

## Türkiye’de Yetişen *Campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata*’nın Enzim İnhibe Edici Etkilerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Fatma AYAZ\*

Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 25.11.2020

Kabul Tarihi/Accepted: 30.01.2021

### ORCID ID

 orcid.org/0000-0003-3994-6576

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: fatmaayaz88@hotmail.com

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de yetişen *Campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata*’nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının antioksidan ve enzim inhibe edici aktivitelerini araştırmaktır. Ekstrelerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri toplam fenol ve flavonoid miktar tayini, 2,2’-difenil-1-pikirlidrazil (DPPH), 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiyazolün-6-sulfonik asit) (ABTS), demir şelasyon ve  $\beta$ -Karoten/linoleik asit emülsiyon yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Ekstrelerin enzim inhibe edici aktivitelerinde ise, Alzheimer hastalığıyla ilişkili olan asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri; diyabet hastalığıyla ilişkili  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimleri; cilt beyazlatıcı olarak kozmetikte önemli bir yere sahip olan tirozinaz enzimi test edilmiş ve 96-kuyucuklu plaka yöntemi kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, *C. lyrata* subsp. *lyrata*’nın metanol ve su ekstraktlarının DPPH ve demir şelasyon aktivitesi dışında referans maddeyle karşılaştırılabilir düzeyde antioksidan aktivitelere sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, ekstraktların  $\alpha$ -amilaz ve tirozinaz enzimleri üzerinde daha belirgin aktivite gösterdikleri ve diğer enzimlere kıyasla daha fazla inhibe edici etkilere sahip oldukları gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamız, *C. lyrata* subsp. *lyrata* üzerinde aktiviteden sorumlu bileşiklerin araştırılmasına yönelik ilerideki çalışmalara katkı sağlayacak nitelik taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Campanula lyrata*, radikal süpürücü, tirozinaz, kolinesteraz,  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glukozidaz

## Determination of Enzyme Inhibition Effects and Antioxidant Activities of *Campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata* Grown in Turkey

**Abstract:** The aim of this study was to investigate on the antioxidant and enzyme inhibitory activities of methanol and water extracts obtained from aerial parts of *Campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata* grown in Turkey. *In vitro* antioxidant activities of the extracts were tested using total phenol and flavonoid content, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2’-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), iron chelation and  $\beta$ -Carotene/linoleic acid emulsion methods. As for the enzyme inhibitory activities of the extracts, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes associated with Alzheimer’s disease;  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes associated with diabetes; the tyrosinase enzyme which have an important role in cosmetics as skin whitening were tested, and the 96-well plate method were used. According to the results, it was detected that methanol and water extracts of *C. lyrata* subsp. *lyrata* have antioxidant activities as comparable with the reference compound except for DPPH and iron chelation activity. In addition, it was observed that the extracts showed more prominent activity on  $\alpha$ -amylase and tyrosinase enzymes, and had more inhibitory effects than other enzymes. As a result, our study has the quality to contribute to the further studies on *C. lyrata* subsp. *lyrata* for the investigation of the compounds responsible for the activity.

**Keywords:** *Campanula lyrata*, radical scavenger, tyrosinase, cholinesterase,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase

## 1. Giriş

Campanulaceae Jussieu familyası 84 cins ve yaklaşık 2400 bitki türünü bünyesinde barındırmaktadır. Bu familyanın en geniş cinsini oluşturan *Campanula* L. cinsi, dünyada çoğunlukla kuzey yarım kürenin ılıman ve subtropikal bölgelerinde ve Akdeniz bölgesinde yayılış göstermekte olup, yaklaşık 420 tür ile temsil edilmektedir (Lammers, 2007). Genellikle otsu olan ve gösterişli çiçeklere sahip olan bu cins, Türkiye’de çok sayıda tür içermesinin yanısıra endemizm oranının yüksek olması nedeniyle de önemlidir. Türkiye’de bu cinsin ait yaklaşık yarısı endemik olmak üzere 127 tür yetişmektedir (İkinci, 2012; Yıldırım, 2013; Yıldırım ve Şenol, 2014; Mutlu ve Karakuş, 2015). Türkiye ve Kafkasya dahil olmak üzere Doğu Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yetişen *Campanula* türlerinin genç yaprakları Türkiye’de Manisa yöresinde sebze olarak tüketilirken; İtalya’da ise bu türler salata veya çorba olarak başka bitkilerle karışım halinde gıda amaçlı tüketilmektedir (Roquet ve ark., 2009; Alcitepe, 2011; Guarrera ve Savo, 2016; Targan ve ark., 2018). *Campanula* türleri, tonsilit, larenjit ve bronşit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Roi, 1955). Türkiye’de “çan çiçeği” Türkçe ismi ile de bilinen *Campanula* türleri enflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gibi yara iyileştirici olarak da kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Ayrıca *Campanula* türlerinin uyarıcı, ferahlatıcı, antialerjik, antiflojistik, antioksidan, spazmolitik, antiviral, sitotoksik, antinosiseptif, antimikrobiyal ve emetik özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir (Benli ve ark., 2008; Dumlu ve ark., 2008; Park ve ark., 2010). *Campanula* türleri, polifenoller (flavonoit aglikonları ve onların glikozitleri, fenolik asitler ve onların esterleri, fenilpropanoit türevleri), steroidler, triterpenler ve poliasetilenler gibi çeşitli sekonder metabolitleri içermektedir (Dumlu ve ark., 2008; Cuendet ve ark., 2001; Yaylı ve ark., 2005; Tosun ve ark., 2011).

*Campanula* cinsi, Türkiye Florası’nda farklı morfolojik özelliklerine göre dokuz gruba (A, B, C, D, E, F, G, H ve I) ayrılmıştır (Damboldt, 1978). Grup A [Sect. *Quinqueloculares*] 11 tür ve alttürü içermekte olup, bunlardan 10’u Türkiye ve Yunanistan’da endemiktir (Damboldt, 1978; Davis ve ark., 1988; Güner ve ark., 2000). *C. lyrata* Lam. subsp. *lyrata* üzerinde yapılmış oldukça sınırlı sayıda botanik ve farmakognozok çalışma vardır. Bunlardan, bu türün tohum ve polen morfolojileri üzerine yapılan taksonomik değerlendirmelerin (Erkara ve ark., 2008; Alcitepe, 2010) yanısıra, antiinflamatuvar ve yara iyi edici etkilerinin, antioksidan ve antimikrobiyal (Benli ve ark., 2008; Suntar ve ark., 2015; Taskin ve Bitis, 2016)

aktivitelerinin ekstre düzeyinde incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstralarının, *in vitro* antioksidan aktivitelerinin ve çeşitli enzimleri inhibe edici etkilerinin incelenmesidir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan *Campanula lyrata* Lam. subsp. *lyrata* (çan çiçeği) Nisan ayında Antalya’nın batısında yer alan Yarıkpınar kanyonu lokasyonundan 2018 yılında toplanmıştır [Herbaryum No: 26914 (KNYA) 12.04.2018]. Bitkinin tür tayini Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayri DUMAN tarafından yapılmıştır. Gölgede kurutulduktan sonra ekstraksiyon için uygun hale getirmek amacıyla değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir.

### 2.2. Metanol ve sulu ekstraların hazırlanması

Toz haline getirilmiş 10 g bitki materyali, oda sıcaklığında 24 saat süreyle metanol ile iki kez maserasyona bırakılmıştır. Karışım kaba filtre kağıdından süzöldükten sonra, çözücüsü 40 °C’de vakum altında evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmış ve metanol ekstresi elde edilmiştir. Kalan bitki kısımları distile su ile iki kez tekrar maserasyon yöntemi ile ekstre edilmiştir. Süzöntüler evaporatör yardımıyla yoğunlaştırılarak etüvde kurutulmuş ve su ekstresi elde edilmiştir. Tüm ekstralar, deneyler yapılmaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

### 2.3. *In vitro* antioksidan aktivitelerin belirlenmesi

#### 2.3.1. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi

Ekstrelerin toplam fenolik bileşimi, Clarke ve ark. (2013) tarafından uygulanan Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her ekstrenin 10 µL (2 mg mL<sup>-1</sup>’si, 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (su ile on kez seyreltilmiş) ile karıştırılmıştır. 5 dakika reaksiyondan sonra, 100 µL sodyum karbonat (% 7.5) ilave edilmiştir. Karışım 60 dakika daha inkübe edildikten sonra, absorbansı 650 nm’de ölçülmüştür. Deneyler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Standart eğri, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 1-1000 µg mL<sup>-1</sup> gallik asit çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği, ekstrenin kuru ağırlığı başına gallik asit eşdeğeri [mg gallik asite eşdeğer (GAE) g<sup>-1</sup> kuru ekstre ağırlığı] olarak ifade edilmiştir.

### 2.3.2. Toplam flavonoit içeriğinin tespiti

Ekstredeki toplam flavonoit içeriğinin belirlenmesi için, Yang ve ark. (2011) tarafından bildirilen Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, Kersetin'in 1 mg mL<sup>-1</sup> stok çözeltisinden 0.0625 mg mL<sup>-1</sup>, 0.125 mg mL<sup>-1</sup>, 0.25 mg mL<sup>-1</sup>, 0.5 mg mL<sup>-1</sup> ve 1 mg mL<sup>-1</sup> seri çözeltileri hazırlanmıştır. Etanol ile hazırlanan test çözeltisi (150 µL, 0.3 mg mL<sup>-1</sup>) ile eşit hacimde % 2'lik AlCl<sub>3</sub> çözeltisi 96 kuyucuklu plaka üzerinde karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyondan sonra, absorbans 435 nm'de ölçülmüştür. Ekstrelerin toplam flavonoit içeriği, ekstrenin kuru ağırlığı başına kersetin eşdeğeri [mg kersetine eşdeğer (QE) g<sup>-1</sup> kuru ekstre ağırlığı] olarak hesaplanmıştır.

### 2.3.3. DPPH radikal süpürücü aktivite

Ekstrelerin 2,2'-difenil-1-pikirhidrazil (DPPH) radikal süpürücü potansiyeli Clarke ve ark. (2013)'nin yöntemiyle belirlenmiştir. DMSO ile seyreltmek üzere 20 µL test çözeltisi, 180 µL DPPH çözeltisi (metanol içerisinde 40 µg mL<sup>-1</sup>) ile 96 kuyucuklu plakada karıştırılmıştır. Plakalar 15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra, absorbansları mikropilaya okuyucu ile 540 nm'de ölçülmüştür. Test örneği yerine DMSO kör olarak; DMSO'da çözdürülmüş kersetin standart olmak üzere paralel olarak yürütülmüştür. Sonuçlar, Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmış, ekstrelerin DPPH radikal süpürücü etkileri (DPPH<sub>rse</sub>) % olarak ifade edilmiştir.

$$\text{DPPH}_{rse} = \left[ \frac{(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Kontrol absorbansı, test maddesini içermeyen tüm çözeltilerdir. Numune absorbansı ise, bitki ekstresi veya kersetin standartının absorbansıdır.

### 2.3.4. ABTS radikal süpürücü aktivite

Ekstrelerin 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit) (ABTS) süpürücü aktivitesini belirlemek için Re ve ark. (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Test örnekleri DPPH yönteminde olduğu gibi hazırlanmıştır. ABTS<sup>+</sup> radikali stok çözeltisi, 15 mL 7 mM ABTS ve 264 µL 140 mM potasyum persülfat çözeltisinin, oda sıcaklığında 16 saat boyunca karanlıkta bekletilmesiyle hazırlanmıştır. ABTS<sup>+</sup> radikali çalışma solüsyonu ise deneyden hemen önce stok çözeltisinden metanol ile seyreltilerek absorbansın 734 nm'de 0.70 ± 0.02 olmasını sağlayacak şekilde ayarlanmıştır. Numune çözeltisinden 50 µL alınarak 96 kuyucuklu plakada, 100 µL ABTS çalışma solüsyonu ile karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, absorbans 734 nm'de ölçülmüştür. Ekstrelerin ABTS süpürücü aktivitesi referans madde butiril hidroksi toluen

(BHT) ile karşılaştırılmıştır. ABTS radikal süpürücü aktivite (ABTS<sup>+</sup><sub>rse</sub>) Eşitlik 2'ye göre hesaplanmış ve % olarak ifade edilmiştir.

$$\text{ABTS}^+_{rse} = \left[ \frac{(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

### 2.3.5. Demir şelasyon aktivitesi

Ekstrelerin demir şelasyon aktivitesi, ferrozin-Fe<sup>2+</sup> kompleksinin oluşumu ve etkileşimleri ile belirlenmiştir (Chai ve ark., 2014). Kısaca, 200 µL 0,1 mM FeSO<sub>4</sub>, 200 µL bitki ekstresi ve 400 µL 0.2 mM ferrozin, bir test tüpünde karıştırılarak 25 °C'de reaksiyona bırakıldıktan sonra, karışımın absorbansı, 562 nm'de 10 dakikalık inkübasyondan sonra ölçülmüştür. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstrelerin demir şelasyon kapasitesi (DŞK, %) Eşitlik 3'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{DŞK} = \left[ \frac{(\text{A}_{\text{kontrol}} - \text{A}_{\text{test}})}{\text{A}_{\text{kontrol}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Eşitlikte A<sub>kontrol</sub>, test örneği olmayan tüpün absorbansı; A<sub>test</sub> ise test örneğinin absorbansını ifade etmektedir.

### 2.3.6. β-Karoten / linoleik asit emülsiyon yöntemi

Ekstreler, sentetik antioksidan troloks, 2 mg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda metanol içinde hazırlanmıştır. Dibi düz ağzı şilifli balona 0.4 mg β-karoten tartılarak, üzerine 2 mL kloroform eklenerek çözülmüştür. Kuvvetlice çalkalandıktan sonra kloroform 40 °C'de düşük vakumda evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır, sonra üzerine 40 mg linoleik asit, 400 mg Tween 80 ve 100 mL deiyonize su eklenerek kuvvetlice çalkalanmıştır. Kontrol solüsyonu için β-karoten içermeyen tüm bileşenler aynı prosedüre göre hazırlanmıştır. Trolox, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test tüplerine 200 µL bitki ekstresi, butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT) çözeltileri ve 4.8 mL β-karoten emülsiyon çözeltisi eklenmiştir. Karışım, su banyosunda 50 °C'de inkübe edilmiştir. Test tüplerinin ve kontrol çözeltisinin absorbansı, başlangıç (t<sub>0</sub>) ve 120. dakika (t<sub>120</sub>) için 470 nm'de okunmuştur. Absorbans değişim oranı ve dolayısıyla % oksidasyon inhibisyon katsayıları Eşitlik 4'e göre (Martins ve ark., 2015, Pires ve ark., 2016) hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left( \frac{a}{b} \right) \times 100 \quad (4)$$

Eşitlikte a, 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı; b, karışımın ilk absorbansını ifade etmektedir.

## 2.4. In vitro enzim inhibe edici aktiviteleri

### 2.4.1. Asetilkolinesteraz inhibisyon analizi

Ekstreler, Ellman metodunun hafif modifikasyonu ile asetilkolinesteraz enzimine karşı

test edilmiştir (Ellman ve ark., 1961). Kısaca, çeşitli konsantrasyonlardaki 20 µL bitki ekstresi, 140 µL 0.1 mM fosfat tamponu (pH= 6.8), ve 20µL asetilkolinesteraz (0.22 U mL<sup>-1</sup>) enzimi mikrolakaya eklendikten sonra karıştırılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Mikrolakaya 10 µL 3 mM 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ilave edildikten sonra, reaksiyon 10 µL 0.71 mM asetiltiyokolin iyodür eklenerek başlatılmıştır. Asetiltiyokolin hidrolizine bağlı olarak açığa çıkan tiyokolinin kromojenik DTNB ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı bileşiğin [5-tiyo-2-nitrobenzoat dianyon (TNB)] absorbanı 412 nm'de mikrolakaya okuyucu yardımıyla ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak galantamin; negatif kontrol olarak metanol kullanılmıştır.

#### 2.4.2. Butirilkolinesteraz inhibisyon analizi

Ekstrelerin butirilkolinesteraz enzimini inhibe edici aktiviteleri Ellman ve ark. (1961) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Analiz, asetilkolinesteraz inhibisyon yöntemiyle aynıdır. Ancak enzim olarak at serumu butirilkolinesteraz (0.22 U mL<sup>-1</sup>) ve substrat olarak butiriltiyokolin klorür kullanılmıştır. Aynı şekilde, reaksiyonun başlaması için karışıma 10 µL butiriltiyokolin klorür (0.22 mM) eklenmiştir. Ekstrelerin butirilkolinesteraz inhibitör etkisi, 412 nm'de spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir.

#### 2.4.3. α-Glukozidaz inhibisyon analizi

Ekstrelerin α-glukozidaz inhibitör aktivitelerini belirlemek için Telagari ve Hullatti (2015)'in uyguladığı 96 kuyucuklu plaka yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, substrat olarak p-nitrofenil α-D-glukopiranozit (PNPG) kullanılmıştır. Kısaca, 50 µL 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH= 6.8), 10 µL aynı fosfat tamponu içinde hazırlanmış α-glukozidaz (1 U mL<sup>-1</sup>, *Saccharomyces cerevisiae*, G5003-Sigma) çözeltisi ve 20 µL bitki ekstresi 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Plaka 15 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, her kuyucuğa 20 µL 5 mM PNPG eklenmiştir. Plaka 37 °C'de 20 dakika daha inkübe edilmiştir. Reaksiyon daha sonra NaCO<sub>3</sub> (50 µL, 0.1 mM) ilavesiyle sonlandırılmıştır. Absorbans 405 nm'de ölçülmüştür. Akarboz, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstrelerin α-glukozidaz inhibisyon yüzdesi Eşitlik 5'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (A_{\text{Örnekte}} - A_{\text{Örnekte-boş}}) / (A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Kör}})] \times 100 \quad (5)$$

Eşitlikte A<sub>Örnekte</sub>: enzim ve substrat içeren test numunesinin absorbanı; A<sub>Örnekte-boş</sub>, enzimsiz test

numunesinin ve substratın absorbanı; A<sub>Kontrol</sub>, substratın enzim ile absorbanı (örneksiz); A<sub>Kör</sub>, sadece substratı içeren reaksiyon sisteminin absorbanı ifade etmektedir.

#### 2.4.4. α-Amilaz inhibisyon analizi

Ekstrelerin α-amilaz inhibitör aktiviteleri, Özek (2018) tarafından bildirilen Caraway-Somogyi iodine/potasyum iyodür metodunun minör modifikasyonu uygulanarak değerlendirilmiştir. Domuz pankreatik amilaz (A3176, Sigma) enzimi deneyden önce 0.8 U mL<sup>-1</sup> konsantrasyonda olacak şekilde fosfat tamponu (20 mM, pH= 6.9) ile hazırlanmıştır. Substrat olarak taze hazırlanmış % 0.05 nişasta çözeltisi, pozitif kontrol olarak akarboz kullanılmıştır. Örnek-boş grubu, enzim çözeltisi dışında tüm reaktif maddeleri içermekte iken; kontrol grubu, numune çözeltisi yerine reaktif ve substrat içermektedir. 50 µL 20 mM fosfat tamponu (pH= 6.9), 50 µL 0.8 U mL<sup>-1</sup> pankreas amilaz enzim çözeltisi ve farklı konsantrasyonda ekstrelerin 25 µL'si 96 kuyucuklu bir plakaya eklenmiştir ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Sonra karışıma 50 µL nişasta çözeltisi eklenerek 10 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon HCl (25 µL, 1 M) ilavesiyle sonlandırılmıştır. Sonunda karışıma 100 µL sulu iyot (I<sub>2</sub>/KI) reaktifi eklenmiştir. Karışımın absorbanı 630 nm'de ölçülmüştür. Ekstrelerin α-amilaz inhibisyon yüzdesi, α-glukozidaz inhibisyon deneyinde verilen formüle göre hesaplanmıştır.

#### 2.4.5. Tirozinaz inhibisyon analizi

Ekstrelerin tirozinaz enzim inhibitör aktivitesi, Jeong ve ark. (2009)'nin tarif ettiği yöntemle yapılmıştır. Kısaca 100 µL 100 mM fosfat tamponu (pH= 6.8), 20 µL 250 U mL<sup>-1</sup> tirozinaz enzim çözeltisi ve 20 µL farklı konsantrasyondaki bitki ekstresi 96 kuyucuklu plakaya eklenmiş ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Substrat olarak 20 µL 3 mM L-dopa eklendikten sonra, oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra absorban mikrolakaya okuyucu ile 492 nm'de ölçülmüştür. Kojik asit, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon yüzdesi Eşitlik 6 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (A_a - A_b) / (A_c - A_d)] \times 100 \quad (6)$$

Eşitlikte A<sub>a</sub>, enzim içeren test numunesinin absorbanı; A<sub>b</sub>, enzim içermeyen test numunesinin absorbanı; A<sub>c</sub>, test numunesi içermeyen enzim solüsyonunun absorbanı; A<sub>d</sub>, hem test numunesi hem enzim içermeyen karışımın absorbanı ifade etmektedir.

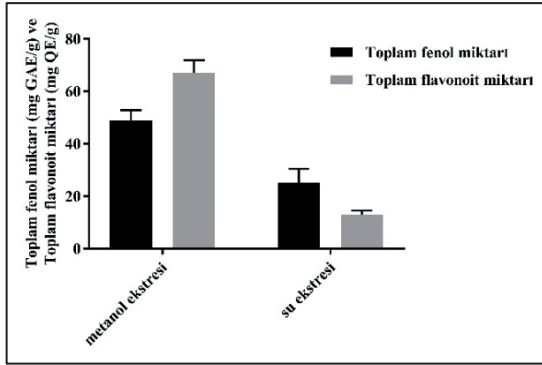


### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. *In vitro* antioksidan aktivite bulguları

##### 3.1.1. Toplam fenol ve flavonoid içeriği

*C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid miktarlarını belirlemek üzere kullanılan standartlar yardımıyla kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. Toplam fenol miktarları elde edilen  $Y = 0.003X + 0.0578$  ( $r^2 = 0.998$ ) denklemi kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak, toplam flavonoid miktarları ise elde edilen  $Y = 0.0059X + 0.0739$  ( $r^2 = 0.9971$ ) denklemi kullanılarak kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Bulgularımıza göre, metanol ekstresinin toplam flavonoid miktarı ( $67.02 \pm 4.71$  mg QE  $g^{-1}$ ) ve fenolik bileşik miktarı ( $48.97 \pm 3.77$  mg GAE  $g^{-1}$ ) sulu ekstreten daha fazla bulunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoid miktarları

##### 3.1.2. DPPH ve ABTS radikal süpürücü aktivitesi

*C. lyrata* subsp. *lyrata*'dan hazırlanan metanol ve su ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi 50, 100, 250, 500 ve 1000  $\mu g mL^{-1}$  konsantrasyonlarda çalışılarak tespit edilmiştir. Bitkinin metanol ekstresi en yüksek konsantrasyonda ( $35.44 \pm 1.17$ ), referans madde

kersetine ( $86.04 \pm 0.13$ ) göre daha düşük inhibisyon ile radikal süpürücü aktivite gösterirken, su ekstresine ( $4.56 \pm 0.17$ ) göre daha fazla aktif bulunmuştur. ABTS radikal süpürücü aktivite yöntemi de antioksidan aktivite belirlemede sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bulgularımıza göre, en yüksek konsantrasyonda *C. lyrata* subsp. *lyrata*'nın metanol ( $77.06 \pm 1.41$ ) ve su ( $74.75 \pm 4.48$ ) ekstraktlarının referans madde BHT ile karşılaştırıldığında neredeyse BHT ( $88.92 \pm 0.58$ ) ile yakın aktiviteler gösterdiği; metanol ekstresinin su ekstresine göre düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğu ve konsantrasyon arttıkça ABTS radikal süpürme aktivitesinin benzer değerlerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

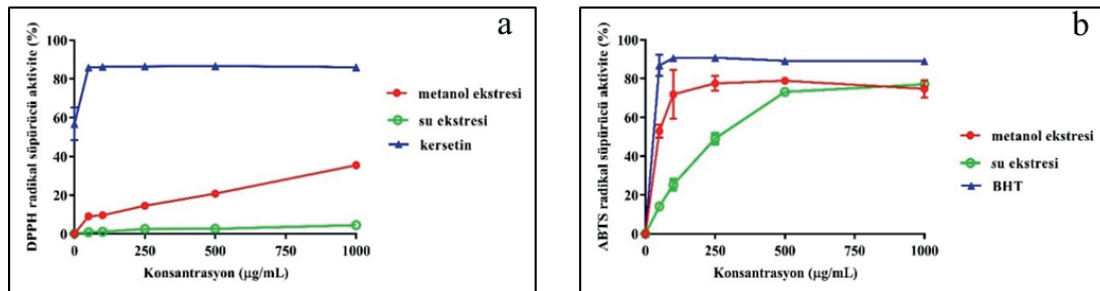
##### 3.1.3. Demir şelasyon aktivitesi ve $\beta$ -karoten/linoleik asit emülsiyon etkisi

Bulgularımıza göre, en yüksek konsantrasyonda *C. lyrata* subsp. *lyrata*'nın metanol ( $10.27 \pm 4.93$ ) ve su ( $10.91 \pm 5.09$ ) ekstraktlarının demir şelasyon aktivitesi birbirine yakın değerlerde bulunmuş olup, EDTA ( $92.03 \pm 0.57$ ) referans maddesine oranla daha düşük aktivitede tespit edilmiştir (Şekil 3).  $\beta$ -karoten/Linoleik asit yöntemi lipid peroksidasyonu inhibe edici özelliği gösteren bir yöntem olup, ortama hidrojen radikali vererek radikal degradasyonu sonlandıran antioksidanın tipini belirlemede önem taşımaktadır. Ayrıca lipidlerdeki singlet oksijeni süpürücü özelliğini tespit etmede fikir vermektedir. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının  $\beta$ -karoten/Linoleik asit emülsiyon etkisi grafiği Şekil 3'te verilmiştir. Bulgularımız değerlendirildiğinde, en yüksek konsantrasyonda su ve metanol ekstraktları troloks referans maddesiyle benzer etki göstermekle beraber, metanol ekstresi en yüksek aktivitede bulunmuştur (Şekil 3).

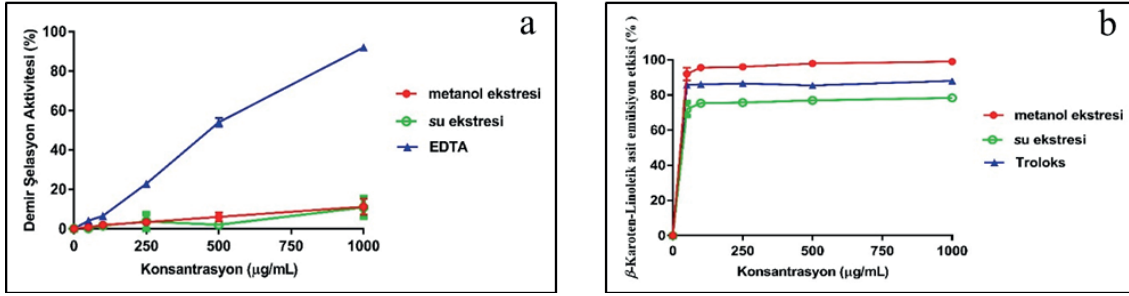
#### 3.2. *In vitro* enzim inhibe edici aktivite bulguları

##### 3.2.1. Anti-kolinesteraz inhibisyon

Ekstrelerin asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibe edici aktiviteleri



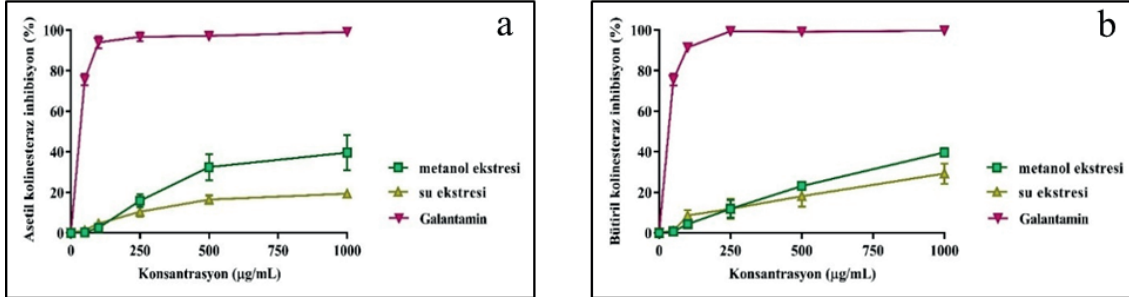
Şekil 2. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının DPPH (a) ve ABTS (b) radikal süpürücü aktiviteleri



Şekil 3. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstralarının demir şelasyon aktivitesi (a) ve  $\beta$ -karoten/linoleik asit emülsiyon etkisi (b)

Alzheimer tedavisinde kullanılan ilaç galantamin ile beraber Şekil 4'te verilmektedir. Asetilkolinesteraza karşı, metanol ve su ekstraları referans madde olan galantamine göre çok daha düşük aktivite gösterirken; en yüksek konsantrasyonda metanol ekstresi (%  $39.59 \pm 8.80$ ),

su ekstresinden (%  $19.37 \pm 1.48$ ) daha fazla etkili bulunmuştur. Butirikolinesteraz inhibe edici aktivitede ise, en yüksek konsantrasyonda metanol (%  $39.74 \pm 2.08$ ) ve su (%  $29.27 \pm 5.02$ ) ekstralarının her ikisi de benzer inhibisyon göstermektedir (Şekil 4).

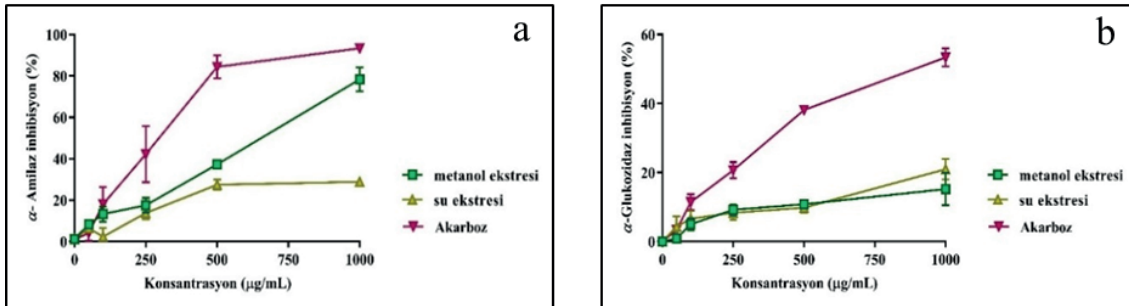


Şekil 4. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstralarının asetilkolinesteraz (a) ve butirikolinesteraz (b) inhibisyon aktivitesi

### 3.2.2. $\alpha$ -Amilaz ve $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon

*C. lyrata* subsp. *lyrata*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ve su ekstralarının potansiyel hipoglisemik aktivitesi, kan şekerinin kontrolünde kilit rol oynayan iki önemli enzim:  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon aktivitesi yardımıyla tespit edilmiştir. Her iki enzimi inhibe edici aktivite testinde akarboz referans madde olarak kullanılmış olup, ekstralarının

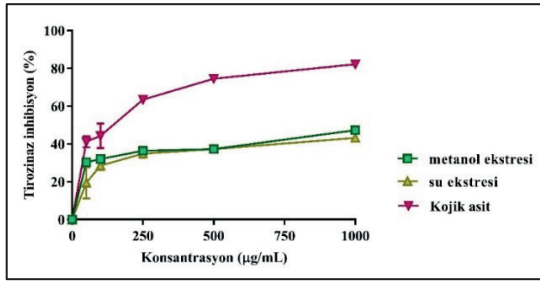
bu iki enzime karşı etkisi akarboz ile karşılaştırılmıştır (Şekil 5). Metanol ekstresi konsantrasyon artışına bağlı olarak akarboza yakın  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyon aktivitesi gösterirken; su ekstresi ise en yüksek konsantrasyonda bile % 30 civarında inhibisyon göstermektedir.  $\alpha$ -Glukozidaz inhibisyon aktivite testinde ise, metanol ve su ekstralarının akarboza göre çok daha düşük düzeyde enzim inhibe edici etkiye sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 5. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstralarının  $\alpha$ -amilaz (a) ve  $\alpha$ -glukozidaz (b) inhibisyon aktivitesi

### 3.2.3. Tirozinaz inhibisyonu

Tirozinaz enziminin inhibe edilmesi ciltte melanin birikiminin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle tirozinaz inhibitörleri melanin oluşumuna bağlı olarak gelişen pigmentasyon sorunlarında ve kozmetikte cilt beyazlatıcı özelliğinden dolayı önem kazanmıştır. Çalışmamızda kullanılan tirozinaz inhibisyon aktivitesi testinde, mantardan elde edilen tirozinazın mono-, ve difenolaz aktivitesini belirlemek için L-dopa substrat olarak, kojik asit ise referans olarak kullanılmıştır. Şekil 6'da görüldüğü gibi, *C. lyrata* subsp. *lyrata*'nın metanol ve su ekstraktlarının tirozinaz inhibisyon aktivitesi standart madde kojik aside göre düşük olsa da birbirine yakın düzeyde etkili oldukları görülmüştür.



Şekil 6. *C. lyrata* subsp. *lyrata* bitkisinden elde edilen metanol ve su ekstraktlarının tirozinaz inhibisyon aktivitesi

Literatüre bakıldığında, 2016 yılında Bursa'dan toplanan 8 yenilebilir bitki türlerinden çiçekli (yenilemez) ve taze (yenilebilir) evrelerinde *in vitro* antioksidan potansiyellerinin karşılaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada, tüm örnekler arasında *C. lyrata* bitkisinin etanol ekstresinin taze ve çiçekli evrelerinde sırasıyla  $68.67 \pm 0.12$  ve  $55.67 \pm 0.99$  mg GAE g<sup>-1</sup> ekstre olmak üzere en yüksek toplam fenol miktarına sahip olduğu bildirilmiştir. Bahsi geçen çalışmada, *C. lyrata* bitkisinin etanol ekstresinin taze ve çiçekli evresinde BHT (0.32 mg mL<sup>-1</sup>) ve askorbik asit (0.09 mg mL<sup>-1</sup>) maddelerine kıyasla yüksek DPPH (taze ve çiçekli evreler sırasıyla IC<sub>50</sub> = 1.07 ve 1.18 mg mL<sup>-1</sup>) süpürücü aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca bitkinin etanol ekstraktlarının sırasıyla ABTS radikal süpürücü (taze ve çiçekli evreler sırasıyla 1.83 ve 1.61 mM troloksa eşdeğer g<sup>-1</sup> ekstre) ve metal şelasyon (taze ve çiçekli evreler sırasıyla 2.86 ve 1.08 EDTA'ya eşdeğer g<sup>-1</sup> ekstre) aktiviteleri de gösterdiği rapor edilmiştir (Taskin ve Bitis, 2016).

Filistin florasında yetişen 15 farklı *Campanula* türü üzerinde yapılan antioksidan aktivite tayini çalışmasında, metanol ekstraktlarının standart madde troloksa (IC<sub>50</sub> = 1.91 µg mL<sup>-1</sup>) kıyasla DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılmış ve bir tür hariç

IC<sub>50</sub> değerleri 25 µg mL<sup>-1</sup>'dan daha az bulunmuştur (Jaradat ve Abualhasan, 2015).

Kore'de yapılan bir çalışmada, *C. takesimana* Nakai bitkisinden % 80 etanol ile hazırlanan ekstreten fraksiyonlama işlemi yapılarak n-hekzan, kloroform, etil asetat, n-butanol ve sulu ekstraktların antioksidan etkileri ve tirozinaz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Toplam fenol içeriği en yüksek tespit edilen ekstre 276.26 mg GAE g<sup>-1</sup> olarak etil asetat olmuştur. DPPH radikal süpürücü aktiviteleri bakımından askorbik asit (0.03 mg mL<sup>-1</sup>) maddesine kıyasla en yüksek aktivite etil asetat (0.13 mg mL<sup>-1</sup>) ekstresinde bulunmuştur. Benzer şekilde ABTS radikal süpürücü aktivitede yine etil asetat ekstresi % 98.96 aktivite ile askorbik asite (% 99.42) yakın değerlerde bulunmuştur. Süperoksit dismutaz benzeri aktivite olarak en yüksek aktivite sırasıyla % 70.56 ve 62.27 değerleriyle n-butanol ve etil asetat fraksiyonlarında tespit edilmiştir. Tirozinaz enzim inhibisyonunda ise, sırasıyla % 34.77 ve 30.85 değerleri ile n-butanol ve etil asetat fraksiyonlarında en yüksek aktivite bildirilmiştir (Kim ve ark., 2012).

Türkiye'de yetişen *C. alliariifolia* Willd. türü üzerinde yapılan bir çalışmada ise, metanol ekstresi ve bitkiden izole edilen 6 bileşiğin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri tespit edilmiş, izole edilen lobetiyol ve lobetiyolin maddelerinin sırasıyla % 85-98 ve 82-94; metanol ekstresinin ise % 75-93 değerleri ile en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. İndirgeme gücü bakımından ise, lobetiyol (% 85-92) ve lobetiyolin (% 80-89) maddeleri ile metanol ekstresinin (% 55-75) aktiviteleri en yüksek seviyede bulunmuştur (Dumlu ve ark., 2008). Türkiye'de yetişen *C. macrostachya* Waldst. & Kit. ex Willd. türünden hazırlanan etil asetat, metanol ve su ekstraktları ile yapılan bir başka çalışmada ise değişik yöntemlere göre antioksidan aktivite incelendiğinde; en yüksek aktivitenin metanol ekstresinde [DPPH: 4.15 mg mL<sup>-1</sup>, ABTS: 2.05 mg mL<sup>-1</sup>, bakır indirgeyici (CUPRAC): 1.80 mg mL<sup>-1</sup>, demir indirgeyici (FRAP): 0.83 mg mL<sup>-1</sup>, fosfomolibdan: 1.69 mg mL<sup>-1</sup>] ve su ekstresinde (demir şelatlama: 1.03 mg mL<sup>-1</sup>) olduğu tespit edilmiştir. Enzimlerden α-amilaz ve tirozinazı inhibe edici etki bakımından da sırasıyla etil asetat (2.54 mg mL<sup>-1</sup>) ve su (1.51 mg mL<sup>-1</sup>) ekstraktlarında en yüksek aktivite belirlenmiştir (Sarıkurkcu ve ark., 2021).

Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada ise, *C. latifolia* subsp. *latifolia* türünün n-hekzan, asetonitril, metanol ve su ile hazırlanan ekstraktları üzerinde DPPH, fosfomolibdan redükleyici (PRAP) ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan etkileri ile tirozinaz, asetilkolinesteraz ve α-glukozidaz

enzimlerinin inhibisyonu incelenmiştir. Antioksidan etkileri bakımından en yüksek aktivite asetonitril ekstresinde (DPPH: 266.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PRAP: 84.77  $\mu\text{M QE g}^{-1}$  ve FRAP: 124.02  $\mu\text{M BHA eşdeğer g}^{-1}$ ) tespit edilmiştir. Enzimlerin inhibisyonu üzerine en yüksek aktiviteler tirozinaz ve asetilkolinesteraz enzimleri için asetonitril ekstresinde (sırasıyla 53.41 ve 100.94  $\mu\text{g mL}^{-1}$ );  $\alpha$ -glukozidaz enzimi için su ekstresinde (30.42  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) bulunmuştur (Korkmaz ve ark., 2020).

#### 4. Sonuçlar

Son yıllarda doğal kaynakların biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi ve buna bağlı olarak etkiden sorumlu bileşiklerin veya yeni ilaç adayı moleküllerin elde edilmesi çalışmaları oldukça rağbet görmektedir. Biyolojik aktivitelerin başında kronik hastalıklardan özellikle Alzheimer, diyabet, tansiyon, kalp rahatsızlıkları, kanser vb. hastalıkların tedavisi için yapılan çalışmalar gelmektedir. Bu nedenle bu hastalıkların patolojisinde görev alan enzim, reseptör veya oksidatif strese bağlı faktörlerin etkili olmasından dolayı, bununla ilişkili enzim inhibe edici bileşenler ve doğal antioksidanların bulunması son derece önemlidir. Araştırma sonuçlarına göre, *C. lyrata* subsp. *lyrata*'nın metanol ve su ekstraktlarının antioksidan ve enzimleri inhibe edici aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu radikal süpürücü aktivitenin ekstraktların toplam polifenol ve flavonoid miktarları ile doğru orantılı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Metanol ekstresinin, su ekstresine kıyasla daha yüksek biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma, *C. lyrata* subsp. *lyrata* türünün biyoaktif doğal bileşiklerin geliştirilmesine yönelik olarak değerlendirilmesinin faydalı olabileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu çalışma bitkinin etkiden sorumlu biyoaktif bileşenlerinin aydınlatılmasına yönelik daha ileri çalışmalar için önemli bilimsel veriler sağlayacaktır.

#### Teşekkür

Araştırmada, deneysel çalışmaların gerçekleştirilmesinde uygun ortama sahip Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Fen Fakültesi alt yapısından yararlanılmıştır. Sayın Doç. Dr. Nuraniye ERUYGUR ve Prof. Dr. Hayri DUMAN hocalarımıza desteklerinden dolayı da çok teşekkür ederim.

#### Kaynaklar

Alcotepe, E., 2010. Studies on seed morphology of *Campanula* L. section *Quinqueloculares* (Boiss.)

- Phitos (Campanulaceae) in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 42(2): 1075-1082.
- Alcotepe, E., 2011. New combinations in *Campanula* sect. *Quinqueloculares* from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 43(5): 2243-2254.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi, Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Benli, M., Bingol, U., Geven, F., Guney, K., Yigit, N., 2008. An Investigation on the antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 7(1): 1-5.
- Chai, T., Mohan, M., Ong, H., Wong, F., 2014. Antioxidant, iron-chelating and anti-glucosidase activities of *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1): 67-72.
- Clarke, G., Ting, K.N., Wiart, C., Fry, J., 2013. High correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing activity potential and total phenolics content indicates redundancy in use of all three assays to screen for antioxidant activity of extracts of plants from the Malaysian rainforest. *Antioxidants*, 2(1): 1-10.
- Cuendet, M., Potterat, O., Hostettmann, K., 2001. Flavonoids and phenylpropanoid derivatives from *Campanula barbata*. *Phytochemistry*, 56(6): 631-636.
- Damboldt, J., 1978. Campanulaceae. P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh Univ Press, Edinburgh, pp. 2-89.
- Davis, P.H., Milli, R.R., Kit, T., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl.1). Edinburgh Univ Press, Vol. 10, Edinburgh.
- Dumlu, M.U., Gurkan, E., Tuzlaci, E., 2008. Chemical composition and antioxidant activity of *Campanula alliariifolia*. *Natural Product Research*, 22(6): 477-482.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2): 88-95.
- Erkara, I.P., Ocak, A., Pehlivan, S., 2008. Pollen morphology of some Turkish *Campanula* spp. and their taxonomic value. *Bangladesh Journal of Botany*, 37(1): 33-42.
- Guarrera, P.M., Savo, V., 2016. Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 185: 202-234.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl.2). Edinburgh Univ Press, Vol. 11, Edinburgh.
- İkinci, N., 2012. *Campanula* L. In: A. Guner, S. Aslan, T. Ekim, M. Vural, M.T. Babac (Eds.), *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul, Turkey: Flora Araştırmaları Derneği ve Nezahat Gökyağıt Botanik Bahçesi Yayını, s. 303-310.
- Jaradat, N.A., Abualhasan, M., 2015. Comparison in vitro of antioxidant activity between fifteen *Campanula* species (Bellflower) from Palestinian Flora. *Pharmacognosy Journal*, 7(5): 276-279.



- Jeong, S.H., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Baek, Y.S., Kang, J.E., Lee, W.S., Park, K.H., 2009. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4): 1195-1203.
- Kim, M.S., Kim, K.H., Yook, H.S., 2012. Antioxidative effects of *Campanula takesimana* Nakai extract. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(10): 1331-1337.
- Korkmaz, B., Fandakli, S., Barut, B., Yildirim, S., Sener, S. O., Ozturk, E., Terzioğlu, S., Yayli, N., 2020. Volatile and phenolic components and antioxidant, acetylcholinesterase, tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of extracts obtained from *Campanula latifolia* L. subsp. *latifolia*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5): 1118-1131.
- Lammers, T.G., 2007. Campanulaceae Jussieu. In: J.W. Kadereit, C. Jeffrey (Eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants VIII. Asterales*, Berlin and Heidelberg, Germany: Springer, pp. 26-57.
- Martins, N., Barros, L., Duenas, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C., 2015. Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties of *Glycyrrhiza glabra* L. rhizomes and roots. *RSC Advances*, 5(34): 26991-26997.
- Mutlu, B., Karakuş, Ş., 2015. A new species of *Campanula* (Campanulaceae) from Turkey. *Phytotaxa*, 234(3): 287-293.
- Özek, G., 2018. Chemical Diversity and Biological Potential of *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum* Essential Oils. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(2): 493-510.
- Park, S.H., Sim, Y.B., Lim, S.S., Kim, J.K., Lee, J.K., Suh, H.W., 2010. Antinociception effect and mechanisms of *Campanula punctata* extract in the mouse. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 14(5): 285-289.
- Pires, C., Martins, N., Carvalho, A.M., Barros, L., Ferreira, I.C., 2016. Phytopharmacologic preparations as predictors of plant bioactivity: A particular approach to *Echinacea purpurea* (L.) Moench antioxidant properties. *Nutrition*, 32(7-8): 834-839.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Roi, J., 1955. *Traite des Plantes Medicinales Chinoises*, Encyclopedie Biologique, Paris.
- Roquet, C., Sanmartín, I., Garcia-Jacas, N., Sáez, L., Susanna, A., Wikström, N., Aldasoro, J.J., 2009. Reconstructing the history of Campanulaceae with a Bayesian approach to molecular dating and dispersal–vicariance analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(3): 575-587.
- Sarikurkcü, C., Sarikurkcü, R.T., Tepe, B., 2021. *Campanula macrostachya*: biological activity and identification of phenolics using a liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry system. *Environmental Science and Pollution Research*, 11p.
- Suntar, İ., Akkol, E.K., Gonenc, T.M., Erdogan, T.F., Keles, H., Kivçak, B., 2015. Scientific assessment of the anti-inflammatory and wound healing potential of *Campanula lyrata* subsp. *lyrata*, a Turkish folk remedy. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2): 157-168.
- Targan, Ş., Yelboğa, E.G., Cittan, M., 2018. Macro and trace element contents of some wild plants consumed as vegetable in Manisa district, Turkey. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 5(2): 751-762.
- Taskin, T., Bitis, L., 2016. *In vitro* antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa province of Turkey. *Farmacia*, 64(5): 706-711.
- Telagari, M., Hullatti, K., 2015. *In-vitro*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Adiantum caudatum* Linn. and *Celosia argentea* Linn. extracts and fractions. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(4): 425-429.
- Tosun, G., Kahriman, N., Genç, H., Karaoglu, S.A., Yayli, N., 2011. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Campanula olympica* Boiss. *Asian Journal of Chemistry*, 23(6): 2389-2391.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., Li, X., 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*, 16(4): 3444-3455.
- Yayli, N., Yildirim, N., Doğan, N., Usta, A., Altun, L., 2005. Triterpenes from *Campanula lactiflora*: Note. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7(5): 771-775.
- Yıldırım, H., 2013. *Campanula mugeana* sp. nov. (Campanulaceae) from western Anatolia, Turkey. *The Nordic Journal of Botany*, 31(4): 419-425.
- Yıldırım, H., Şenol, S.G., 2014. *Campanula alisan-kilincii* (Campanulaceae), a new species from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish Journal Botany*, 38: 22-30.