

Mikroalga ile *Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus* Bitkisinin Uçucu Yağ Analizi ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Tayyibe Beyza YÜCEL

Giresun Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Giresun
Sorumlu yazar: beyza.yucel@giresun.edu.tr

Geliş Tarihi: 28.10.2019 Düzeltme Geliş Tarihi: 11.02.2020 Kabul Tarihi: 17.02.2020

Özet

Bu çalışmada, *Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus* bitkisinin uçucu yağı, mikroalga aparatlı destilasyon ile elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC/MS, GC/FID cihazı ile aydınlatılmış ve Minimum İnhibisyon Konsantrasyon yöntemi (MIC) kullanılarak antimikrobiyal aktivitesi tayin edilmiştir. Uçucu yağ analizinde, bitkinin % 80.24'lük kısmı tanımlanmış olup, toplam 56 bileşik yapısı aydınlatılmıştır. Ana bileşen sınıfı olarak %30.60 oranında terpen ve terpen benzeri bileşikler, %16.89 oranında hidrokarbonlar, %12.49 aldehitlerden oluştuğu tespit edilmiştir. β -ionon (%4.83), (2E,4E) dekadialen (%4.13), β -pinen (%3.76), karahanoenon (%3.53) bileşikler uçucu yağ içinde en fazla bulunan bileşikler olarak tespit edilmiştir. *Lotus corniculatus* bitkisinden ekstrakte edilen uçucu yağın hekzan çözücüsü içinde 51600 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda hazırlanan stok çözeltisinin; *Escherichia coli* (E. coli) ATCC35218, *Yersinia pseudotuberculosis* (Y. pseudotuberculosis) ATCC911, *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) ATCC43288, *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) ATCC29212, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC25923, *Bacillus cereus* (B. cereus) 709 Roma, *Mycobacterium smegmatis* (M. smegmatis) ATCC607 Gram pozitif, Gram negatif bakterilere ve *Candida albicans* (C. albicans) ATCC60193 maya mantarına karşı antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve uçucu yağın sadece maya mantarı üzerinde 645 $\mu\text{g/mL}$ etkin değer gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, GC/MS-GC/FID, *Lotus corniculatus*, Uçucu yağ.

Essential Oil Composition from the Flower of *Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus* Obtained by Microwave Assisted Distillation Analysis and Antimicrobial Activity

Abstract

In this study, volatile oil from the flower of *Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus* was obtained of the plant by microwave-assisted hydro-distillation. The chemical constituents of the volatile oil were illuminated by GC/FID and GC/MS techniques and was determined to antimicrobial activity by the minimal inhibition concentration (MIC) method. As a result of analysis of essential oil from the flower of *Lotus corniculatus*, 30.60% of terpene and terpene-related compounds, 16.89% hydrocarbons and 12.49% aldehydes were found to be the main component classes. It was found that the compounds were found to be the major compounds with β -pinene (3.76%), karahanoenone (3.53%), β -ionone (4.83%) and (2E,4E)-decadienal (4.13%). In the analysis, a total of 56 compounds were determined and 80.24% of the essential oil was identified. The isolated essential oils of *Lotus corniculatus* was tested for antimicrobial activity against the Gram positive(+) and Gram negative (-) bacteria *Escherichia coli* (E. coli) ATCC35218, *Yersinia pseudotuberculosis* (Y. pseudotuberculosis) ATCC911, *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) ATCC43288, *Enterococcus faecalis* (E. faecalis) ATCC29212, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC25923, *Bacillus cereus* (B. cereus) 709 Roma, *Mycobacterium smegmatis* (M. smegmatis) ATCC60 and the fungus *Candida albicans* (C. albicans) ATCC60193 at maximum essential oil concentration in hexane of 51600 $\mu\text{g/mL}$ and they showed 645 $\mu\text{g/mL}$ only antibacterial activity against fungus *Candida albicans* (C. albicans) ATCC60193.

Keywords: Antimicrobial activity, Essential oil, GC/MS-GC/FID, *Lotus corniculatus*.

Giriş

Halk arasında “kuş ayağı, gazelboynuzu” olarak da bilinen *Lotus corniculatus* L. var. *corniculatus*, 720-750 üye ve 18000 tür bulunduran en geniş bitki ailelerinden biri olan Fabaceae ailesi üyesidir (Wink ve Mohamed, 2003). *Lotus* (Fabaceae) cinsinin yaklaşık olarak 173 türü bulunup genel olarak Avrupa, Kuzey Afrika, Batı ve Orta Asya’da dağılım göstermektedir. *Lotus*, çok yıllık otsu bir bitki olup özellikle nemli topraklarda ve çayırarda yetişir (Kirkbride, 1999; Escaray ve ark., 2012). Değişen hava ve çevre koşullarına oldukça dirençli olan bitki, tuzlu ve alkali ayrıca verimsiz topraklarda bile yetişebilmektedir. Tadı lezzetli ve oldukça yüksek besin değerine sahip olan *L. corniculatus* L., yüksek lif, protein ve ikincil metabolit (saponinler, tanninler, flavanoidler, uçucu yağlar vb.), içeriği ve zorlu ortamlarda yetiştirme kabiliyetinden dolayı dünya genelinde oldukça yüksek oranlarda ekilmekte ve Anadolu’nun birçok köyünde de yaygın olarak, tek başına veya karışım halinde hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır (Rijke ve ark., 2004; Koçak ve ark., 2011). Bitki, eğimli araziler ve yüksek topraklarda yetiştirildiğinden, toprak koruma ve ıslahı açısından önemlidir. Özellikle çayır salkım otu, köpek kuyruğu ve domuz ayrığı gibi buğdaygillerle birlikte ot üretimi amacıyla yetiştirilmektedir (Walter, 1961; Mezrag ve ark., 2014, Toth ve ark., 2016). Türkiye’de tek tür olarak bulunan *L. corniculatus* Haziran-Ağustos ayları arasında çiçeklenir. Bitki içeriğindeki metabolitler ve diğer biyolojik aktif bileşiklerin yüksek oranda bulunmasından dolayı tıbbi alanda kullanıldığı bilinmektedir (Chiquette ve ark., 1989; Trouillasa ve ark., 2003; Min ve ark., 2005). Ülkemizde olduğu gibi Dünya genelinde de eski çağlardan beri bitkiler, hastalıkların tedavisinde, yaraların iyileştirilmesinde geleneksel bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Aykanat ve ark., 2019; Üçüncü ve ark., 2019). Türkiye, jeolojik yapısı, iklim çeşitliliği ve rakım farkı gibi etkenlerden dolayı zengin bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Türkiye’de sadece belli kesimlerde yetişebilen bitkiler olan endemik bitkilerin sayısı 3700 civarındayken, bu sayı tüm Avrupa kıtasında 3000 olduğu bilinmektedir (Torlak ve ark., 2010; Güner ve ark., 2012). Bu açıdan bakıldığında bile Türkiye’nin bitki çeşitliliği ve elde edilecek uçucu yağ kompozisyonu açısından yüksek bir potansiyel olduğu aşikârdır. Bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen uçucu yağların yaklaşık olarak 3000 civarı olduğu düşünülmektedir. Hem ucuz elde edilebilir kaynaklar olması hem de çoklu doymamış yağ asitleri yönünden zengin olması sebebiyle özellikle son yıllarda uçucu yağların içerikleri, kalitesi, miktarları ve biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmaların sayısı

gittikçe artmaktadır (Morteza-Semnani ve ark., 2012; Bayaz, 2014; Lee ve ark., 2019; Park ve ark., 2019). Doğal koruyucu katkı maddesi olarak da günümüzde yaygın halde kullanılabilen uçucu yağların, sentetik katkı maddelerine göre oldukça sağlıklı olması sebebiyle, örneğin; kuvvetli antioksidan ve lezzet verici özelliğinden ve çoğu uçucu yağın mutajenik etkisinin olmamasından dolayı gıda endüstrisinde, etkili antimikrobiyal olarak hayvancılık endüstrisinde, içerdiği bazı bileşenlerden dolayı farmakolojide, ayrıca kozmetik, parfümeri, aromaterapi ve meşrubat alanlarında da kullanımı bulunmaktadır (Hajhashemi ve ark., 2003; Burt, 2004; Şahin ve ark., 2004; Özbek, 2005).

Lotus bitkisi Çin ve Vietnam gibi Uzak Doğu ülkelerinde bitkinin sahip olduğu aromadan dolayı kurutularak çay olarak tüketilmekte ve içerdiği sekonder metabolitler sayesinde antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip olmasından dolayı böbrek rahatsızlıklarında tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 1996; Jung ve ark., 2003). Melanin sentezi üzerinde etkili olan *Lotus* bitkisinin literatürdeki çalışmalarına bakıldığında, bu bitkinin değişik organik çözücülerde hazırlanan ekstratlarının farklı dozlarının melanin sentezi üzerindeki etkilerinin çalışıldığı çalışmalara rastlanılmaktadır (Jeon ve ark., 2009; Akgün, 2017). Genel olarak *Lotus* üyelerinin palmitik asit, oleik asit gibi doymamış yağ asitleri ve bunların esterik türevleri açısından zengin oldukları bilinmektedir (Ando ve ark., 2004; Bi ve ark., 2006; Dewhurst ve ark., 2006). *L. corniculatus* türüyle ilgili olarak literatürde bitkisinin hipokotil ve yaprak gibi dokularından alınan çeşitli eksplantların, iyi bir rejenerasyon sistemi geliştirebilmelerinden dolayı bitki biyoteknolojisi alanında iyi model olmasından kaynaklı çalışmalar mevcuttur (Akashi ve ark., 1998; Wang ve ark., 2013; Uysal, 2014). Bu çalışmaların çoğunluğu *L. corniculatus*’un genetik ve biyoteknolojik değişimiyle ilgili çalışmalardır (Tabaeizadeh, 1989; Akashi ve ark., 1998; Nicolici ve ark., 2007). Bitkinin fotokimyasal çalışmalarındaysa, bitkinin fitoaleksinler, polifenoller, proantosiyaniidinler (Foo ve ark., 1996), tanenler (Kamra ve ark., 2008), flavonoidler (Dhawan ve Lavania, 1996; Borgi ve ark., 2008; Bakoğlu ve ark., 2009), oleanolik asit (Peiretti ve ark., 2017) ve saponin içeriklerine dair çalışmalar (Walter, 1961; Patra ve Saxena, 2009) bulunmaktadır. Bitkinin bu çalışmalar dışında, kurutulmuş bitkinin metanol ekstraktının sitotoksik ve antioksidan aktivitelerin (Pereira ve ark., 2011; Khalighi-Sigaroodia ve ark., 2012) ve *L. corniculatus* bitkisinin etanol ekstraktının, sıvı-sıvı ekstraksiyon fraksiyonlarının anti-inflammatuar aktivite çalışmalarının (Koelzer ve ark., 2009) olduğu

görülmektedir. *L. corniculatus* bitkisinin çiçek kısmının antispazmotik, kardiyotik ve sedatif etki gösterdiği biyolojik aktivite tayin çalışmaları mevcuttur (Trouillasa ve ark., 2003).

Bu çalışmada, birçok toplumda alternatif tıbbi bitki olarak kullanılan *L. corniculatus* bitkisinin, biyolojik aktivitesinin tayini için öncelikle uçucu yağı elde edilmiş ve uçucu yağın kimyasal bileşimi detaylı olarak aydınlatılmıştır. En son olarak ekstrakte edilen uçucu yağın, seçilen 8 adet Gram pozitif (+), Gram negatif (-) bakteri ve maya mantarlarına karşı antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Bitki Materyali: *L. corniculatus* Temmuz 2017 tarihinde Erzurum Kop geçidi mevki ~ 2350 m rakımdan toplanmıştır. Bitki örneğine ait numune Karadeniz Teknik Üniversitesi Coşkunçelebi1285, KTUB numarası ile herbaryuma konulmuştur. Bitki taze haldeyken çiçek, yaprak ve gövde ayrılmadan bütün halde ufak parçalara blender ile küçültülmüştür.

Mikroalga cihazında Clevenger aparatlı Hidrodestilasyonla Uçucu Yağ Eldesi Prosedürü: Boyutu küçültülen bitkiden 215g tartım alınarak, 2L'lik destilasyon balonuna konuldu ve üzerine 500 mL saf su ilave edildi. Mikroalga cihazına bağlı Clevenger tip geri soğutucu aparatına bağlı su buharı destilasyon sistemi soğutma banyosu ile -15 °C'ye soğutulan sisteme bağlanarak bitki 3 saat destile edilerek uçucu yağ elde edildi. HPLC saflıktaki 2mL *n*-hekzan çözücüsüyle beraber alınarak kahverengi vial konuldu. İçinde olası olan suyu almak için susuz Na₂SO₄ ile kurutulan uçucu yağ GC/MS, GC/FID cihazına enjekte edildi ve kalan kısım biyolojik aktivite tayini için -4°C'de saklandı (Yasser ve Mohamed, 2014).

Mikroalga cihazı olarak, sıcaklık ve basınç değişimlerine karşı güçlü ve oldukça duyarlı soğutma sistemi bulunan Milestone DryDIST marka laboratuvar türü cihaz kullanılmıştır. Destilasyon işlemi, atmosferik basınç altında 600 W'da 110 °C'de 45 dk boyunca kontrollü olarak devam edilerek gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında sıcaklık kontrolü, Infrared sensörlü monitör kullanılarak takip edilmiştir (Cansu ve ark., 2011).

GC/FID ve GC/MS ile Uçucu Yağ Tayini ve Bileşenlerin Tanımlanması: *L. corniculatus* bitkisinden elde edilen uçucu yağ ekstresinin GC/FID ve GC/MS analizi için Agilent-5973 Network Sistem marka cihaz ile literatürde gösterildiği

şekilde gerçekleştirilmiştir (Basmacıoğlu-Malayoglu ve ark., 2011).

GC/FID ve GC/MS cihazında tayin edilen bileşenlerin tutunma indeksleri Kovats yöntemi belirlenmiş olup standartlar bileşikler olarak *n*-alkanlar (C₆-C₃₂) kullanılmıştır. Uçucu yağın kimyasal bileşenleri, bileşenlerin kütle spektrumları ile kütle spektrumu kütüphaneleri olan NIST, Wiley [NIST Chemistry Webbook] ve standart bileşikler (β -pinen, δ -limonen, δ -3-karen, linalool, karahanoenon, β -ionon, (2*E*,4*E*)-dekadienal, benzaldehit, undeken, tridekan, tetradekan, nonadekan, heneikosan, metil hekzadekanoat, etil linoleat, metil linoleat) kullanarak ve literatürdeki kütle spektrumları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi: Elde edilen bitki uçucu yağın antimikrobiyal aktivite testi için *Escherichia coli* ATCC35218, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* 709 Roma, *Mycobacterium smegmatis* (M. smegmatis) ATCC607 ve *Candida albicans* ATCC60193 test mikroorganizmaları Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edilmiştir. Uçucu yağ ekstraktları tartılarak hekzan ile çözülmüş ve 489-107.200 µg/mL özüt stok solüsyonu hazırlanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite testleri çift mikrodilüsyon metodu kullanılmış ve inhibisyon zon çapları (mm) belirlenmiştir. Antibakteriyel ve antifungal testler sırasıyla pH 7.3'de Mueller-Hinton (MH) (Difco, Detroit, MI) ve pH 7.0'de tamponlanmış Maya Azot Bazında (Difco, Detroit, MI) yürütülmüştür. Mikro seyreltme test plakaları 18-24 saat boyunca 35 °C'de inkübe edilmiştir. Standart antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak ampisilin (10.000 µg/mL), flukonazol (5.000 µg/mL) ve streptomisin (10.000 µg/mL) kullanılmıştır (Yücel ve Yaylı, 2018). Kontrol çözücüsü olarak 1:10 oranında seyreltilmiş Di-metil sülfoksit kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bitkilerden uçucu bileşenleri ekstrakte etmek için bitkinin yapısı, kullanım alanı gibi etkenlerden dolayı farklı yöntemler ortaya çıkmıştır. Bunlar damıtma, ekstraksiyon ve mekanik yöntemlerdir. Bu çalışmada kullanılan mikroalga cihazına entegre edilen ekstraksiyon, daha modern bir yöntemdir. Ekstraksiyon sonucunda 58.05 mg uçucu yağ %0.09 (v/w) verimle elde edilmiştir. Bitkiye ait uçucu yağ bileşim işlemi GC/MS-GC/FID cihazında gerekli pik okumalarından sonra elde edilen veriler Çizelge 1.'de verilmiştir.

Çizelge 1. *L. corniculatus* Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenleri.

Alıkoma zamanı	Bileşikler	% Alan ^b	Deneyisel RI ^a	Literatür RI
Terpenler				
4.818	α -Pinen	0.86	935	939
5.914	β -Pinen	3.76	972	979
6.906	δ -3-Karen	1.82	1013	1008
7.220	Silvestiren	1.50	1025	1031
7.447	δ -Limonen	2.13	1031	1029
11.107	Allo-Osime	0.46	1128	1132
23.137	(Z)-Karyofillen	0.61	1403	1409
23.532	(E)-Karyofillen	0.29	1415	1419
25.588	Farnesan	0.18	1460	1455
46.968	Abietatran	0.18	2052	2057
Terpenoidler				
10.166	Linalool	3.23	1103	1097
12.538	Karahanoenon	3.53	1163	1159
13.611	cis-izopulegon	1.04	1186	1184
15.037	β -siklositral	0.81	1218	1221
30.106	Karyofillen oksit	0.24	1575	1583
49.734	Fitol	0.65	2115	2117
Terpenoid benzeri bileşikler				
21.755	(Z)- β -Damaskenon	0.58	1371	1364
22.112	(E)- β -Damaskenon	0.31	1378	1385
22.426	(Z)-Jasmon	0.32	1386	1393
24.970	Nerilaseton	0.98	1440	1436
25.205	Geranil aseton	0.40	1451	1455
26.530	β -ionon	4.83	1482	1489
40.234	Hekzahidrofarnesil Aseton	1.14	1839	1847
42.722	Farnesil Aseton	0.75	1915	1915
Aldehitler				
5.416	Benzaldehit	2.72	958	960
8.526	2-Oktenal	1.47	1062	1057
8.998	3,4-Pentadienal	1.20	1074	1070
10.336	Nonanal	1.30	1107	1101
18.186	(2E,4Z)-Dekadienal	1.67	1293	1293
19.385	(2E,4E)-Dekadienal	4.13	1317	1317
Hidrokarbonlar				
10.533	Undesin	1.94	1110	1106
18.631	Tridekan ^c	1.31	1298	1300
22.654	Tetradekan ^c	0.26	1392	1400
42.124	Nonadekan ^c	0.36	1895	1900
45.442	Eikosa	0.10	1995	1999
46.080	Eikosa ^c	0.26	2005	2000
49.442	Heneikosa	1.47	2105	2100
51.669	Dokosa	0.49	2194	2200
54.773	Trikosa ^c	4.25	2296	2300
57.458	Tetrakosa	1.66	2398	2400
61.583	Pentakosa	4.79	2503	2500
Esterler				
13.946	Metilsalisilat	0.82	1193	1192
28.189	Eugenol asetat	0.13	1521	1523
29.799	3Z-Hekzenil benzoat	0.27	1562	1567
35.922	Metil tetradekanoat	0.31	1720	1724
37.184	Benzil benzoat	0.37	1754	1760
40.964	İzobutil fitalat	0.52	1862	1868
41.847	Etil linoleat	0.89	1890	1893
43.081	Metil heksadekanoat	1.88	1940	1938
45.255	Etil heksadekanoat	0.20	1990	1993
Diğer				
6.077	1-Okten-3-ol	5.29	979	979
6.367	Furan-2-pentil	2.19	989	990
6.642	Cis-2-pentenil furan	1.38	1005	1001
21.092	Eugenol	0.62	1357	1359
35.487	Tetradekanol	0.71	1685	1678
	Toplam	80.24 %		

^a Bileşikler elüsyon sırasına göre listelenmiştir. RI (tutma indeksi) değerleri, polar olmayan HP-5 sütunundaki n-alkanların (C₆-C₃₂) kine göre tutma sürelerinden hesaplanır. ^b FID pik alanı normalizasyonu ile elde edilen yüzdelere. ^c Otantik örnekler ile aydınlatılanlar.

Çizelge 1'deki verilere bakıldığında, elde edilen uçucu yağın %80.24'ünü oluşturan bileşiklerin yapısının aydınlatıldığı ve bu bileşiklerin en yüksek

oranda bulunan bileşikler 1-Okten-3-ol (%5.29), β -ionon(%4.83), pentakosa (%4.79), trikosa (%4.25), β -pinen (%3.76), linalool (%3.23),

karahanoenon (%3.53), δ-limonen (%2.13) olarak tespit edilmiştir. Bulunan toplamda 56 bileşik; terpenler, terpenoidler, terpenoid benzeri

bileşikler, aldehitler, hidrokarbonlar, esterler ve diğerleri olmak üzere toplam 7 sınıfta toplanmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. *L. corniculatus* Uçucu Yağ Bileşen Sınıfları.

Bileşikler	% Alan	Bileşik sayısı	Major bileşik	%Alan
Terpen	11.79	10	β-Pinen	3.76
Terpenoid	9.5	6	Karahanoenon	3.53
Terpenoid benzeri bileşikler	9.31	8	β-Ionon	4.83
Aldehit	12.49	6	(2E,4E)-Dekadienal	4.13
Hidrokarbon	16.89	11	Pentakosan	4.79
Ester	10.07	10	Metil heksadekanoat	1.88
Diğer	10.19	5	1-Okten-3-ol	5.29
Toplam	80.24 %	56		

Bu gruptan en yüksek oranda bulunanlar ise %16.89 hidrokarbon sınıfı bileşikler ve %12.49 aldehit sınıfı bileşikler ve %11.79 oranında terpen sınıfı bileşiklerdir. Uçucu yağdaki yapısı aydınlatılan bileşiklerden terpen, terpenoid ve terpenoid benzeri bileşiklerin oranı, toplam uçucu yağın %30.60'sını oluşturduğu bulunmuştur. Uçucu yağların biyolojik aktivitesini pozitif anlamda etkilediği düşünülen bu bileşik türünün, yüksek olan bu miktarının bulunması bu çalışmanın gerekli bir çalışma olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu türün hem uçucu yağ bileşimi hem de uçucu yağ antimikrobiyal aktivitesinin çalışmasının ilk defa bu çalışmayla yapılmış olması bakımında da çalışma bilimsel açıdan önem arz etmektedir. Literatürde *L. corniculatus* ile yapılan ekstraksiyon çalışmalarına bakıldığında, kurutulmuş bitkinin 12 saat sokslet aparatı ile 12 saat metanol çözücüsü ile elde edilen ekstraktın sitotoksik ve antioksidan aktivite çalışmasında standart timol maddesine göre orta derecede aktivite gösterdiği görülmüştür (Khalighi-Sigaroodia ve ark., 2012). Bitkinin bir diğer çalışmasında, açık havada kurutulan bitki 2 gün oda sıcaklığında etanol içerisinde bırakılarak Whatmann, no. 1 tipi süzgeçten süzülerek elde edilen ekstrakt, evapore edilerek sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile hekzan, etil asetat ve *n*-bütanol çözücülerindeki fraksiyonları alınarak saflaştırma yapılmış ve HPLC cihazında teşhis ve ayırımı ile elde edilen izolatların ve fraksiyonların lökosit, nötrofil, tek çekirdekli hücre üzerinde anti-inflammatör etkisi çalışılmıştır (Koelzer ve ark., 2009). Bir başka çalışmada da Koelzer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı referans alarak aynı işlemler yapılmış ve hem ekstraktların hem de izolatların anti-inflammatör etkilerine bakılmıştır (Pereira ve ark., 2011). Bu çalışmalara göre, *L. corniculatus*'dan izole edilen ve yoğun miktarlarda bulunan esterik yağ asitlerinden olan

triterpenoid oleanolik acid, oleanolik acid ve terpen bileşikleri olan β-sitosterol, kaempferitrin gibi biyolojik aktif bileşiklerin etkileri oldukça fark edilebilir. 2009 yılında Türkiye'de Adana bölgesinden toplanan *L. corniculatus* L., bitkisiyle yapılan çalışmada, bitkinin tannin, doymuş yağ asidi içeriği tespiti yapmışlardır (Koçak ve ark., 2011). Topladıktan sonra temizlenen bitkiyi öğütmüşler ve hekzan/isopropanol (2:1) çözücü sisteminde lipitleri ekstrakte ederek ayırmışlardır. Ekstrakte bulunan lipitlerin metil esterlerini metanol çözücüsünde çözerek ayırmışlardır. GC ile doymuş ve doymamış yağ asitlerinin oranını %72.28 ve %25.96 olarak bulmuşlar ve bu yağ asitlerin en yoğun bulunanları 18 karbonlu oleik asit (%30.52) ve linoleik asit (%37.06) olarak bulmuşlardır. Bu bakımdan bu çalışma, bizim yaptığımız bitkinin GC analiz bileşimine bakıldığında metil esterlerin varlığı ve bunların oranının %10.07 olarak bulunması çalışmamızı doğrular niteliktedir. Genel olarak literatürde bu bitki ile yapılan çalışmalarda, polifenol türevleri bileşikler olan saponin ve tanin içerikleri ile ilgili çalışmalar olup, in vitro koşullar altında enzim aktiviteleri üzerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir (Patra ve Saxena, 2009). *L. corniculatus* bitkisinin, mikrodalga destekli su buharı destilasyonu ile elde edilen uçucu yağının seçilen 8 mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivite sonuçları Çizelge 3.'de verilmiştir. Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve maya mantarına karşı yapılan test sonuçlarına göre, hazırlanan konsantrasyonda çalışılan uçucu yağın sadece bir maya mantarı olan *Candida albicans* ATCC 60193 üzerinde etkili olduğu görülmüştür.

Bu bağlamda, bitkinin uçucu yağının yüksek konsantrasyonlarda seçici olarak antimikotik etkinliğe sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 3. *L. corniculatus* Uçucu Yağ Antimikrobiyal Aktivite Sonucu (µg/ mL).

Örnek	Stok çözelti (µg/mL)	Mikroorganizmalar ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu							
		Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Bc	Ms	Ca
<i>L.corniculatus</i>	51600	-	-	-	-	-	-	-	645.0
Ampisilin	10000	2	32	>128	2	2	<1		
Streptomisin	10000							4	
Flukonazol	5000								<8

Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 43288, Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ef: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Bc: *Bacillus cereus* 702 Roma, Ms: *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, Ca: *Candida albicans* ATCC 60193, Amp.: Ampicillin, Strep.: Streptomycin, Flu.: Fluconazole, (—): aktivite yok.

Sonuç ve Öneriler

Çalışma materyali olan *L. corniculatus* bitkisine uygulanan su buharı destilasyonu işlemi, son yıllarda sentez işlemlerinde ve bitkisel kaynaklardan ekstrakt ve metabolit eldesi aşamalarında kullanımı artan mikrodalga cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada normal su buharı destilasyonuna göre daha kolay kontrol altına alınabilen, kaynama sırasında atma köpürme olaylarına karşı infrared ekrandaki panelden hızlı ve kolay bir şekilde müdahale edilebilen, basınç ve sıcaklığa daha dayanıklı cam malzemelerin kullanımının olduğu, oldukça avantajlı bir yöntem olan mikrodalga cihazına entegre edilmiş su buharı destilasyonu işlemi uygulanmıştır. Toplanan *L. corniculatus* bitkisinin mikrodalga destekli clevenger aparatına bağlı su buharı destilasyonu yöntemi ile uçucu yağ elde edildiği, ekstrakte edilen uçucu yağın kimyasal bileşiminin aydınlatıldığı ve antimikrobiyal aktivite tayinlerinin yapıldığı bu çalışma, literatürde daha önce bulunmamaktadır. Normal su buharı destilasyonuna göre oldukça yüksek % 0.09 verimle(v/w) 58.05mg elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC/MS-GC/FID cihazıyla aydınlatılmıştır. Bitkinin uçucu yağında en fazla bulunan bileşik, alkol sınıfı bileşik olan 1-Okten-3-ol (%5.29)olarak bulunmuştur. β-ionon (%4.83), pentakosan (%4.79), (2E,4E) dekadialen (%4.13), β-pinen (%3.76), karahanoenon (%3.53), metil hekzadekanoat (%1.88) bileşikler uçucu yağdaki diğer miktarları fazla olan bileşikler olarak tespit edilmiştir. Literatürde saponin, tannin ve doymuş yağ asit esterleri açısından zengin olduğu görülen *L. corniculatus* bitkisinde, bu çalışmada da %10.07 oranında bulunan ester sınıfı bileşiklerden etil linoleat (%0.89), metil salisilat (%0.82) gibi çoğunluğu metil ve etil ester türevleri olan ester bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir. δ-limonen (%2.13), β-Pinen (%3.76) ve δ-3-Karen (%1.82) oranlarıyla bileşimde yer alan terpen sınıfı bileşikler, toplam yağın %11.79'unu oluşturup toplamda bulunan 10 tane bu sınıf bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Toplam yağda tanımlanabilen 56

bileşikten 11 tane ile en fazla sayıda bileşik sayısı ile bulunan hidrokarbon sınıfı bileşiklerden pentakosan (%4.79), trikosan (%4.25) ve undesin (%1.94) bu sınıfın en yüksek oranda bulunan bileşikler olarak görülmektedir. Uçucu yağların biyolojik aktivitelerin artırdığı düşünülen terpen ve terpenoid türevi bileşikler, bu bitkinin uçucu yağında toplam 24 bileşik ile uçucu yağın %30.6'sını oluşturmaktadır. Uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesine bakıldığında ise, test edilen Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı hiçbir aktivite göstermediği yani antibakteriyal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin maya mantarı olan *Candida albicans* üzerinde 645 µg/ mL değerinde etki gösterdiği bulunmuştur.

Teşekkür

Yapılan çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Bitki teşhisi ve herbaryum işlemlerini yapan Prof. Dr. Kamil Coşkunçelebi'ye ve antimikrobiyal aktivite testlerini yapan Prof. Dr. Şengül Alpay Karaoğlu'na teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

- Akashi, R., Uchiyama T., Sakamoto A., Kawamura O., Hhuffman F. 1998. High frequency embryogenesis from cotyledons of bird'sfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Journal of Plant Physiology*, 152: 84-91.
- Akgün, S. 2017. Melanogenez Sürecinde Rol Oynayan Uzun-Kodlanmayan Rna'ların Belirlenmesi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ando, H., Watabe, H., Valencia, J.C., Yasumoto, K., Furumura, M., Funasaka, Y., Oka, M., Ichihashi, M., Haring, V.J. 2004. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *Journal of Biological Chemistry*, 279:15427-33.

- Aykanat F.T., Şahin, İ.H., Çelikezen, F.Ç., Hayta, Ş. 2019. *Prangos pabularia* Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi, BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 8 (3):742-748.
- Bakoglu, A., Bagci, E., Ciftci, H. 2009. Fatty acids, protein contents and metal composition of some feed crops from Turkey. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7:343-346.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., P. Özdemir ve E.Esin Hameş-Kocabaş. 2011. Chemical Compositions and Antibacterial Activity of The Essential Oils from Some Plant Species. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(1): 11-8.
- Bayaz, M. 2014. Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri, *Akademik Gıda*, 12(3):45-53.
- Bi, Y., Yang, G., Li, H., Zhang, G., Guo, Z. 2006. Characterization of the chemical composition of *lotus* plumule oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:7672-7677.
- Borgi, W., Recio, M.C., Ríos, J.L., Chouchane, N. 2008. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *South African Journal of Botany*, 74(2): 320-324.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Cansu, T. B., Yücel, M., Sinek, K., Baltacı, C., A. Karaoglu, S., Yayli, N. 2011. Microwave assisted essential oil analysis and antimicrobial activity of *M. alpestris* subsp. *Alpestris*. *Asian Journal of Chemistry*, 23(3); 1029-1035.
- Chiquette, J., Cheng, K.J., Rode, L.M., Milligan, L.P. 1989. Effect of tannin content in two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 69:1031–1039.
- Dewhurst, R.J., Shingfield. K.J., Lee. MRF., Scollan, D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4):168–206.
- Dhawan, O.E and Lavania, U.C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 87: 81-89.
- Escaray, F.J., Menendez, A.B., Gárriz, A., Pieckenstain, F.L., Estrella, M.J., Castagno, L.N., Carrasco, P., Sanjuán, J., Ruiz, O.A. 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science*, 182: 121-133.
- Foo, L.Y, Newman, R., Waghorn, G., Nabb, Mc.WC., Ulyatt. MJ. 1996. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry*, 41:617-624.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, H.C. 2012. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.11, Edinburgh Univ. Pres. Edinburgh.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Sharif, B., 2003. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1): 67–71.
- Jeon, S., Kim, N.H., Koo, B.S., Kimand, J.Y., Lee, A.Y. 2009. *Lotus (Nelumbo nucifera)* flower essential oil increased melanogenesis in normal human melanocytes. *Experimental and Molecular Medicine*, 41(7):517-524.
- Jung, H.A., Kim, J.E., Chung, H.Y., Choi, J.S. 2003. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Archives of Pharmacal Research*, 26:279-85.
- Kamra, D.N., Patra, A.K., Chatterjee, P.N., Kumar, R., Agarwal, N. and Chaudhary, L.C. 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2): 175-178.
- Khalighi-Sigaroodia, F., Ahvazib, M., Hadjiakhoondic, A., Taghizadeha, M., Yazdania, D., Khalighi-Sigaroodid, S. and Bidele, S. 2012. Cytotoxicity and Antioxidant Activity of 23 Plant Species of *Leguminosae* Family. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1): 295-302.
- Kirkbride, J.H.J. 1999. *Lotus* Systematics and Distribution. In *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*, Beuselinck, P. R. ed.; Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, 1999; pp 1-20.
- Koelzer, J., Pereira, D. A., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., Fröde, T. S. 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*, 117: 444–450.
- Koçak, A., Kokten, K., Bagci, E., Akcura, M., Hayta, S., Bakoglu, A. and Kilic, O. 2011. Chemical analyses of the seeds of some forage legumes from Turkey. A chemotaxonomic approach. *Grasas Y Aceites*, 62 (4):383-388.

- Lee, Y.M., Son, E., Kim, S.H., Kim, O.S. and Kim, D.S. 2019. Anti-inflammatory and anti-osteoarthritis effect of *Mollugo pentaphylla* extract. *Pharmaceutical Biology* 57, 1, 74-81.
- Mezrag, A., Mohamed, B., Nicola, M. Massimiliano, D., Aissaoui, M., Lorella, S. 2014. Phytochemical investigation and Cytotoxicity of *Lotus corniculatus*. *Pharmacology Online*, 3:222-225.
- Min, B.R., Attwood, G.T., McNabb, W.C., Molan, A.L., Barry, T.N. 2005. The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 121:45–58.
- Morteza-Semnani, K., Saeedi, M. and Akbarzadeh, M. 2012. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Verbascum thapsus* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(3):373 – 379.
- Nicolic, R., Mitic, N., Ninkovic, S. and Neskovic, M., 2007. Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using adirect shoot regeneration protocol, Stepwise hygromycin B selection, and asuper binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Archives of Biological Sciences*, 59(4): 311-317.
- Özbek, H. 2005. Cinsel ve Jinekolojik Sorunların Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı. *Van Tıp Dergisi*, 12(2):170-174.
- Park, B.K., Kim, C.W., Kwon, J.E., Negi, M., Koo, Y.T., Lee, S.H., Baek, D.H., Noh, Y. H. and Kang, S.C. 2019. Effects of *Lespedeza Cuneata* aqueous extract on testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Pharmaceutical Biology*, 57(1): 90-98.
- Patra, A.K. and Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96:363–375.
- Peiretti, P.G., Gai, F. S., Battelli, A.G., Tassone, S. 2017. Characterization of Alpine highland pastures located at different altitudes: forage evaluation, chemical composition, in vitro digestibility, fatty acid, and terpene contents. *Plant Biosystems*, 151(1), 50–62.
- Pereira, D.A., Dalmarco, J.B., Wisniewski, Jr.A., Simionatto, L., Pizzolatti, M.G. and Fröde, T.S. 2011. *Lotus corniculatus* Regulates the Inflammation Induced by Bradykinin in a Murine Model of Pleurisy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2291–2298.
- Rijke, D.E, Zappey, H., Arise, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. 2004. Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometric and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378:995–1006.
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Ağar, G., Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7): 549–557.
- Tabaeizadeh, Z. 1989. Genetic transformation of a pasture legume, *Lotus corniculatus* L. (bird's-foot trefoil). *Biotechnology Letters*, 11:411-416.
- Torlak, H., Vural, M., Aytaç, Z. 2010. Türkiye'nin Endemik Bitkileri. Kültür ve Turizm Bakanlığı, Ankara, 2010.
- Toth, I., Neculai, D., Dorin, C., Carmen, D., Rechişean, D., Anca, S., Florin, Nec. 2016. Impact of Applying Organic and Mineral Fertilisers on Dry Matter in Bird's-foot-trefoil (*Lotus corniculatus* L.), Scientific Papers. *Animal Science and Biotechnologies*, 49 (2): 91-94.
- Trouillasa, P., Callistea, C.A., Allaisc, D.P., Simon, A., Marfaka, A., Delageb, C., Duroux, J.L. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, 80:399–407.
- Uysal, P. 2014. Memeli Cinsiyet Hormonlarının Gazalboynuzu (*Lotus corniculatus* L.) Bitkisinin in Vitro Rejenerasyonu Üzerine Etkisi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum.
- Üçüncü, O., Baltacı, C., Karataş, Ş.M., Muslu, A., Büyükçekiç, D., Ejderha, H., Özdemir, E.E. 2019. *Galanthus ikariae* Baker Bitkisinin Toprak Üstü Kısımlarının Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri, *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(4): 674-680.
- Walter, E. D. 1961. Isolation of oleanolic acid and saponin from trefoil (*Lotus corniculatus* var. viking). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(2), 173.
- Wang, Y., Douglas, G.B., Waghor, G.C., Barry, T N., Foote, A.G., Purchas, R.W. 1996. Effects of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago sativa*). *The Journal of*

- Agricultural Science- Cambridge Core*, 126: 87–98.
- Wang, Y., Hua, W., Wang, J., Hannoufa, A., Xu, Z., Wang, Z. 2013. Deep sequencing of *Lotus corniculatus* L. reveals key enzymes and potential transcription factors related to the flavonoid biosynthesis pathway. *Molecular genetics and genomics*, 288(3-4): 131-139.
- Wink, M. and Mohamed, G.A. 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequence of the *rbcl* gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(8):897-917.
- Yasser, A.S. and Mohamed, I.S. 2014. Effect of Time Distillation on Chemical Constituents and Anti-Diabetic Activity of the Essential Oil from Dark Green Parts of Egyptian *Allium ampeloprasum* L.. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17 (5):838 – 846.
- Yücel, T. B., Yaylı, N. 2018. GC/MS Analysis and Antimicrobial Activity of The Volatile Compounds From *Dianthus carmelitarum* Reut. ex Boiss and *Dianthus calocephalus* Boiss. Grown in Turkey. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 55(1); 89-94.