiyle hazırlanarak kullanılır. Ekstre Reaktif 1 ile muamele edilip 530 nm'de absorbans ölçümü yapılır. Sonra Reaktif 2 ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp 530 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. TOS ölçümü kit prosedürüne uygun şekilde aşağıdaki tablo 3.4.'te verilen şekilde yapılmıştır. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equiv./L olarak ifade edilir.

Tablo 3.4. *TOS ölçümü kit prosedürü*

Örnek veya standart	15 µl
Reaktif 1	
(Tampon çözeltisi, H ₂ SO ₄)	100 µl
(**Karıştırılıp absorbans A1 530 nm’de okundu.)	
Reaktif 2	
(Substrat Çözeltisi, H ₂ SO ₄ , demir, o-dianizidin)	5 µL
(**37° C’de 5 dk inkübasyondan sonra absorbans A2 530 nm’de okundu.	

Hesaplama

$$A2 - A1 = \Delta A$$

(3.3.)

Absorbanslar arasındaki fark alındıktan sonra aşağıda verilen eşitlik 3 ‘e göre hesaplanır.

$$x = \frac{\Delta A(\text{örnek})}{\Delta A(\text{standart})} \times 20$$

(3.4.)

4. BULGULAR

4.1. Yabancı Madde Miktar Tayini Sonuçları

50 gram kuru drog içindeki yabancı madde miktarı 0,8 gram olarak bulunmuştur. Drog üzerindeki yabancı maddelerin droğun yapışkan yapısından kaynaklandığını söylemek mümkündür. Yabancı madde miktarı %1,6 olarak hesaplanmıştır.

4.2. Su Miktar Tayini İşlem Sonuçları

2018 yılında toplanan çiçekli bitkiler kullanılmıştır. Deney 2 ayrı balonda yapılmış ve sonuç ortalama olarak hesaplanmıştır. Birinci balondaki drog için ilk okunan değer (a1) 1,9, ikinci okunan değer ise (b1) 2,7'dir. İkinci balonda okunan ilk değer (a2) 1,7, ikinci okunan değerse (b2) 2,7'dir. Denkleme göre verilen değerler yazıldığında birinci balon için elde edilen sonuç %8 ikinci balon için %10'dur. Ortalama hesap edildiğinde droğun taşıdığı su miktarı %9 olarak bulunmuştur.

4.3. Uçucu Yağ Miktar Tayini İşlem Sonuçları

Clevenger apareyi kullanılarak 3 saat süresince yapılan distilasyon işlemleri sonucunda yağ miktarı çok az olduğu için hekzanla alınmıştır. Bu nedenle verim hesaplaması yapılamamıştır.

4.3.1. *Inula graveolens* uçucu yağının kimyasal bileşimi

2017 yılında çiçekli ve çiçeksiz örnekler ile 2018 yılında toplanan çiçekli örneklerle ait uçucu yağlar incelenmiştir. *Inula graveolens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağ bileşimi GK/AID GK/KS sistemleri ile belirlenmiş ve %1'den büyük ana bileşenlerin bağıl miktarları belirlenmiştir. Uçucu yağlarda ana bileşenlerin borneol ve bornil asetat olduğu gözlenmiştir. Bunların dışında farklı oranlarda α -pinen, T-kadinol, selin-11en-4 α -ol, karyofilledienol-II, β -karyofillen, karyofillen oksit, pentakosan, hekzadekanoik asit, karyofillenol-II, karyofillenol-I de saptanmıştır. Analizi yapılan ilk uçucu yağda; bornil asetat, borneol, karyofillendienol-II, karyofillen oksit, selin-11en-4 α -ol, karyofillenol-I, β -karyofillen, T-kadinol, karyofillenol-II %1'den fazla oranda gözlenen maddeler olmuştur. İkinci uçucu yağda; bornil asetat, T-kadinol, borneol, karyofillendienol-II, karyofillen oksit, selin-11en-4 α -ol, pentakosan, hekzadekanoik, β -karyofillen, karyofillenol-II, karyofillenol-I gözlenmiştir. Üçüncü uçucu yağda; bornil asetat, borneol, T-kadinol, karyofillendienol-

II, karyofillen oksit, selin-11en-4 α -ol, β -karyofillen gözlenmiştir. Sonuncu uçucu yağda ise bornil asetat, borneol, α -pinen, T-kadinol, selin-11en-4 α -ol, karyofilledienol-II gözlenmiştir.

Uçucu yağ eldesi 4 kez tekrarlanmış ve sonuçlar aşağıda tablo 4.1.'deki gibi listelenmiştir.

Tablo 4.1. *Inula graveolens* uçucu yağının kimyasal bileşimi örnek 01, 02, 03, 04

Ana Bileşenler	Örnek01 (>%1)	Örnek02 (>%1)	Örnek03 (>%1)	Örnek04 (>%1)
α -Pinen	-	-	-	2,1
Bornil asetat	43,1	36,2	48,2	43,0
β -karyofillen	1,8	1,2	1,2	3,0
Borneol	20,6	7,1	24,1	16,9
Karyofillen oksit	3,0	3,3	2,5	-
t-Kadinol	1,7	13,7	4,9	4,28
Selin-11-en-4 α -ol	2,73	2,9	2,2	6,3
Karyofilledienol-II	4,68	5,1	3,2	7,5
Karyofillenol-I	1,9	1,0	-	-
Karyofillenol-II	1,4	1,22	-	-
Pentakosan	-	1,9	-	-
Hekzadekanoik asit	-	1,74	-	-

*Örnek 01: 2017 yılında toplanan çiçeksiz bitkinin uçucu yağı

*Örnek 02: 2017 yılında toplanan çiçekli bitkinin uçucu yağı

*Örnek 03 ve 04: 2018 yılında toplanan çiçekli bitkiden elde edilen uçucu yağlardır.

4.4. Ekstre Eldesi ve Elde Edilen Ekstrelerin Özellikleri

Inula graveolens bitkisine ait toprak üstü kısımlar hekzan, kloroform, metanol ve etil asetat ile ekstre edilmiştir. 20 gram olarak kuru halde tartılan drogdan elde edilen ekstrere verim hesabı % şeklinde yapılmıştır.

Hekzan kullanılarak elde edilen ekstrenin sarı renkte ve daha yoğun kıvamda olduğu gözlenmiştir. Etil asetatlı ekstrenin çok yoğun kıvamlı ve yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. Kloroform kullanılarak elde edilen ekstrenin yeşil renkli ve partiküllü olduğu gözlenmiştir. Metanollü ekstre ise yine yoğun kıvamlı ve yeşil renktedir. Ekstreler için verim hesaplaması aşağıda tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. *Inula graveolens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraların verim %'leri

Ekstreler	20 gram bitkide	100 gram bitkide
Etil asetat	1,5 g	7,5 g
Hekzan	0,9 g	4,5 g
Kloroform	1,8 g	9,3 g
Metanol	3,4 g	17 g

4.5. Kül Miktar Tayini

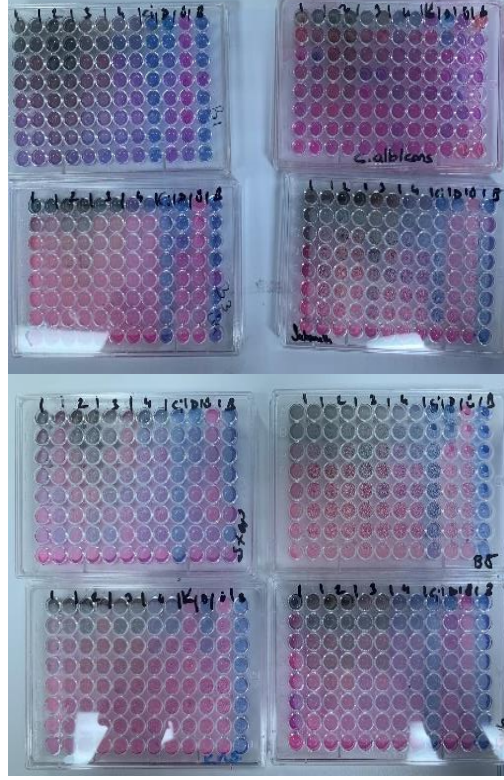
Kül miktar tayini işlemi için (n=3) olacak şekilde çalışılmıştır. İlk tartım ve 3 kez yakma soğutma işleminden sonra krozelerin ağırlıkları hesaplanmış ve ortalama alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre krozelerin ortalama ağırlığı 24,5479 olarak bulunmuştur. 1 saat yanan drogdan kalan kül ile yapılan tartımların ortalaması ise 24,64006 olarak bulunmuştur. Aradaki fark alınıp yüzdesi hesaplandığında kül miktarı %9,216 olarak bulunmuştur.

4.6. Asitte Erimeyen Kül

Asitte erimeyen kül %0,89 olarak bulunmuştur.

4.7. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Mikroorganizma gelişiminin inhibe edildiği konsantrasyonlar Tablo 4.3'te gösterildiği gibi minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) olarak belirlenmiştir.



Görsel 4.1. Mikroplak düzeneği (boyama sonrası)

Tablo 4.3. Bitkiye ait farklı ekstrelerin tabloda belirtilen mikroorganizmalar üzerinde minimum inhibitör konsantrasyon düzeyleri

	Minimum	İnhibitör	Konsantrasyon	(MIK)	(mg/ml)	
Ekstre	EC	PA	ST	BC	BS	SA
Kloroform	5	20	2,5	5	20	20
Metanol	2,5	20	5	2,5	10	10
Etil Asetat	20	20	5	2,5	10	10
Hekzan	20	20	2,5	10	10	5
Siprofloksasin	0,03	0,003	0,06	0,03	0,003	0,003

BS: *Bacillus subtilis*

EC: *Escherichia coli*

ST: *Salmonella typhimurium*

SA: *Staphylococcus aureus*

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

BC: *Bacillus cereus*

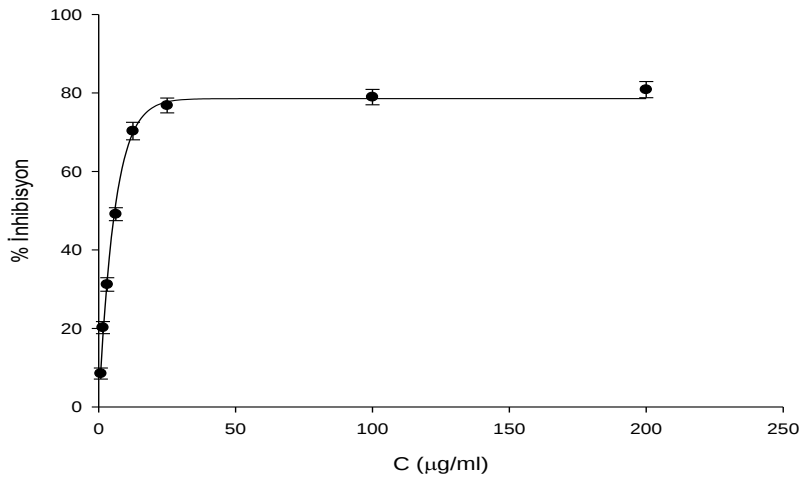
4.8. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.8.1. Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki tayini

DPPH• molekülü ile antioksidan maddeler reaksiyona girerek hidrojenin bağlanmasına ve doğal olarak serbest radikallerin ortamdan temizlenmesine yol açarlar. Bitkilere ait serbest radikal giderici etki DPPH • kullanılarak tayin edilmiş, standart olarak ise askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asit standart grafiği ve dört farklı ekstrenin serbest radikal giderme yüzdeleri aşağıda verilmiştir.



Görsel 4.2. DPPH radikali giderme çalışmasına ait pipetlemeler



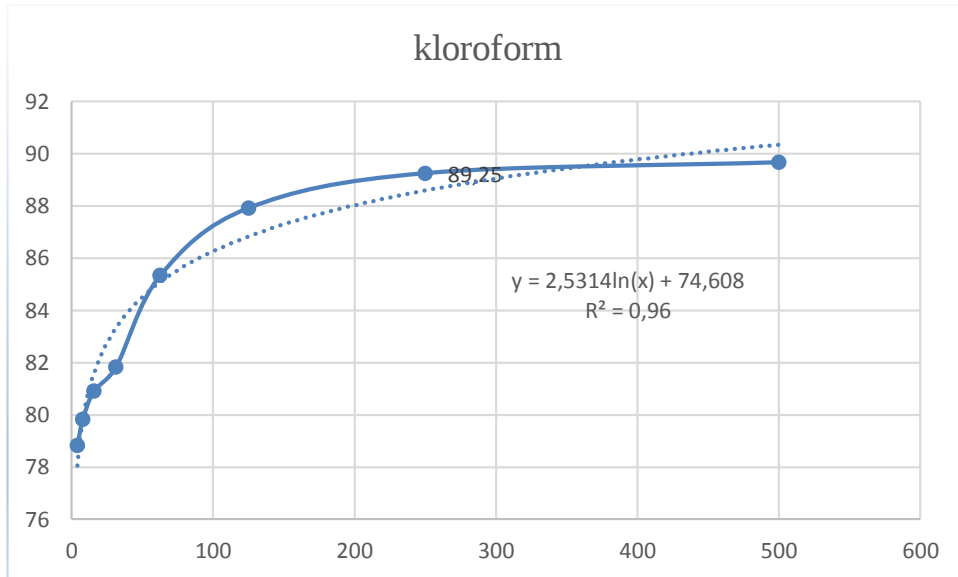
Şekil 4.1. Askorbik asit standart grafiği

Çalışmamızda standart madde olarak askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asitin konsantrasyona karşı yüzde inhibisyon grafiği yukarıdaki gibidir. Askorbik asitin IC 50 değeri ise $4,67 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

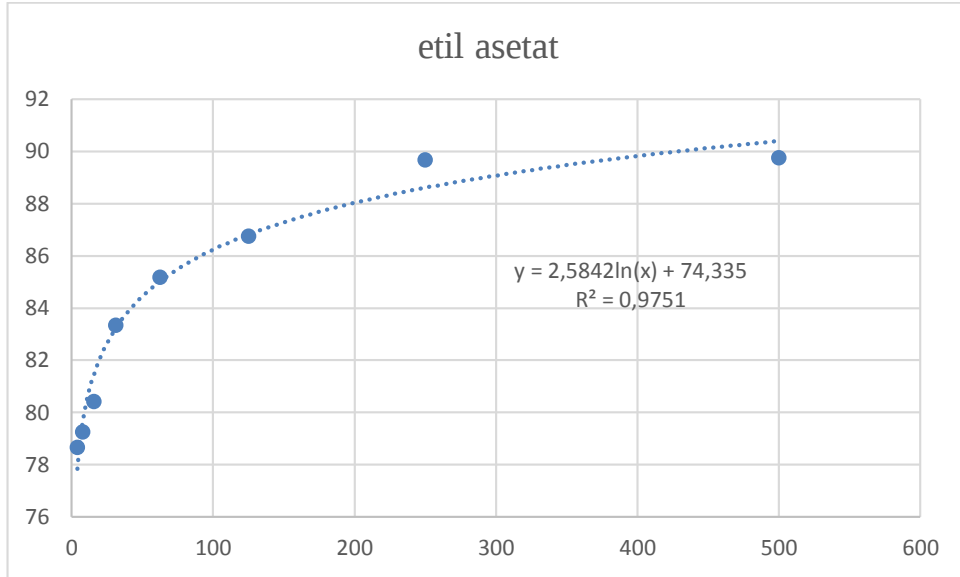
Tablo 4.4. Ekstrelelere ait inhibisyon ve yüzde derişim ($\mu\text{g/mL}$) değerleri

% derişim	İnhibisyon K	İnhibisyon E	İnhibisyon M	İnhibisyon H
500	89,667	89,750	94,055	81,972
250	89,250	89,667	93,777	81,416
125	87,917	86,750	90,333	80,503
62,5	85,333	85,167	85,583	79,583
31,25	81,833	83,333	82,222	78,861
15,625	80,917	80,417	80,944	78,416
7,81	79,833	79,250	79,583	77,944
3,9	78,833	78,667	79,25	

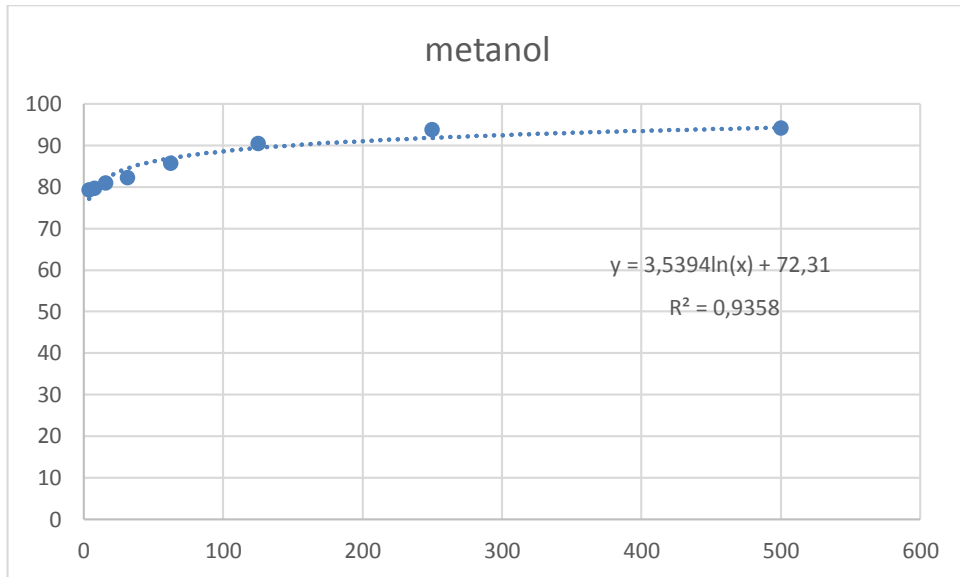
(K: kloroform, E: etil asetat, M: metanol, H: hekzan)



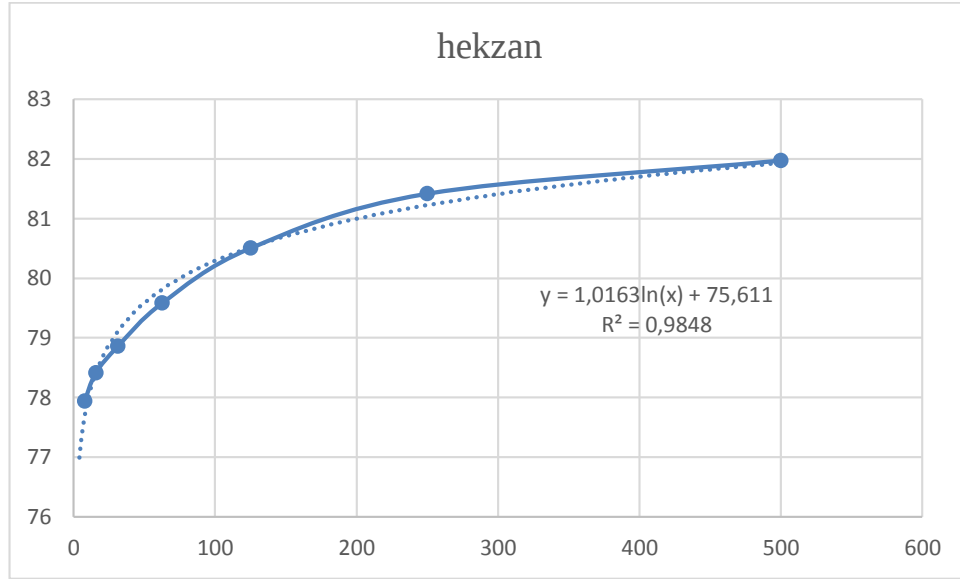
Şekil 4.2. *Inula graveolens* kloroformlu ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi



Şekil 4.3. *Inula graveolens* etil asetatlı ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi



Şekil 4.4. *Inula graveolens* metanollü ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi



Şekil 4.5. *Inula graveolens* hekzanlı ekstresinin DPPH radikali giderme kapasitesi

Tablo 4.5. *Inula graveolens*'ten elde edilen ekstrelerin IC50 değerleri

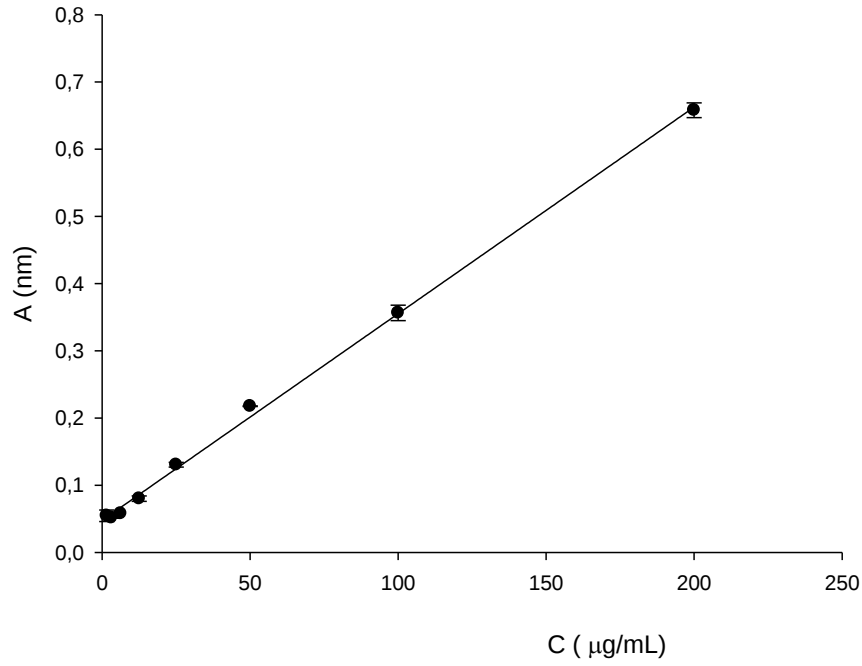
Ekstreler	IC50 Değerleri (µg/ml)
Metanol	57,48
Hekzan	72,04
Etil asetat	45,48
Kloroform	45,10

4.8.2. Toplam fenol miktar tayini deney sonuçları

Inula graveolens ekstresinde bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 1 de verilen gallik asit standart grafiği kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen grafik denklemi $y = 0,0477 + 0,0031x$ ($R^2=0,9993$) olarak bulundu. Değerler tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Ekstrelerin içerdiği gallik asite eşdeğer (gae) toplam fenol miktarları

<i>Inula graveolens</i> (L.) Desf. ekstreleri	µg GAE/100g
Kloroform	114,9355±2,2542
Hekzan	207,5161±1,5427
Etil asetat	90,74194±0,8564
Metanol	132,6774±1,6874



Şekil 4.6. Gallik asit standart grafiği

Antioksidan içeriği en zengin olan ekstre hekzan olarak bulunmuş, sonra sırasıyla metanol ve kloroform izlemiştir. En düşük antioksidan bileşik içeren ekstre ise etil asetatlı ekstre olmuştur.

4.8.3. Toplam antioksidan statü tayini deney sonuçları

Absorbanslar arasındaki fark alındıktan sonra aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanan sonuçlar Tablo 4.7'deki gibidir.

Tablo 4.7. TAS deneyi verileri (mmol Trolox Equiv./L)

Ekstreler	(mmol Trolox Equiv./L)	Standartlar
Kloroform	2,807143	0,036742
Hekzan	4,564286	0,09553
Metanol	3,307143	0,001633
Etil asetat	3,578571	0,01633

2'nin üstündeki değerler çok iyi kabul edilir. Bu sonuçlara bakarak en yüksek aktivitenin hekzanlı ekstrede gözlemlendiğini söylemek mümkündür. En düşük aktivite

kloroformda gözlenmiş olsa dahi sonuç 2'den yüksek olduğu için antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz (http-10)

4.8.4. Toplam oksidan statü tayini deney sonuçları

Absorbanslar arasındaki fark alındıktan sonra aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanan sonuçlar tablo 4.8.'deki gibidir.

Tablo 4.8. TOS deneyi verileri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)

Ekstreler	($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)	Standart
Kloroform	4,433333	0,0545
Hekzan	4,466667	0,035
Metanol	4,02	0,0135
Etil asetat	4,106667	0,008

Tüm ekstrelerin verdiği değerler 5'in üzerindedir. Aktivite gözlenebilmesi için 5'in altındaki sonuçlar oldukça iyi kabul edilir (http-10).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışmamızın konusunu oluşturan *Inula graveolens* (L). Desf. Asteraceae (Compositae) familyasından *Inula* cinsine ait bir türdür. Halk arasında iri pire otu, deli sarı ot, kokulu andız isimleri ile bilinmektedir. Cins adı daha sonra yapılan çalışmalar ile *Dittrichia*, türün adı da *Dittrichia graveolens* olarak revize edilmiş olsa da tez boyunca bitkiden *Inula graveolens* olarak bahsedilmiştir. *Inula graveolens* dünyanın pek çok ülkesinde uzun yıllar boyunca geleneksel tedavi yöntemleri kapsamında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır fakat bitkinin etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bu nedenle yeni çalışmalara bitkinin etkinliğinin desteklenmeye ihtiyacı vardır. Tezimizin başlıca amaçlarından birisi de budur. Çalışmamızda bitki üzerinde farmakognozik çalışmalar yapılmış, farmakope standartlarında bitkimiz analiz edilmiş, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite gösterip göstermediği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçlarla Bursa-İnegöl'den 2017 ve 2018 yıllarında toplanan bitki örnekleri çalışılmıştır.

Pek çok bitkinin ilkbahar ve yaz aylarında çiçeklenmesinin aksine bitkinin çiçeklenme zamanı yaz sonu-sonbahar başına denk gelmektedir. Çiçeksiz bitkideki uçucu yağ bileşimini gözlemlemek amacıyla 2017 yılı Temmuz ayında, daha sonra 2017 yılının Eylül ayında, ardından da 2018 yılı Eylül ayında bitki toplanmıştır. Bursa-İnegöl'de yüksek yerlerden ve özellikle yol kenarından temin edilen bitki oldukça belirgin ve hoş bir kokuya sahiptir. Ayrıca bitkinin oldukça yapışkan olduğu gözlemlenmiştir. Ardından deneylerde kullanılmak üzere bitki serin ve kuru bir ortamda kurumaya bırakılmış, kuruma ile zamanla kokusunda azalma meydana gelmiştir.

Tez çalışmamızın başında bitkilerle tedavi, bitkimizin dahil olduğu bitki ailesi Asteraceae, *Inula* cinsi, *Inula graveolens* tür özellikleri ve bitkiye dair daha önce yapılan çalışmalara yer verilmiştir. Böylece yaptığımız çalışma ile daha önce yapılan çalışmaları kıyaslamak da mümkün olacaktır. Ancak yapılan kaynak taramasında bitkiye ait farmakope standartlarında yapılmış su miktar, yabancı miktar, kül miktar tayinlerine denk gelinmemiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler bundan sonra yapılacak çalışmalar için öncülük edebilir. Kaynak taramasından sonra deneylerin yapılış yöntemleri ve bulgular kısmı yer almaktadır.

Öncelikle yabancı madde miktarı hesaplanması amacıyla, kuru drog ince bir tabaka halinde serilerek incelenmiştir. Küf, böcek, hayvansal kalıntı-dışkı veya başka bitkisel materyal yoğun bir şekilde gözlenmemiştir. Bitkinin çevresinde başka bitki

türlerinin çok fazla yetişmediği gözlenmiş ayrıca çok yakında haşerelerin de bulunamadığı belirlenmiştir. Bu durumun bitkinin yoğun kokusu ve tüylü yapısından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Genel monograf bitkisel droglar için aksi belirtilmedikçe yabancı madde miktarını %2 ile sınırlar. Elde ettiğimiz sonuç %1,6'dır. Elde ettiğimiz sonuçlar bu sınırların içindedir (European Pharmacopeia, 2007).

Su miktar tayini için bitkinin toprak üstü kısımları (herba) kullanılmış, Avrupa Farmakopesi standartlarından faydalanılmış, droğun içerdiği su miktarı iki ayrı balonda gerçekleştirilen işlem sonunda ortalama olarak hesap edilmiştir. Su miktarı kuru bitkisel materyalde %10'dan fazla olmamalıdır. Yapılan literatür taramasında bitkimize ait su miktar tayini işlemine rastlanmamış ayrıca Avrupa Farmakopesi'nde de bitkinin monografinin bulunmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle yapılan çalışma ve elde edilen değerler iltir. İki ayrı balonda gerçekleştirerek ortalama şeklinde hesap edilen değer %9 olarak bulunmuştur.

Kül miktar tayini ve asitte erimeyen kül deneyleri droğun kalitesi ve saflığını gösteren parametrelerden birisidir. Toplam kül fizyolojik kül (bitkinin kendi dokusu kaynaklı) ve fizyolojik olmayan kül (kum ve toprak gibi çevresel kirlilikler) olarak ikiye ayrılabilir. Bitki materyallerinin kayda değer derecede özellikle kalsiyum okzalat gibi fizyolojik kirlilikleri içermesi, toplam kül tayininin bitkisel droğun kalitesi hakkında fikir verme konusunda yetersiz kalmışına yol açmıştır. Bu nedenle asitte erimeyen kül miktarı droğun kalitesi hakkında bize fikir sunan bir diğer parametredir (Rao ve Xiang, 2009). Kül miktar tayini ve asitte erimeyen kül deneyleri de Avrupa Farmakopesi'ne göre uygulanmıştır. Üç kez tekrarlanan deneyler sonucunda kül miktarı %9,216, asitte erimeyen kül miktarı ise %0,89 olarak bulunmuştur. Yapılan literatür çalışmasında daha önce yapılmış bütün kül ve asitte erimeyen kül analizlerine rastlanmamıştır.

Uçucu yağ miktar tayini GK/KS GK/AID yöntemleri ile yapılmıştır. Uçucu yağ eldesi 4 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen yağ çok az miktarda olduğu için verimlilik analizi yapılamamış ve yağ örneği hekzan ile alınmıştır. Bitkinin yoğun bir kokuya sahip olmasına rağmen uçucu yağ bitkisi olmadığı söylenebilir Çalışma sonucunda oranı %1 den fazla olan bileşikler belirlenmiştir 2017 yılında toplanan bitkiler yalnızca uçucu yağ çalışmaları için kullanılmıştır. 2017 Temmuz ayında toplanan çiçeksiz örneklerden elde edilen uçucu yağ analiz edildiğinde %43,13 oranında bornil asetat, %20,60 oranında borneol, %4,68 oranında karyofilladienol II, %3,09 oranında karyofillen oksit, %2,73 oranında selin-11-en-4 α -ol, %1,90 oranında karyofillenol-I, %1,84 oranında β -

karyofillen, %1,73 oranında t-kadinol, %1,58 oranında tanımsız, %1,43 oranında karyofillenol-II ve %1,21 oranında da tanımsız bir başka bileşik belirlenmiştir. Daha önceki uçucu yağ çalışmaları ile kıyaslandığında bitkideki ana uçucu yağ bileşenlerinin borneol ve bornil asetat olması tutarlı bir durumdur. 2017 Eylül ayında toplanan bitkinin uçucu yağında ana bileşen %36,29 oranında bornil asetatıdır. Devamında belirlenen bileşikler %13,72 oranında t-kadinol, %7,17 borneol, %5,18 karyofilledienol-II, %3,38 karyofillen oksit, %2,95 selin-11-en-4 α -ol, %2,43 tanımsız bileşik, %1,93 pentakosan, %1,74 hekzadekanoik asit, %1,56 ve %1,34 oranında tanımsız bileşikler, %1,22 oranında β -karyofillen ve %1,04 oranında karyofillenol-I olmuştur. Aynı lokasyondan aynı sene içinde farklı aylarda toplanan iki örnekten elde edilen uçucu yağların bileşimine bakıldığında bazı farklar gözlenmektedir. Uçucu yağdaki borneol yüzdesi eylül ayında toplanan örnekte daha az, t-kadinol oranı ise daha fazladır. Ayrıca temmuz ayında toplanan örnekte izole edilmeyen veya yüzdesi 1'den küçük olan hekzadekanoik asit ve pantakosan eylül ayında toplanan örnekten uçucu yağdan analiz edilmiştir. Bu durum bitki kompozisyonunun mevsime bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. 2018 senesinde eylül ayında toplanan örneklerden elde edilen uçucu yağların bileşimine bakıldığında ise ilk örnekte ana bileşen %48,26 oranında bornil asetat olarak belirlenmiştir. %24,11 oranında borneol, %4,93 oranında t-kadinol, %3,27 oranında karyofilledienol-II, %2,52 oranında karyofillenoksit, %2,29 oranında selin-11-en-4 α -ol, %1,61, %1,08 ve %1,28 oranında tanımsız 3 bileşik ve %1,27 oranında β -karyofillen belirlenmiştir. İkinci örnekten elde edilen uçucu yağ bileşimine bakıldığında ise %43,03 oranıyla ana bileşen bornil asetat olmuş, %16,97 ile borneol, %9,75 ve %6,07 oranında tanımsız iki bileşik, %7,50 oranında karyofilledienol-II, %6,39 oranında selin-11-en-4 α -ol, %4,28 oranında t-kadinol ve %2,15 oranında α -pinen belirlenmiştir. Uçucu yağ eldesi çalışmaları sonuçlarına baktığımızda borneol ve bornil asetat bileşiklerinin istikrarlı bir şekilde en yüksek oranda karşımıza çıktığını söylemek mümkündür. Diğer farklılıklar bitkinin toplandığı mevsime veya toplanan lokasyonun yol kenarında veya daha iç kesimlerde, daha yüksek yerlerde olması gibi durumlara bağlanabilir.

Antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanmak üzere 4 farklı çözücü kullanarak ekstre elde edilmiştir böylece farklı çözücülere geçen maddelerin aktivite üzerindeki etkisinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Çözücüler ile 24 saat maserasyona bırakılarak elde edilen ekstratlar fiziksel olarak da bazı farklılıklar göstermektedir. Hekzan kullanılarak elde edilen ekstre sarı renklidir; kloroform, etil

asetat ve metanol kullanılarak elde edilen ekstreler yeşil renklidir. Bu durum ekstrelere geçen maddelerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Elde edilen ekstreler ile verim analizi yapılmış olup en fazla verim alınan ekstrenin metanol, en az verim alınan ekstrenin ise hekzan olduğu görülmüştür.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmalar esnasında üç Gram negatif bakteri türü; *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311), 3 Gram pozitif bakteri; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Bacillus subtilis* (NRRL B-4378) ve 2 mantar türü; *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 kullanılmıştır. Fakat mantarlarda besiyeri kaynaklı sorun nedeniyle üreme gözlenememiştir. Sonuçlar minimum inhibitör konsantrasyon düzeyleri hesaplanarak mg/ml olarak ifade edilmiştir. Bitkinin farklı ekstreleri ile yapılan çalışmalarda mikroorganizmalara karşı değişen değerlerde etkinlik gözlenmiştir. Elde edilen MİK değerleri kıyaslandığında ekstrelerin en fazla *Salmonella typhimurium* üzerinde etkili olduğu en az oranda ise *Pseudomonas aeruginosa* üzerine etkili olduğu bulunmuştur. Kloroformlu ekstre en fazla *Salmonella typhimurium*, metanollü ekstre en fazla *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus*, etil asetatlı ekstre en fazla *Bacillus cereus*, hekzanlı ekstre en fazla *Salmonella typhimurium* üzerinde etki göstermiştir. Ekstrelerin MİK değerleri başlangıç konsantrasyonu olan 20 mg/ml ile 2,5 mg/ml arasında değişmektedir. Gram pozitif mikroorganizmaların Gram negatiflere göre antibiyotiklere daha hassas olduğu bilinmektedir. Fakat çalışmamızda Gram negatif bir bakteri türü olan *Salmonella typhimurium* üzerinde ekstrelerin çalışmamızda yer verdiğimiz Gram pozitif bakterilerden daha etkili olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada (Mazandarani, Ghafourian ve Khormali, 2014) bitkiye ait metanol ve asetondan elde edilen ekstre ile çalışılmış, MİK değerlerinin 12,6 ile 112 µg/ml arasında değiştiği görülmüştür, *E. coli* and *Salmonella typhimurium* en hassas bakteriler olarak gözlemlenmiştir. Metanollü ekstrenin *S. aureus* ait MİK değeri 14,4 µg/ml'dir. *B. cereus* MİK değeri 112,4 µg/ml'dir. *E. coli* MİK değeri 94,3 µg/ml'dir. *P. aeruginosa* MİK değeri 148,6'dır. *S. typhimurium* MİK değeri ise 112 µg/ml'dir. Bu çalışma ile kıyaslandığında bizim elde ettiğimiz MİK değerleri daha yüksek olarak bulunmuştur. Al-Snafi, 2018'e ait bir başka çalışmada ise kloroformlu ekstrenin %5'lik dimetil sülfoksit içindeki 20,40,80 µl'lik çözeltisi kullanılmış ve artan konsantrasyonda etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kullandığımız kloroformlu ekstre dimetil sülfoksit

içinde çözülmemiştir ancak MİK sonuçları 2,5 mg/ml ile 20 mg/ml arasındadır. Yine çalışmamızdan daha düşük MİK değerleri elde edilmiştir.

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için dört farklı metod ile çalışılmıştır. Deney sonucu elde edilen absorbans değerlerinden öncelikle verilen formüle göre % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra konsantrasyona karşılık % inhibisyon grafikleri çizilmiş ve grafiğe ait denklem elde edilmiştir. Grafik ve denklemden faydalanılarak IC50 (inhibe edici özelliği olduğu bilinen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonun yarı değeri şeklinde ifade edilebilir) değeri hesaplanmıştır. Sonuçlara baktığımızda IC50 değeri en düşük olan ekstre kloroformlu ekstre, en yüksek değere sahip ekstre ise hekzanlı ekstre olarak bulunmuştur. Daha önce metanollü ekstre kullanılarak DPPH • yöntemi ile antioksidan aktivitenin tayin edildiği bir çalışmada IC50 değeri 27,85 olarak bulunmuştur (Mazandarani, Ghafourian ve Khormali, 2014). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değere oranla daha iyi bir antioksidan etkiye sahiptir. Bunun çeşitli nedenleri olabilir. Bitkinin kimyasal kompozisyonu, mevsimsel veya yöresel farklılıklar, toplanma zamanı gibi durumlar aktivitedeki farklılığı açıklayabilir. Başka bir çalışmada ise metanollü ekstrenin IC50 değeri $86,67 \pm 1,59$ mg/l olarak bulunmuştur (Boudkhili, vd., 2011). Bu çalışmadakinden de daha yüksek antioksidan aktivite elde ettiğimiz sonucu çıkarılabilir.

Ekstrenin antioksidan kapasitesi fenolik bileşenlerin ve yoğunluğuna bağlanabilir. Fenolik maddeler radikal süpürücü etki göstermektedir bu nedenle fenoller çok önemli bitkisel maddelerdir. Toplam fenolik madde miktarı deneyi Folin-Ciocalteu yöntemi ile tayin edilmiştir. Sonuçlara göre en fazla fenolik madde bulunduran ekstre hekzandan elde edilen ekstredir. En az fenolik madde bulunduran ekstre ise etil asetatından elde edilen ekstredir. Al-Fartosy, 2011'in yaptığı bir çalışmada aynı yöntem ile çalışılmış ve metanolik ekstrenin total fenolik içeriğine bakılmış, sonuçlara yüzde cinsinden ifade edilmiştir. %1,63 mg/ml oranında gallik asite eşdeğer fenol içerik tayin edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç $132,67 \mu\text{g GAE}/100\text{g}$ 'dir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç daha düşüktür.

Toplam antioksidan statü tayini (TAS) deneyi sonucu elde edilen absorbanslara göre sonuçlar hesaplanmış ve mmol Trolox Equiv./L cinsinden ifade edilmiştir. Örnek içindeki antioksidan maddeler koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna dönüştürürler. 660 nm'de meydana gelen bu değişim örneğin antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Test geleneksel olarak stabil bir antioksidan standart çözeltisi ile

kalibre edilir ve E vitamini analogu olan Trolox eşdeğeri olarak adlandırılır. Literatür taramasında *Inula graveolens* antioksidan aktivitesinin toplam antioksidan statü tayini (TAS) deneyi yapılarak değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak 2'nin üzerindeki değerler oldukça iyi kabul edilmektedir. Sonuçlara bakıldığında en yüksek aktiviteyi hekzanlı ekstre göstermiş, sırasıyla etil asetat, metanol ve kloroform hekzanı izlemiştir.

Toplam oksidan statü tayini (TOS) deneyi sonucu elde edilen absorbanlara göre sonuçlar hesaplanmış ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv./L}$ olarak ifade edilmiştir. Örnekte bulunan oksidanlar demir içeren iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla okside ederler. Ferrik iyon asidik ortamda renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu numunede bulunan oksidan moleküllerin miktarı ile ilgilidir. Deney hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ifade edilir. Literatür taramasında *Inula graveolens* antioksidan aktivitesinin toplam oksidan statü (TOS) deneyi yapılarak değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak 5'in altındaki değerler oldukça iyi kabul edilmektedir. Sonuçlara bakıldığında tüm ekstreler için değerler 5'in altındadır.

Son zamanlarda sentetik antioksidanlardan ziyade doğal antioksidanların elde edilmesi ve kullanımının yaygınlaştırılması sağlanmaya çalışılmaktadır. Ayrıca mevcut antibiyotiklere gelişmiş olan direnç mekanizmaları nedeniyle yeni antibiyotik keşiflerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın konusunu oluşturan bitki geleneksel tedaviler kapsamında uzun yıllardır kullanılmakla beraber etkisi ve kimyasal özellikleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Çalışmamızla beraber bitki üzerinde çeşitli analizler ilk kez denenmiş, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları ile de etkinliği desteklenmeye çalışılmıştır. Bu nedenle yaptığımız çalışmanın literatüre katkı sağlamasını umuyoruz.

KAYNAKÇA

- Abu-Dahab, R., Afifi, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*, 75(121-136).
- Adnan, A. T. A. Ç. ve Yıldırım, R. V. Osmanlı Hekimleri ve Dioskorides'in " De Materia Medica" SI. *Osmanlı Tarihi Araştırma ve Uygulama Merkezi Dergisi OTAM*, 15(15), 257-269. 75(3), 121-146.
- Afshar, M. M., Sharifi, M., Abolghasemi, S. N. ve Mohammadi, N. (2015). Investigation Of Some Medicinal Secondary Metabolites And Antioxidants Of *Dittrichia Graveolens* L. Greuter. *Nova Biologica Reperta*, 2(2), 140-150.
- Aghel, N., Mahmoudabadi, A. Z., Darvishi, L. (2011). Volatile constituents and anticandida activity of the aerial parts essential oil of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter grown in Iran. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(6), 772-775.
- Akagün, G. (2009). Alabaş (*Brassica oleracea* var. *Gongylodes*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Al-Fartosy, A. J. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(6), 591-596.
- Al-Fartosy, A. J. (2013). Some pharmacological studies on the methanolic extract of *Inula graveolens* L. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6(11), 1040.
- Al-Snafi, A. E. (2018). Chemical constituents and pharmacological effect of *Inula graveolens* (Syn: *Dittrichia graveolens*)-A review. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 2183-2190.

- Arıkan, Ş., İpek, M. ve Pırlak, L. (2017). Antioksidan Sistemler. 1st International *Turkish World Engineering and Science Congress* 'de sunulan bildiri. Antalya.
- Aydemir, B., Sarı, E. K. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2(2), 56-60.
- Bacanlı, M., Taner, G., Başaran, A. A., ve Başaran, N. (2015). Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 4(1), 9-16.
- Bayram, E, Kirici, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kizil, S., Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ankara: TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 11-20.
- Berköz M, Yalın S (2009). Normal ve preeklampitik gebelerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 10: 52-58).
- Blainski, A., Lopes, G., & de Mello, J. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.
- Blanc, M. C., Muselli, A., Bradesi, P. ve Casanova, J. (2004). Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour and fragrance journal*, 19(4), 314-314.
- Boudkhili, M., Greche, H., Bousta, D., Farah, A., El Ouali Lalami, A., Aarab, L. (2011). Antioxidant Activities of Some Moroccan's Plants. *International Review of Chemical Engineering*, 3(5), 537-541.
- Boyraz, N., Özcan, M. (1997). Bitki patojeni funguslara bazı yerli baharat ekstrakt ve uçucu yağlarının antifungal etkileri. *Gıda*, 22(6).

- Brullo, S., De Marco, G. (2000). Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae). *Portugaliae Acta Biologica*, 19(1), 341-354.
- Büyük, İ., Soydam Aydın, S. ve Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği molekler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
- CLSI. (2006). Methods for diltion antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, M7-A7, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 26.
- CLSI. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement, M100-S17, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 27.
- Council of Europe. (2013 a). 8 th. Ed. Strasbourg: European Pharmacopeia. *Methods in pharmacognosy*, 273.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- elikyurt, G., Arıcı, M. (2008). *Gıda Koruyucusu Olarak Mikrobiyal Kaynaklı Organik Asitler ve nemi*. Türkiye, 10, 21-23.
- etin, E. S., zelik, N. (2007). Kanser Tedavisinde Kullanılan kse Otu (*Viscum Album*) Ekstraktının Apoptozis Mekanizması. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(4), 533-539.
- imen, M. B. Y. (1999). Flavonoidler ve antioksidan zellikleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19(5), 296-304.

- Davis, P. H. (1975). *Flora Of Turkey And The East Aegean Islands*, Vol. 5, Edinburgh Univ. Pres, Edinburgh.
- Dinçer Y ve Akçay T (2000). DNA Hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi* 25(2): 73-79.
- Dohi, S., Terasaki, M., Makino, M. (2009). Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4313-4318.
- Erdem, S., Eren, P. A. (2009). Tedavi Amacıyla Kullanılan Bitkiler ve Bitkisel Ürünlerin Yan Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 133.
- Erdoğan, A. E., Everest, A. (2013). Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 27-32. 182-18.
- Erdoğan, A.E. 2014 *Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Bitkilerin Uçucu Yağ İçeriklerinin Belirlenmesi, Antimikrobiyal ve Antimutajenik Aktivitelerinin Araştırılması*, Doktora Tezi. Mersin: Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- European Pharmacopeia, 2007, Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations, Council of Europe, France
- European Pharmacopoeia (2015). Council of Europe. *European Pharmacopeia*. 8 th. Ed. Strasbourg: Council of Europe. Methods in pharmacognosy. Strasbourg.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1), 52-67.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. (2013). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanım Olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 233-265.

- F.W. McLafferty, D.B. Stauffer, 1989. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, J Wiley and Sons: New York.
- Gençaslan, G. (2007). *Türkiyede tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkilerin antioksidan özelliklerinin taranması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi.
- Gencay, Ö. (2013). *Hypecoum procumbens L. bitkisinden alkaloidlerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) incelenmesi*. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Gökbulut, A. 2011 *Türkiye’de Yetişen Bazı Inula L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., Berti, L. (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 29(7), 873-879.
- Harzallah-Skhiri, F., Chéraif, I., Ben Jannet, H., Hammami, M. (2005). Chemical composition of essential oils from leaves-stems, flowers and roots of *Inula graveolens* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(2), 249-254.
- İşbilir, Ş. S. (2008). *Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi*. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Karan, T., Yildiz, I., Aydın, A., Erenler, R. (2018). Inhibition of Various Cancer Cells Proliferation of Bornyl Acetate and Essential Oil from *Inula graveolens* (Linnaeus) Desf. *Records of Natural Products*, 12(3), 273-283.

- Karou, D., Nadembega, W. M., Ouattara, L., Ilboudo, D. P., Canini, A., Nikiéma, J. B., Traore, A. S. (2007). African ethnopharmacology and new drug discovery. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 61-69.
- Kaur, R., Chahal, K. K. 2014 Chemistry And Biological Activity Of Some Alantoloids From *Inula* Species-A Review. *Pharmacophore* 5 (4): 536-551.
- Kasabri, V., Afifi, F. U., Abu-Dahab, R., Mashallah, S. (2017). Mitigating Efficacy of *Inula Graveolens* (L.) Desf. (Asteraceae) In Breast Adenocarcinoma MCF7 and T47D Proliferation: In Vitro Mechanistic Studies of A Selected Ethnomedicinal Plant from Jordan. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(6), 13044.
- Kılıç, A. (2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13), 37-45.
- Kılıç, O. (2014). Chemical composition of two *Inula* sp. (Asteraceae) species from Turkey. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 15-19.
- Kim, S. H., Lee, S. Y., Hong, C. Y., Gwak, K. S., Park, M. J., Smith, D. ve Choi, I. G. (2013). Whitening and antioxidant activities of bornyl acetate and nezukol fractionated from *Cryptomeria japonica* essential oil. *International journal of cosmetic science*, 35(5), 484-490.
- Koca, N., Karadeniz, F. (2005). Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *GIDA*, 30(4).
- Koyuncu, İ., Yıldırım, İ. ve Duranoğlu, S. (2008). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal özellikleri. *Türkiye*, 10, 913-916.
- Lamili, A., Lhaloui, S., Benjilali, B. ve Berrada, M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Research*, 71(1), 9-15.

- Mahboubi, M. (2011). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter essential oil. *Herba Polonica*, 57(3).
- Mazandarani, M., Ghafourian, M., Khormali, A. (2014). Ethnopharmacology, antibacterial and antioxidant activity of *Dittrichia graveolens* (L.) W. Greuter. which has been used as remedies antirheumatic, anti-inflammation and antiinfection against leishmaniasis in the traditional medicine of Gorgan, Iran. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, 1(4), 125-129.
- Mercan, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 91-96.
- Miladinović, D. L., Ilić, B. S., Kocić, B. D., Marković, M. S., Miladinović, L. C. (2016). In vitro trials of *Dittrichia graveolens* essential oil combined with antibiotics. *Natural Product Communications*, 11(6), 865-868.
- Omezzine, F., Daami-Remadi, M., Rinez, A., Ladhari, A., Haouala, R. (2011). In vitro assessment of *Inula* spp. organic extracts for their antifungal activity against some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 5(21), 3527-3531.
- Öztabak, K. Ö. (2005). Lektinler ve *Viscum Album* Aglütinin (VAA)'nın Antikarsinojen Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2(1), 55-59.
- Öztürk, R. (2002). Antimikrobiyal İlaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. *Akılci Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi* No: 31'de Sunulan Poster. Türkiye: İstanbul Üniversitesi.
- Rao, Y., Xiang, B. (2009). Determination of total ash and acid-insoluble ash of Chinese herbal medicine *Prunellae spica* by near infrared spectroscopy. *Yakugakuzasshi*, 129(7), 881-886.

- Sevindik, E., Paksoy, M. Y. Aydın/Türkiye’de Yayılış Gösteren *Dittrichia* L. (Asteraceae) Cinsinin Kimyasal Kompozisyonunun Değerlendirilmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 4(4), 456-460.
- Silinsin, M. (2016). *Inula graveolens* (L.) Desf. Bitki Türüne Ait Su ve Etanol Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitelerin Değişik In Vitro Metotlar ile Belirlenmesi. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Muş: Alparslan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O., ve Solujic-sukdolak, S. (2010). In vitro synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Archives of Biological Sciences*, 62 (1), 175-183.
- Sarışen, Ö., Çalışkan, D. (2005). Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat (!). *Sted*, 14(8).
- Seca, A. M., Grigore, A., Pinto, D. C. ve Silva, A. M. (2014). The genus *Inula* and their metabolites: from ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of ethnopharmacology*, 154(2), 286-310.
- Süslü, İ., Pehlivan, S., Müslim, E. K. N. İ. ve Şenel, E. (2010). Türkiye’nin çeşitli ballarına kaynak oluşturan compositae (Asteraceae) familyasında *Inula* türlerinin polen morfolojilerine istatistiksel bir yaklaşım. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 3(2), 182-187.
- Şeker, M., Çetin, Ö. (2013). *Inula tuzgoluensis* (Asteraceae), a new species from Central Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 37(5), 825-835.
- Şengün, İ. Y., Öztürk, B. (2018). Bitkisel Kaynaklı Bazı Doğal Antimikrobiyaller. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 7(2), 256-276.

- Tarhan, N., Arslan, M., Şar, S. (2016). Bazı Tıbbi Bitkiler ve Onlara Ait Mitoslar. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 6(1), 1-9.
- Temiz, A. (2000). *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri* III. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi.
- Topal, M., Şenel, G. U., Topal, E. I. A., Erdal, Ö. (2015). Antibiyotikler ve Kullanım Alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(3), 121-127.
- Topçu, G., Öksüz, S., Shieh, H. L., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Bozok-Johansson, C. (1993). Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry*, 33(2), 407-410.
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S. ve Viljoen, A.M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology*, 48 (4), 440-446.
- W.A. Koenig, D. Joulain, D.H. Hochmuth, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*. MassFinder 3, Hamburg, Germany, 2004.
- Waller, G. R. (2012). *Alkaloid biology and metabolism in plants*. Springer Science & Business Media. Oklohoma USA.
- Wu, X., Xiao, F., Zhang, Z., Li, X. ve Xu, Z. (2005). Research on the analgesic effect and mechanism of bornyl acetate in volatile oil from *Amomum villosum*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai. Journal of Chinese medicinal materials*, 28(6), 505-507.
- Yang, H., Zhao, R., Chen, H., Jia, P., Bao, L. ve Tang, H. (2014). Bornyl acetate has an anti-inflammatory effect in human chondrocytes via induction of IL-11. *IUBMB life*, 66(12), 854-859.

Yavaşer, R. (2011). *Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Yılmaz, F. Ö., Hunt, A. Ö. (2017). Organic Acids and Use in Aquaculture. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(8), 935-943.

Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Qian M (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J Agric Food Chem*. 50(6):1619-24.

http-1:<http://eds.a.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=1&sid=336a2c87-8fa6-49c0-ad4d-6f68d54eaf52%40sdc-v-sessmgr01&bdata=Jmxhbmc9dHlmc2l0ZT1lZHMtG12ZQ%3d%3d#AN=89551662&db=ers>

(Erişim tarihi: 04.05.2019)

http-2:<https://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Inula>).

(Erişim tarihi: 07.04.2019)

http-3: <file:///C:/Users/ASUS/Downloads/ca6702p110-168719.pdf>

(Erişim tarihi: 05.05.2019)

http-4:http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=4717

(Erişim tarihi: 22.06.2019)

http-5:https://www.daf.qld.gov.au/_data/assets/pdf_file/0018/58005/IPA-Dittricha-Graveolens-Risk-Assessment.pdf

(Erişim tarihi: 01.03.2019)

http-6:https://www.daf.qld.gov.au/_data/assets/pdf_file/0018/58005/IPA-Dittricha-Graveolens-Risk-Assessment.pdf

(Erişim tarihi: 17.05.2019)

http-7:<https://focusbio.com.au/products/borneol/>

(Erişim tarihi:12.07.2019)

http-8:https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bornyl_acetate_plain_structure.png

(Erişim tarihi:03.08.2019)

http-9:<http://www.floracatalana.net/inula-graveolens-l-desf->

(Erişim tarihi:11.06.2019)

http-10: <https://www.relassay.com/uploads/OxidativeGuideline.pdf>

(Erişim tarihi:08.08.2019)