

***Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* Ekstresinin Antioksidan, Antimikrobia, Tirozinaz İnhibitor Aktiviteleri ve RP-HPLC ile Fenolik Bileşiklerinin Araştırılması**

Investigation of Phenolic Compounds by RP-HPLC and Antioxidant, Antimicrobial, Tyrosinase Inhibitor Activities of Clinopodium vulgare L. subsp. vulgare Extract

Sıla Özlem ŞENER^{1,a}, Nuriye KORKMAZ^{2,b}, Şeyda AKKAYA^{2,c}, Merve BADEM^{2,d}, Rezzan ALİYAZICIOĞLU*^{2,e}, Ufuk ÖZGEN^{1,f}, Şengül ALPAY KARAOĞLU^{3,g}

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi A.B.D., 61080, Trabzon

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya A.B.D., 61080 Trabzon

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 53100 Rize

• Geliş tarihi / Received: 18.04.2017 • Düzeltilek geliş tarihi / Received in revised form: 01.02.2018 • Kabul tarihi / Accepted: 16.02.2018

Öz

Clinopodium vulgare L. subsp. *vulgare*, *Clinopodium* cinsine ve Lamiaceae familyasına mensup çok yıllık aromatik otsu bir bitkidir. Bu cins bitkiler sıklıkla geleneksel tedavide kullanılmaktadır. Farklı *Clinopodium* türlerinin farklı ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör etkilerini ve HPLC ile fenolik bileşenlerinin analizini konu alan çalışmalar olmasına rağmen, *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin bu özelliklerinin tümünü içeren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı *C. vulgare* subsp. *vulgare* metanol ekstresinin antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör aktivitelerini ve HPLC analizi ile fenolik madde içeriğini belirlemektir. Ekstrenin fenolik bileşenleri ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile belirlendi. Antioksidan, tirozinaz inhibitör aktivite spektrofotometrik yöntemlerle ve antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metodu ile incelendi. Ekstrenin toplam fenolik madde miktarı 27.9±0.4 mg gallik asit eşdeğeri/g numune, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi IC₅₀ değeri 0.114±0.0004 mg/mL ve ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) değeri 1556±3 µM troloks eşdeğeri/g numune olarak hesaplandı. Tirozinaz inhibisyon çalışma sonucuna göre ekstrenin IC₅₀ değeri kojik asit standardından yüksek bulundu. HPLC ile analiz sonucunda protokatekuik asit, klorojenik asit, vanilin, sinapik asit ve benzoik asit tespit edildi. Ekstre, asid-hızlı bakteri (*M. smegmatis*), bazı gram pozitif (*S. aureus* ve *B. cereus*) ve bazı gram negatif (*Y. pseudotuberculosis*) bakterilere karşı ılımlı antibakteriyal aktivite gösterdi. Ancak *C. albicans* and *S. cerevisiae* türlerine karşı hiçbir antifungal aktivite göstermedi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *C. vulgare* subsp. *vulgare* yeni farmasotiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Antioksidanlar, Antimikrobiyal, HPLC, Tirozinaz İnhibitor Aktivite

Abstract

Clinopodium vulgare L. subsp. *vulgare* is a perennial aromatic herbaceous plant belonging to *Clinopodium* genus and Lamiaceae family. This genus plants are often used in traditional therapy. There are no studies involving the whole of these properties of the *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* extract, although there are studies about antioxidant, antimicrobial, tyrosinase inhibitor effects and analysis of phenolic compounds by HPLC of different extracts of different *Clinopodium* genus. The purpose of this study was to determine the phenolic composition by HPLC, and antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitor activity of methanolic extract of *C. vulgare* subsp. *vulgare*. The phenolic compounds were determined by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The antioxidant, tyrosinase inhibitor, and antimicrobial activities of the extract were examined by spectrophotometric methods, and disc diffusion method, respectively. The total phenolic content (TPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH), and ferric reducing antioxidant power (FRAP) values of the extract were found 27.9±0.4 mg gallic acid equivalents per g sample, 0.114±0.0004 mg/mL, and 1556±3 µM trolox equivalents per g sample, respectively. IC₅₀ value of the extract according to the tyrosinase inhibition study results was found higher than kojic acid standard. The protocatechuic acid, chlorogenic acid, vanillin, sinapic acid, benzoic acid were detected by HPLC analysis. The extract exhibited while moderate antibacterial activity against an acid-fast bacterium (*M. smegmatis*), some gram positive (*S. aureus* and *B. cereus*) and gram negative (*Y. pseudotuberculosis*) bacteria. But, antifungal activity was not showed against *C. albicans* and *S. cerevisiae* species. According to the results of this study, *C. vulgare* subsp. *vulgare* can be considered as a potential source for developing new pharmaceuticals.

Keywords: Antioxidants, Antimicrobial, HPLC, Tyrosinase inhibition

* Rezzan ALİYAZICIOĞLU; rezzanaoglu@mynet.com; Tel: (0462) 377 88 19; orcid.org/0000-0003-0143-8795

^a orcid.org/0000-0001-7679-7165

^b orcid.org/0000-0003-3370-4787

^c orcid.org/0000-0001-7261-7067

^d orcid.org/0000-0002-1265-5616

^f orcid.org/0000-0001-9839-6717

^g orcid.org/0000-0003-1047-8350

1. Giriş

Tıbbi bitkiler halk ilacı olarak ilk çağlardan günümüze kadar yaygın olarak kullanılmaktadır. (Tosun vd., 2016). Bitkilerin birkaç etkiye birden sahip olması, uzun yıllardır kullanımı sonucunda yan etkilerinin bilinmesi, sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahip olması, bitkiye ulaşımın kolay olması ve tedavide kullanım formunun kolay hazırlanması gibi nedenlerden dolayı bitkiye ilgi her zaman yoğun olmaktadır (Birinci, 2008). Bitkilerden modern ilaç formları kullanılarak preparatlar hazırlanmakta ve bu preparatlara günümüzde farklı ülkelerde bitkisel, bitkisel ilaçlar, fitofarmasötikler, fitoterapötikler ve geleneksel ilaçlar gibi farklı isimler verilmektedir. (Erugur, 2014). Doğal florada bulunan bitkiler halk arasında ilaç, boya, baharat ve gıda olarak da kullanımı uzun yıllardan beri süren bir kültür zenginliğimiz olmuştur (Çelikel, 2015).

Clinopodium vulgare cinsi *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ve *Clinopodium vulgare* subsp. *arundanum* olmak üzere iki alt türe ayrılmıştır (Kokdil, 1998). *Clinopodium vulgare* Lamiaceae familyasına ait çok yıllık aromatik otsu bir bitkidir. Kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yaklaşık 2000-2500 m yükseklikte doğal olarak yetişmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda bitkinin etanol ve propilen glikol ekstresinin antitümoral (Dzhambazov vd., 2002) ve antibakteriyel etkisinin (Opalchenova ve Obreshkova, 1999) olduğu belirtilmiştir. *Clinopodium* cinsine ait bazı türlerle ilgili yapılan çalışmalarda *Clinopodium bolivianum* bitkisinin anti-enflamatuvar etkisinin (Soumitra vd., 2017), *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* bitkisinin DPPH radikalini süpürücü etkisinin (Turner, 2008; Villa-Ruano vd., 2013) olduğu, *C. macrostemum* var. *macrostemum* ise antioksidan, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkili olduğu bulunmuştur (Perez, 2013).

Sağlıklı ve zinde bir yaşam sürdürebilmenin arka planında hem hücrel ve hem de organizmanın oksidan-antioksidan dengesi öne çıkmaktadır. Serbest radikal oluşumundaki artışa veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişmektedir. Serbest radikaller yiyeceklerde lipid peroksidasyonuna neden olmakta, bu da yiyeceklerin bozulmasına yol açmaktadır. Reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot türleri DNA hasarına da neden olabilmekte ve mutasyon meydana gelebilmektedir. Buna ek olarak reaktif oksijen ve reaktif azot türleri sıtma, kalp hastalıkları, ateroskleroz, diyabet ve kanser

gibi birçok hastalığa yol açmaktadırlar. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı sağlıklı bir yaşam için antioksidanları gerekli kılmaktadır (Cao vd., 1999). Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidanların bulunması için yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır ve bu alanda yapılan araştırmalar artmaktadır.

Bitkilerin antimikrobiyal bileşikleri genellikle esansiyel yağ kısmında bulunmaktadır. Bu bileşikler bitkinin karakteristik aromasından sorumludurlar ve genellikle bitkilerden su buharı distilasyonu ile elde edilirler. Antimikrobiyal aktivite; bitkinin türüne, kompozisyonuna ve konsantrasyonuna, hedef mikroorganizmanın türüne ve yüküne, gıdanın kompozisyonuna, işleme ve depolama koşullarına bağlıdır. Proteinler, lipitler, tuzlar, pH ve sıcaklık fenolik maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini etkileyen faktörlerdir (Sağdıç, 2003). Bitkinin antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak inhibisyon analizleri yapılmıştır.

Tirozinaz, melanin biyosentezinin özellikle ilk basamağında L-tirozinin L-dopakinon ve L-dopakrom'a dönüşümünden sorumlu bir enzimdir. Tirozinaz memelilerde, omurgasızlarda, bitkilerde, mikroorganizmalarda bulunur ve bu yapılarda birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Soliver-Rivas vd., 1999). Polifenoller enzim inhibitörleri arasında en yaygın olanlarıdır. Özellikle flavanoidler (stilbenler, kalkonlar, izoflavonoidler, izoflavonlar), uzun zincirli lipitler, steroidler bilinen inhibitörlerdir. Kojik asit tirozinazın en çok çalışılmış inhibitörüdür, aynı zamanda kozmetik alanında cilt beyazlatıcı ve gıda endüstrisinde enzimatik kararmayı önleyici gıda katkıları olarak kullanılmaktadır (Chen vd., 1991). Birçok bitkinin yaprak, tohum çiçek ve kabuklarında yaygın olarak buldukları için tirozinaz enzim aktivitesinin incelenmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyada halk ilacı olarak kullanılan *C. vulgare* L. subsp. *vulgare* metanol ekstresinin çeşitli metodlarla antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör aktivitelerinin ve fenolik bileşenlerin belirlenmesi ve yeni farmasötiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir kaynak olarak kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

2.1.1. Bitkisel Materyalin Temini

C. vulgare L. subsp. *vulgare* 2014 yılının Mayıs ayında Sinop ilinden toplandı. Bitkinin botanik tanımlanması Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Prof. Dr. Ufuk Özgen tarafından yapıldı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde AEF 26697 herbaryum numarası ile saklandı.

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit, hidrojen klorür Merck (Darmstadt, Germany) firmasından; folin reaktifi, metanol, 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), demir (III) klorür, sodyum asetat, troloks, 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil hidrat (DPPH), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), gallik asit, protokatekuik asit, protokatekul aldehyd, p-hidroksi benzoik asit, klorogenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiring aldehyd,, p-kumarik asit, ferulik asit, tirozinaz, L-dopa, kojik asit ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi (St. Louis, MO, USA).

2.1.3. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Çalışmamızda HPLC (Agilent 1100, DAD 1200 Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) cihazı, UV-VIS spektrofotometre (Spectro UV-VIS Double PC-8 auto cell, Labomed), rotary evaporator sistemi (IKA®, Werke, USA), çalkalayıcı (Heidolph Promax 2020), pH metre (Hanna pH 213, Romania), magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Germany), su banyosu (Nüve, ST 402) kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Ekstraksiyon

Bitki numunesi toplanarak gölgede kurutuldu ve kurutulan kısımlar değirmen yardımıyla toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki numunesinin konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde metanol ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi 24 saat boyunca 30 °C'de ısıtıcı karıştırıcıda yapıldı. Biyolojik aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere bitki ekstresi 0-4 °C saklandı.

2.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Metanolik bitki ekstresinin toplam fenolik madde tayini Slinkard ve Singleton metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi (Slinkard ve

Singleton, 1977). İlk olarak, deney tüplerine bitki ekstresinden (10 mg/mL) 50 µL ve standart olarak gallik asitten (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) 50'şer µL pipetlendi. Ardından her bir tüpe 2.5 mL saf su ve 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (1:10 saf su ile seyreltilmiş) eklendi. Tüm tüpler vortekslendikten sonra, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm tüplere 750 µL % 7.5'lik Na₂CO₃ eklendi ve vortekslendi. Karışımlar oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve 765 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Toplam fenolik madde miktarı gram numune başına mg gallik asit eşdeğeri olarak verildi.

2.2.3. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

2.2.3.1. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi Blois'in metoduna göre yapıldı (Blois, 1958). Metanolik bitki ekstresinin (100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL) ve bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) standardın (0.01, 0.005, 0.025, 0.0125, 0.00625 mg/mL) farklı konsantrasyonları hazırlandı. DPPH çözeltisi ise 100 µM olacak şekilde metanolde çözülerek hazırlandı. 750 µL DPPH çözeltisi, 750 µL metanolik bitki ekstresi çözeltileri üzerine eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 50 dakika inkübe edildi. 517 nm'de absorbanslar spektrofotometrik olarak okundu. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi ve IC₅₀ değerleri (mg/mL) hesaplandı. Bu çalışmada standart olarak kullanılan BHT için aynı işlemler uygulandı.

2.2.3.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

Ferrik indirgeyici gücün belirlenmesi için Benzie ve Strain'in geliştirdiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı (Benzie ve Strain, 1999). FRAP reaktifi 2.5 mL, 300 mM (pH:3.6) asetat tamponu ile 40 mM HCl ile hazırlanan 0.25 mL, 10 mM TPTZ ve 0.25 mL, 20 mM demir (III) klorür çözeltileri karıştırılarak hazırlandı. Tüplere test numunesinden 50 µL (100 µg/mL) ve 1.5 mL FRAP reaktifi eklenerek vortekslendi. 30 dakika inkübasyondan sonra 593 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. FRAP değeri gram numune başına µM troloks eşdeğeri olarak verildi.

2.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite tayinleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı (Woods vd., 2003). Çalışmamızda kullanılan test

mikroorganizmaları şunlardır: *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis* bakterileri, *Candida albicans* mantarı ve *Saccharomyces cerevisiae* mayası.

2.2.4.1. Agar kuyucuk difüzyon metodu

Test edilecek bakterilerin bir gecelik kültürlerinden, sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak 10^6 kob/mL şeklinde dilüsyonlar hazırlanarak katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapıldı. Ardından, steril cam boru ile besiyerleri üzerinde 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Ekstrenin 1 mL'de hazırlanmış stok çözeltilerden her bir kuyucuğa 50 µL damlatıldı. İnkübasyon işlemi bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat olacak şekilde 36 °C'de petrielerde yapıldı ve inhibisyon zonları bir cetvel yardımı ile ölçüldü. Standard kontrol ilaç olarak bakteriler için Ampisilin (10 µg), mayalar için flukonazol (5 µg), *M. smegmatis* için Streptomycin ve standart çözücü kontrolü olarak metanol kullanıldı.

2.2.5. Tirozinaz Enzim Aktivitesi Yöntemi

Metanolik bitki ekstresinin tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi standart olarak kojik asit kullanılarak Masuda yöntemine göre belirlendi (Masuda vd., 2005). 100 µL fosfat tamponu (pH 6.8) 96 kuyucuklu mikropalakaya aktarılarak üzerine 25, 50, 100, 500 µL bitki ekstraları ve 40 µL tirozinaz çözeltilerinden eklendi. Oluşan karışım 25°C'de 15 dakika inkübe edildi ve 40 µL L-dopa ile muamele edildi. Ayrıca, tirozinaz enzim çözeltileri olmadan hazırlanmış tepkime reaktiflerine bitki ekstresinden ilave edilerek kör çözeltileri hazırlandı. Absorbansları 10 dakikalık inkübasyonun ardından 492 nm'de okundu. Körlerin absorbansları bitki ekstresinden çıkarılarak gerçek absorbanslar elde edildi ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.6. HPLC

Gallik asit, protokatekuik asit, protokatekul aldehit, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asit standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerdir. İlk olarak, her standartı içeren stok çözeltileri 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı ve 0.45 µm membran filtreden geçirildi. Stok çözeltileri, 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltilerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Fenolik bileşiklerin HPLC analizi [A: 2% asetik asit: su; B: 0.5%

asetik asit asetonitril: su (1:1)], bir HPLC sistemi (Shimadzu Corporation, LC 20AT, Kyoto, Japonya) üzerinde 1.2 mL/dakika sabit bir çözücü akış oranında bir ters faz kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlendi. Sinyaller; 232, 246, 260, 270, 280, 290, 308 ve 328 nm'de, oda sıcaklığında DAD dedektörü kullanılarak kaydedildi. Aliyazicioglu vd. (2017) metoduna göre uygulanan çözücü gradientleri şu şekildedir: %5 çözücü B ve %95 çözücü A (gradient uygulanmayan çözücü) oranlarında başlanan gradient 41. dakikaya kadar belirli oranlarda çözücü B (% 65) gradienti artırılarak devam edildi. 270 nm ve 340 nm'de kromatogramlar incelenerek fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı.

3. Bulgular ve Tartışma

ROS, yaşayan normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak yaşamını sürdüren organizmalar tarafından üretilmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Miktarları düşük ya da orta düzeyde olduklarında fizyolojik olarak işlev görüp organizmaya zarar vermemektedirler; fakat düzeyleri arttığında DNA, protein, lipit gibi hücre bileşenleri üzerinde yan etki oluşturmaktadırlar (Valko vd., 2006; Marnett, 1999). Oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar yönüne kayması ile 'oksidatif stres' oluşmaktadır. Oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar (Lyras vd., 1997; Sayre vd., 2001), ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi/perfüzyon (Dhalla vd., 2000; Kasparova vd., 2005), diyabet, çeşitli akciğer hastalıkları (pulmoner rahatsızlıklar, kronik obstrüktif akciğer hastalığı) (Asami vd., 1997) gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır. Çalışmamızda antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan *in vitro* yöntemlerden toplam fenolik madde miktarının belirlenmesine dayanan Folin yöntemi, ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali temizleme yöntemleri (Lu vd., 2011) kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Yapılan literatür taramalarına göre, *C. vulgare* L. subsp. *vulgare*'nin antioksidan aktivitesi ile ilgili Tepe vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, *C. vulgare* uçucu yağının antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi ile değerlendirilmiştir. Bu rapora göre, uçucu yağ fraksiyonunun serbest radikal temizleme potansiyeli 63.0 µg/mL (IC_{50}) olarak tespit edilmiştir. Villa-Ruano vd. (2013) *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* ile yaptığı bir

çalışmada DPPH yöntemine göre IC₅₀ değerini 0.92–1.46 g/L olarak rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada *C. vulgare* aseton, metanol ve su ekstralarının total fenolik içeriği sonuçlarına baktığımızda en yüksek değer metanol ekstresinde (44.4 ± 1.75 mg GAE/g ekstre) olduğu, DPPH sonuçlarına baktığımızda ise en yüksek değer su ekstresinde (82.56 ± 1.64 mg TE/g ekstre) olduğu bulunmuştur (Sarıkurkcu vd., 2015). Çalışmamızda elde edilen antioksidan aktivite değerlerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Kullanılan bitkinin yetiştiği toprak içeriğinin, bitkinin toplandığı bölgenin iklimsel özelliklerinin, kullanılan çözücü türünün

farklı olmasından dolayı farklılıkların görülebileceği düşünülmektedir. Mevcut çalışmada *C. vulgare* L. subsp. *vulgare*'nin metanol ekstresinde gallik asit, protokatekuik asit, protokatekul aldehit, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asiti içeren 13 fenolik bileşenin varlığı (Şekil 1) ve miktarları araştırılmış, elde edilen bulgular Tablo 2'de verilmiştir. Bu verilere göre araştırılan ekstre bileşiminde bu bileşenlerden protokatekuik asit, klorojenik asit, vanilin, sinapik asit ve benzoik asit bulunmuştur (Şekil 2).

Tablo 1. *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin antioksidan aktivitesi

Test bileşikleri	TPC ¹	FRAP ²	DPPH ³
Ekstre	27.9 ± 0.4	1556 ± 3	0.114 ± 0.0004
BHT			0.009 ± 0.0001

¹Total fenolik içeriği (TPC) değeri (mg gallik asit eşdeğeri/gram), ²FRAP değeri (µM troluks eşdeğeri/gram), ³DPPH IC₅₀ değeri (mg/mL).

Tablo 2. *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinde bulunan fenolik bileşikler

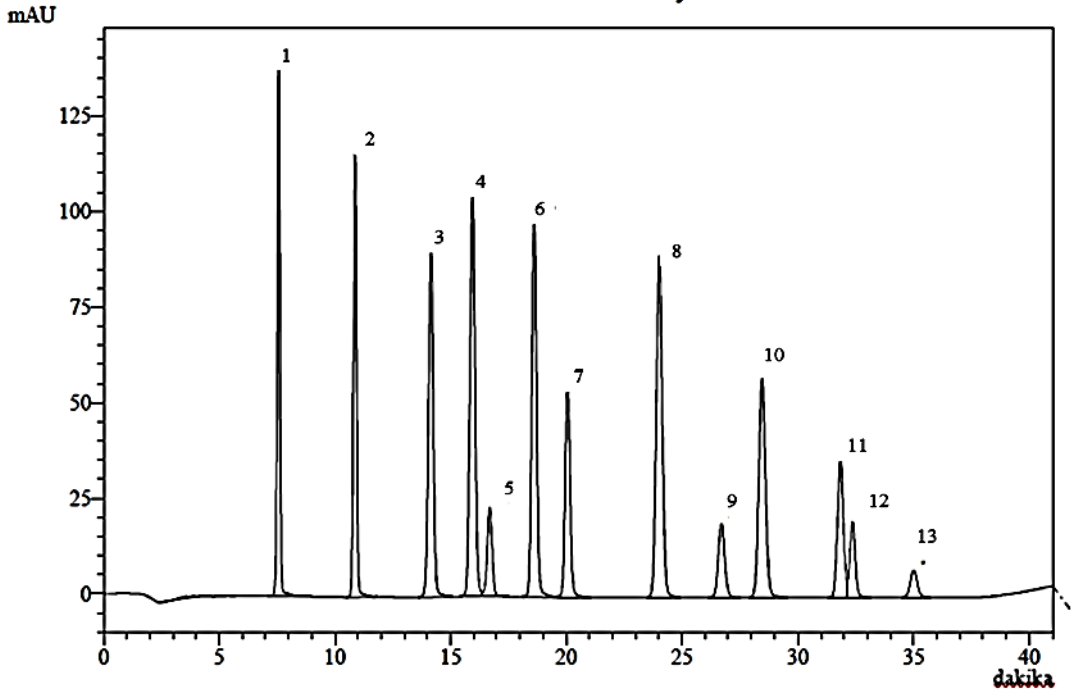
Bileşik	Alınma zamanı	Alan	Konsantrasyon (mg/L)
1 Gallik asit	-	-	-
2 Protokatekuik asit	10.457	23114	0.918
3 Protokatekul aldehit	-	-	-
4 <i>p</i> -hidroksi benzoik asit	-	-	-
5 Klorojenik asit	17.089	15104	1.508
6 Vanilik asit	-	-	-
7 Kafeik asit	-	-	-
8 Vanilin	23.944	61602	1.323
9 Şiringaldehit	-	-	-
10 <i>p</i> -kumarik asit	-	-	-
11 Ferulik asit	-	-	-
12 Sinapik asit	32.410	87663	6.726
13 Benzoik asit	34.416	198778	32.079

Sarıkurkcu vd. (2015)'nin yaptığı çalışmada *C. vulgare*'nin metanol ekstresinde protokatekuik asit, (+)-kateşin, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, (-)-epikateşin, ferulik asit, benzoik asit, rutin, rosmarinik asit, apigenin tespit edilmiştir.

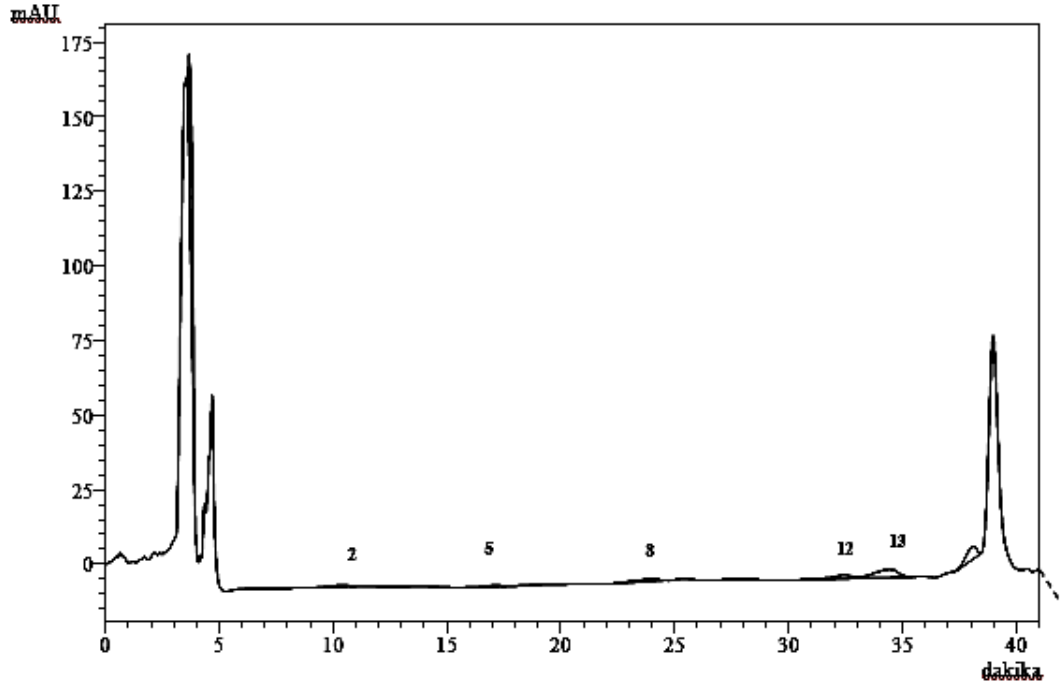
Fenolik bileşikler antioksidan etkili olduklarından bitkisel ağırlıklı beslenme ile bu bileşiklerin alımı vücutta radikal oluşumunu azaltarak kanser, damar hastalıkları gibi hastalıkların riskini düşürmektedirler. (Halliwell, 2007). Bitkinin

fenolik içeriğinin yüksek çıkması çeşitli hastalıkların tedavisinde bu bitkinin ilaç hammaddeleri kaynağı oluşumuna katkısı bakımından önem arz etmektedir.

Mikroorganizmaların gelişmesini durdurabilen veya onları öldürebilecek ajanlara antimikrobiyal maddeler adı verilmektedir. Son yıllarda, antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların giderek artış göstermesi ile bu mikropların neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaşmaktadır.



Şekil 1. Standart RP-HPLC kromatogramı. Pikler: (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) protokatekul aldehid, (4) *p*-hidroksi benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanilik asit, (7) kafeik asit, (8) vanilin, (9) şiringaldehid, (10) *p*-kumarik asit, (11) ferulik asit, (12) sinapik asit, (13) benzoik asit.



Şekil 2. *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* HPLC kromatogramı. Pikler: (2) protokatekuik asit, (5) klorojenik asit, (8) vanilin, (12) sinapik asit, (13) benzoik asit.

Ayrıca antibiyotiklere direnç geliştiren bakterilerin varlığı, ilaç dirençliliğini artırmaktadır. Bu nedenler göz önüne alındığında, ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılmasına ihtiyaç da artmaktadır (Yarnell ve Abascal, 2004). Bu amaçla, çalışmamızda *C.*

vulgare L. subsp. *vulgare*'nin antimikrobiyal aktivitesi incelendi. Çalışılan mikroorganizmalar arasında bu bitkinin, en iyi etkisinin akciğer enfeksiyonu etkenleri olabilen grubu temsil eden *Y. pseudotuberculosis* (ATCC 911) üzerinde olduğu belirlendi (Tablo 3). Ayrıca, *S. aureus*, *B.*

cereus ve *M. smegmatis* üzerinde de etki gözlemlendi. *Clinopodium* cinsinin başka bir türü olan *C. bolivianum* bitkisi ile Mohanty vd. (2017) *E. coli* üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada bitkinin bakterinin yayılmasını engellediği fakat üremesini inhibe etmediğini bildirmişlerdir.

Saç rengini sağlayan faktörlerden biri olan melaninin görevi, deriyi UV ışınlarından korumak ve reaktif oksijen türlerini gidermektir. Tirozinaz enzimi, L-tirozinin monofenolaz ile hidrosilasyonunu ve L-dopanın difenolaz ile o-dopakinona oksidasyonunu katalizlemektedir (Chan vd., 2008). Tirozinaz, vücutta melanin sentezinin aşırı olmasından kaynaklanan cilt lekeleri gibi hiperpigmentasyon ve sentezinin yeterli olmamasından kaynaklı hipopigmentasyon problemlerinde rol oynayan bir enzimdir. Bu enzimi inhibe eden ajanlar hiperpigmentasyon ve aktive eden ajanlar ise hipopigmentasyon

problemlerinin tedavisinde kullanılabilir (Gholamhoseinian ve ZohreRazmi, 2012). *C. vulgare*'nin aseton ekstresinde tirozinaz inhibitör aktivitesinin 1.85 ± 0.40 mg galantamin eşdeğeri/g ekstre olarak bulunduğu belirtilirken metanol ekstresinde hiçbir aktivitenin olmadığı belirtilmiştir (Sarikurkcu vd., 2015). Bizim çalışmamızda ise Sarikurkcu'nun çalışmasıyla uyumlu olarak *C. vulgare* L. subsp. *vulgare* metanol ekstresinde IC₅₀ değeri (>1000 µg/mL) standart olarak kullanılan kojik aside (63.095 µg/mL) göre oldukça yüksek bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere bakıldığında *C. vulgare* L. subsp. *vulgare* metanol ekstresinin iyi bir antioksidan ve antimikrobiyal kaynağı olduğu ve faydalı fenolik bileşime sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışılan tür doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin önemli bir kaynağı olarak düşünülebilir.

Tablo 3. *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi (50 µL)

	Mikroorganizmalar ve inhibisyon çapı (mm)								
	Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Bc	Ms	Ca	Sc
Ekstre	-	12	-	6	-	8	6	-	-
Ampisilin	10	10	18	10	35	15	-	-	-
Streptomisin							35		
Flukonazol	-	-	-	-	-	-	-	25	25

Ec: *E. coli*, Yp: *Y. pseudotuberculosis*, Pa: *P. aeruginosa*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, Bc: *B. cereus*, Ms: *M. smegmatis*, Ca: *C. albicans*, Sc: *S. cerevisiae*, (-): aktivite yok.

Teşekkür

Sıla Özlem ŞENER ve Merve BADEM lisansüstü eğitimlerine destekleri için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Kaynaklar

Aliyazicioglu, R., Demir, S., Badem, M., Sener, S.O., Korkmaz, N., Demi, E.A., Ozgen, U., Karaoglu, S.A., Aliyazicioglu, Y., 2017. Antioxidant, Antigenotoxic, Antimicrobial Activities and Phytochemical Analysis of *Dianthus carmelitarum*. *Records of Natural Products*, 11, 3, 270-284.

Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. Ve Kasai, H., 1997. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, 18, 9, 1763–1766.

Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

Birinci, S., 2008. Doğu Karadeniz Bölgesinde Doğal Olarak Bulunan Faydalı Bitkiler ve Kullanım Alanlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana, 181s.

- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Cao, G. ve Prior, R.I., 1999. The Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E. ve Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109, 477-483.
- Chen, J.S., Wei, C. ve Marshall, M.R., 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1897-1901.
- Çelikel, D., 2015. *Hypericum perforatum* bitkisinden elde edilen kantaron yağının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Sivas, 196s.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M. ve Neticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*, 18, 655-673.
- Dzhambazov, B., Daskalova, S., Monteva, A., Popov, N., 2002. In vitro screening for antitumour activity of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae) extracts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin Journal*, 25, 499-504.
- Eruygur, N., 2014. Türkiye’de yetişen bazı *Echium* türlerinin yara iyileştirici aktivitesinin araştırılması. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Farmakognozi Ana Bilim Dalı, Ankara, 176s.
- Gholamhoseinian A., ZohreRazmi Z., 2012. Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity. *Toxicology Environment Chemistry*, 94, 310-318.
- Halliwell, B., 2007. Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your health?. *Cardiovascular Research*, 73, 341-347.
- Kasparova, S., Brezova, V., Valko, M., Horecky, J., Mlynarik, V., Liptaj, T., Vancová, O., Ulicná, O. ve Dobrota, D., 2005. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochemistry International*, 46, 601-611.
- Kaur, C. and Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium’s health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36, 703-725.
- Kokdil, G., 1998. Composition of the essential oil of *Clinopodium vulgare* ssp. *arundanum* (Boiss.) from two different localities in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 170-172.
- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R., Tang, J. ve Rasco, B.A., 2011. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129, 2, 637-644.
- Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P. ve Halliwell, B., 1997. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemical Research*, 68, 2061-2069.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83-95.
- Martos, I., Cosentini, M., Ferreres, F. ve Tomas-Barberan, F.A., 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2824-2829.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. ve Yonemori, S., 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts for of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 197-201.
- Mohanty, S., Kamolovit, W., Zambrana, S., Sandström, C., Gonzales, E., Ostenson, C.G. ve Braunerf, A., 2017. Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against *E. coli* invasion of uroepithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 214-220.

- Opalchenova, G. ve Obreshkova, D., 1999. Antibacterial action of extracts of *Clinopodium vulgare* L. curative plant. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 323–328.
- Perez, G.R.M., 2013. Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 1846–1855.
- Sagdic, O., Kuscu, A., Ozcan, M. ve Ozelik, S., 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 19, 473-480.
- Sarikurkcu, C., Ozer, M.S., Tepe, B., Dilek, E. ve Ceylan, O., 2015. Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of acetone, methanol and water extracts of *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* L.. *Industrial Crops and Products*, 76, 961–966.
- Sayre, L.M., Smith, M.A. ve Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 721–738.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J.M. ve Wihers, H.J., 1999. Biochemical and physiological aspects of Brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 591-614.
- Soumitra, M., Witchuda, K., Silvia, Z., Corine, S., Eduardo, G., Claes-Goran, O. ve Annelie, Br., 2017. Extract of *Clinopodium bolivianum* protects against *E. coli* invasion of uroepithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 214–220.
- Tepe, B., Sihoglu-Tepe, A., Daferera, D., Polissiou, M. ve Sokmen, A., 2007. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L.. *Food Chemistry*, 103, 766–770.
- Tosun, A., Süntar, İ., Keleş, H., Kiremit, H., Asakawa, Y. ve Akkol, E., 2016. Wound Healing Potential of Selected Liverworts Growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 3, 285-291.
- Turner, B.L., 2008. Taxonomic status of *Clinopodium macrostema* (Lamiaceae). *Phytologia*, 90, 411–413.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernandez, Y., Zurita-Vasquez, G., Betancourt-Jiménez, M.B., Cruz-Duran, R., Duque-Bautista, H., 2013. Anti-lipase and antioxidant properties of 30 medicinal plants used in Oaxaca México. *Biological Research*, 46, 153–160.
- Woods, G.L., Brown-Elliott, B.A., Desmond, E.P., Hall, G.S., Heifets, L., Pfyffer, G.E., Ridderhof, J.C., Wallace, R.J., Warren, N.C., Witebsky, F.G. 2003. In Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, NCCLS document M24-A, 23, 18.
- Yarnell, E. ve Abascal, K., 2004. The Leading Publisher in Biotechnology. *Alternative Complementary Therapies*, 5, 277-284.