



Alınış tarihi(Received): 08.07.2021
Kabul tarihi (Accepted): 02.12.2021

Ornithogalum umbellatum L. Ekstraktının Fitokimyasal İçerikle İlişkili Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Aytül UZUN AKGEYİK¹, Emine YALÇIN^{2,*}, Kültiğin ÇAVUŞOĞLU²

¹ Yozgat Bozok Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Yozgat, Türkiye

² Giresun Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun, Türkiye

*Sorumlu yazar: emine.yalcin@giresun.edu.tr

ÖZET: Bu çalışmada *Ornithogalum umbellatum* L. ekstraktının antibakteriyel ve antifungal aktivitesi araştırılmış ve bu aktivitelerin mekanizması fitokimyasal içerik analizlerinden elde edilen bulgularla ilişkilendirilmiştir. Antibakteriyel aktivite gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı, antifungal aktivite ise *Candida* türlerine karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Ekstraktın fitokimyasal analizi için protein, glukoz, fruktoz, total fenolik, total flavonoid içerikleri test edilmiş, ICP-MS ile makro/mikro element düzeyleri ve LC-MS ile fenolik bileşikler analiz edilmiştir. *O. umbellatum* ekstraktında protein, glukoz, fruktoz, fenolik ve flavonoid içeriği sırasıyla 7.18 mg/mL, 4.67 mg/mL, 3.15 mg/mL 41.63±0.21 µgGAE/mL ve 69.13±0.33 µgKE/mL olarak belirlenmiştir. Biyokimyasal reaksiyonlarda önemli role sahip olan K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn makro/mikro elementlerin; gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit gibi aktif bileşiklerin yoğun miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Test edilen mikroorganizmalara karşı farklı derecelerde antimikrobiyal etkinlik sergileyen *O. umbellatum* ekstraktının genel olarak gram pozitiflerde daha yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. En yüksek antibakteriyel etkinlik 15.9±0.9 mm inhibisyon zonu ile *Staphylococcus aureus*'a karşı elde edilmiştir. Test edilen *Candida* türlerine karşı benzer düzeyde bir inhibisyon sağlayan ekstrakt, antibakteriyel etkinliğe kıyasla daha düşük bir antifungal aktivite sergilemiştir. Genel olarak test edilen tüm mikroorganizmalarda inhibisyon zonu oluşturması ekstraktın geniş spektrumlu özelliğine işaret etmektedir. Sonuç olarak *O. umbellatum* ekstraktı doğal bir antibakteriyel/antifungal kaynaktır ve zengin fitokimyasal içeriği ekstraktın pek çok biyolojik aktivite sergilemesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler-- *Ornithogalum umbellatum* L., fitokimyasal içerik, ICP-MS, LC-MS, antimikrobiyal aktivite

Determination of Phytochemical Content-Related Antimicrobial Activity of *Ornithogalum umbellatum* L. Extract

ABSTRACT: In this study, antibacterial and antifungal activity of *Ornithogalum umbellatum* L. extract was investigated and the mechanism of these activities was associated with the findings obtained from phytochemical content analysis. Antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, and antifungal activity against *Candida* species were investigated using the disc diffusion method. For the phytochemical analysis of the extract, protein, glucose, fructose, total phenolic and total flavonoid contents were tested, macro/micro element levels were analyzed by ICP-MS and phenolic compounds were analyzed by LC-MS. Protein, glucose, fructose, phenolic and flavonoid contents of *O. umbellatum* extract were determined as 7.18 mg/mL, 4.67 mg/mL, 3.15 mg/mL 41.63±0.21 µgGAE/mL and 69.13±0.33 µgKE/mL, respectively. It has been determined that active compounds such as K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn macro/micro elements, which have an important role in biochemical reactions, and active compounds such as gallic acid, procateuic acid and caffeic acid, are present in intense amounts. *O. umbellatum* extract, which exhibited different degrees of antimicrobial activity against the tested microorganisms, had higher antibacterial activity in gram positives in general. The highest antibacterial activity was obtained against *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone of 15.9±0.9 mm. The extract, which provided a similar level of inhibition against the *Candida* species tested, showed a lower antifungal activity compared to the antibacterial activity. In general,

the formation of an inhibition zone against all tested microorganisms indicates the broad-spectrum properties of the extract. In conclusion, *O. umbellatum* extract is a natural antibacterial/antifungal source and its rich phytochemical content contributes to many biological activities of the extract.

Keywords –*Ornithogalum umbellatum* L., phytochemical content, ICP-MS, LC-MS, antimicrobial activity

1. Giriş

İnsanoğlu ilk çağlardan bu yana bitkilerden besin maddesi olarak faydalanmaktadır. Günlük diyetle tüketilen pek çok bitkinin insanlar arasında da çeşitli hastalıklara iyi geldiği dillendirilmektedir. Fakat her bitki içerdiği aktif bileşenlerle yararlı olabileceği gibi zararlı bileşenler de içerebilir. Bu nedenle besin olarak tüketilen her bir bitkinin tıbbi yönden faydaları bilimsel olarak araştırılmalıdır. Bitkilerde bulunan doğal ve aktif bileşenler pek çok fonksiyonel özelliğe sahiptir. Bu fonksiyonel özelliği sayesinde bitkiler hastalıklara karşı koruyucu özellik göstermektedir. Bitkilerin bu özellikleri ilaç endüstrisi, gıda sektörü ve kozmetik alanlarında bitkilerin hammadde olarak kullanılmasını sağlamıştır. Hastalıkların tedavisinde kullanılan pek çok ilaç sentetik ya da bitkisel yapıdadır (Azap ve ark. 2017; Simopoulos ve Gopalan, 2003). Sentetik yapıda olanlar çoğunlukla katkı maddeleri içermektedir ve çeşitli yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle bitkisel aktif bileşenlere ilgi gün geçtikçe artmakta ve günlük diyetle koruyucu özelliği olan bitkilerin kullanımı ile çeşitli hastalıklara yakalanma riski de azaltılabilmektedir. Literatürde hastalıklara karşı korunma amacı ile tüketilen pek çok bitki türünün antimikrobiyal, antioksidan, antiviral, antienflamatuar gibi pek çok etkisi rapor edilmiştir fakat dünyada ve Türkiye’de bitki çeşitliliğinin çok olması bu çalışmalarını yetersiz kılmaktadır (Petrovska, 2012). Bu çalışmada da Karadeniz bölgesinde özellikle Giresun’da, yaygın olarak tüketilen *Ornithogalum umbellatum* L. ekstraktının fitokimyasal analizi, antibakteriyel ve antifungal aktivitesi araştırılmıştır.

Ornithogalum cinsi (Hyacinthaceae, Ornithogaloideae) 200’den fazla soğanlı tür içermektedir ve bu cinse ait türler farklı habitatlarda yetişebilmektedir. Türlerinin çoğu morfolojik, anatomik, ekolojik ve karyolojik düzeyde önemli değişkenlik göstermektedir. Önemli bir *Ornithogalum* türü olan *Ornithogalum umbellatum* L., Carl Linnaeus tarafından tanımlanmıştır. Asparagaceae familyasına ait *O. umbellatum*, eski çağlardan beri yenilebilir bir bitki olarak bilinmektedir. Deniz seviyesinden 1500 m’ye kadar kırlarda, sulu çayırliklarda ve koruluklarda yetişen çok yıllık soğansı bir bitkidir. Toprak altı soğan dokuları 15–25 milimetre uzunluğunda ve 18–32 mm çapına sahiptir. Toprak üstünde 30 cm uzunluğunda ve 12 mm genişliğinde 6-10 arasında yaprak bulunmaktadır. Mart-Mayıs aylarında beyaz renkli ve 6-20 arasında çiçek vermektedir (Yılmaz ve ark. 2004; Demirkol ve ark. 2017). Çiçek durumu yalancı şemsiye, 6-20 çiçekli; çanak ve taç yapraklar 15-21 mm, beyaz, dış kısmı genel olarak yeşil şeritlidir. Yaprakları şeritsi, genellikle çiçek ekseninden daha uzun, 2-4 mm eninde ve tüysüz, üst yüzeyinde tek beyaz çizgili, tam kenarlı ve tüsüzdür.

Farklı bölgelerde *O. umbellatum*’un yaprak, kök, gövde gibi organları besin olarak tüketilmekte ve içerdiği aktif bileşenler nedeniyle de pek çok biyolojik aktivite sergilemektedir. Literatürde *Ornithogalum* türlerinin kimyasal bileşimi pek çok çalışmada araştırılmıştır. Güney Afrika’da yetişen *Ornithogalum thyrsoides*’de sitotoksik aktiviteye sahip spirostanol saponinlere ve kolestan glikozitlere ait bileşiklerin varlığı saptanmıştır (Kuroda, 2004). Bulgaristan’da yetişen *Ornithogalum* türünde kardenolid tipi kardiyak glikozitlerin varlığı saptanmıştır (Buchvarov, 1984). Rat ve ark. (2016) farklı ekolojik

şartlarda yetişen *O. umbellatum* türlerinde fitokimyasal içerik düzeylerinin değiştiğini, genel olarak içerikte gallik asit, klorojenik asit, sinnamik asit gibi fenolik bileşiklere ve kuersetin, rutin, epikateşin gibi flavonoidlerin saptandığını rapor etmişlerdir. Ayrıca düşük ışık yoğunluğuna ve nitrojen seviyesine sahip orman habitatında yüksek fenolik madde üretildiği, asitli topraklarda ve nemli ortamlarda yüksek oranda flavonoid üretildiği tespit edilmiştir. Renda ve arkadaşları (2019) Karadeniz bölgesinden topladıkları üç farklı *Ornithogalum* türünün fitokimyasal içeriğinde protoateşik asit, vanilik asit ve p-kumaridin yoğun olarak bulunduğunu belirlemişlerdir. Literatür çalışmalarında fitokimyasal içerikte saptanan bu farklılıklar farklı bölgelerde yetişen *Ornithogalum* türlerinin buldukları ortama adaptasyonu süresince ürettiği sekonder metabolitlerdeki değişimlerden kaynaklanmaktadır.

Bitkilerin sahip olduğu aktif bileşikler özellikle sekonder metabolitler pek çok biyolojik aktivitenin de ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu nedenle bilimsel araştırmalarda fitokimyasal analizler ve biyolojik aktivite araştırmaları birbirlerini tamamlayan unsurlardır. Özellikle bitkisel ekstraktların fitokimyasal analizi biyolojik aktivitenin mekanizmasının aydınlatılmasında önemli bir adımdır. Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde özellikle Giresun'da, Sakarca olarak bilinen ve soğanları ile toprak üstü kısımları pişirilerek gıda olarak tüketilen *O. umbellatum* ekstraktının antibakteriyel ve antifungal aktivitesi araştırılmış ve bu aktivitelerin mekanizması fitokimyasal içerik analizlerinden elde edilen bulgularla ilişkilendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Örnek Hazırlama ve Ekstraksiyon Çalışmaları

Giresun'da doğal vejetasyonda yetişen *O. umbellatum* bitkisi Mayıs 2019'da tesadüfi örnekleme ile toplanmış ve taksonomik teşhis "Türkiye Florası" na göre yapılmıştır (Davis, 1988). *O. umbellatum* besin olarak tüketilen kök, gövde ve yaprak dokuları temizlenerek, laboratuvar ortamında steril koşullar altında kurutulmuştur. Kurutulan örnekler öğütülerek toz haline getirilmiş ve 2 g öğütülmüş örnek 100 mL metanol içerisinde çalkalamalı inkübatörde 24 saat süre ile oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda katı partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla ekstrakt filtre edilmiş ve elde edilen filtrat 10 dakika süre ile 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında supernatant sıvı faz evaporatör yardımı ile uçurulmuş ve elde edilen ekstraktlar analizler için -18°C'de saklanmıştır (Azap ve ark. 2017).

2.2. Total Protein Tayini

Protein tayini için; 0.5 g ekstrakt 1.5 mL potasyum fosfat tamponunda (0.1 mM, pH = 7.5) çözünmüştür. Konsantrasyonların nicel olarak belirlenmesinde 0.1-1.0 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan sığır serum albümin (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Biüret metoduna göre hazırlanan tüm örneklerin absorbansı 540 nm'de okunmuş ve protein derişimi mg/mL olarak tespit edilmiştir (Zheng ve ark. 2017).

2.3. Çözünür Karbohidrat Analizi

Ekstrakta bulunan çözünür karbohidrat analizi Halhoul ve ark. (1972)'nin önerdiği yönteme göre yapılmıştır. 0.5 mL ekstrakt 2.5 mL taze hazırlanmış antron çözeltisi (150 mg

antron+100 mL H₂SO₄) ile karıştırılmış ve 40°C su banyosunda glukoz tayini için 5 dk., fruktoz tayini için ise 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında soğutulan çözeltilerin absorbansı spektrofotometrik olarak 625 nm dalga boyunda okunmuştur. 0.1 - 0.5 mg/mL anhidroglukoz içeren standartlar ile hazırlanan kalibrasyon eğrilerden yararlanarak toplam karbohidrat miktarı tespit edilmiştir.

2.4. Toplam Fenolik İçerik ve Flavonoid Tayini

O. umbellatum ekstraktlarının fenolik içerik tayini Folin-Ciocalteu metoduna ile tespit edilmiştir. Standart madde olarak kullanılan gallik asidin 5 farklı konsantrasyonu metanol içerisinde hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. 0.5 mL ekstrakt, 2.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ve 7.5 mL Na₂CO₃'den oluşan karışım oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda ekstrakt ve standart madde içeren çözeltilerin absorbansı 750 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Toplam fenolik madde eşdeğer gallik asit olarak değerlendirilmiştir (µg GAE/mL).

Flavonoid tayini için metanol içerisinde *O. umbellatum* ekstraktının ve standart madde olarak kullanılan kateşin çözeltileri hazırlanmıştır. 10 mL örnek ve 1 mL %5 sodyum nitrit karıştırılarak 6 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışıma 1 mL, %10 alüminyum nitrat eklenmiştir. 6 dk'lık ikinci bir inkübasyon sonrasında 10 mL NaOH eklenerek toplam hacim 25 mL olacak şekilde dH₂O eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dk'lık bir inkübasyon sonrasında çözeltiler 510 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Zhishen ve ark. 1999). Flavonoid miktarları µg KE/mL olarak ifade edilmiştir.

2.5. ICP-MS ile Makro ve Mikro Elementlerinin Analizi

ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi) analizi için 0.1 gr örnek mikrodalga çözünürleştirme (Milestone D5, USA) cihazında yakılmıştır. Yakım için mikrodalğanın teflon tüplerine aktarılan numune üzerine 5mL Suprapur Nitrik Asit +2mL Hidrojen Sülfür eklenmiş ve yakım sonrasında ultra saf suyla hacim 50mL'ye tamamlanmıştır. Çalışma parametreleri radyofrekans gücü 1550 W, nebülizör gazı 0.96 L/dk., plazma gazı 0.88 L/dk., nebülizör basıncı 3.01 bar, bekleme süresi 0.01 ms ve püskürtme odası sıcaklığı 3.7°C olarak uygulanmıştır. Her bir element için standartlar hazırlanarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve numuneler analiz edilmiştir.

2.6. LC-MS/MS Analizi

LC-MS (LC-MS/MS çift MS dedektörü) analizi için yaklaşık 2 gram ekstrakt üzerine 4:1 oranında Metanol-Diklorometan (8 mL+2mL) eklenmiştir. Ultrasonik banyoda yaklaşık 120 dakika ekstrakte edildikten sonra 0,45 µm lik şırınga filtresinden süzülen örnekler, LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Analiz ODS HYPERSİL 4,6*250 mm 5µm kolonda, % 0.1 formik asitli su (A) ve metanol çözücüleri kullanılarak, 30°C'de ve 0.7 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL, analiz süresi ise 34 dk olarak gerçekleştirilmiştir.

2.7. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Tayini

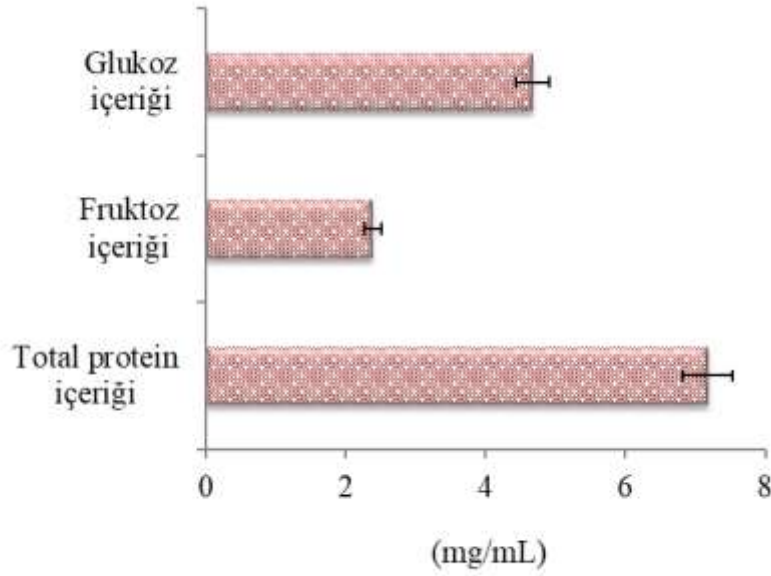
O. umbellatum ekstraktının antibakteriyel aktivitesi gram negatif bakterilerden karşı *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve gram pozitif

bakterilerden *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bakteriler (10^7 - 10^8 adet/mL) Mueller Hinton Agara, funguslar ise Sabouraud Maltoz Agar besiyerine homojen bir şekilde aşılanmıştır. *O. umbellatum* ekstraktları (20 mg/mL) mikropipet ile 6 mm çapındaki boş steril diskler (20 µl/disk) emdirilmiştir. Ekstrakt emdirilmiş diskler mikroorganizma inoküle edilmiş petrilere yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C' de 1 saat bekletildikten sonra bakteriler için 37°C'de funguslar için 27°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirilmiştir. Antifungal aktivite tayininde de disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve ekstraktların etkisi *Candida albicans* FMC 17 ve *Candida krusei* ATCC 6258 türlerine karşı test edilmiştir. Standart olarak Nistatine ve Amikasin antibiyotikleri kullanılmıştır (Yalçın ve ark. 2009).

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Fitokimyasal Analiz

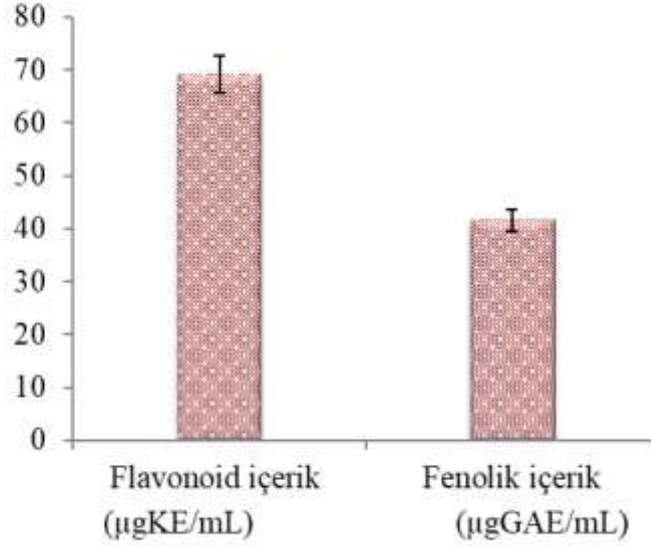
O. umbellatum ekstraktının total protein, glukoz ve fruktoz içeriği Şekil 1'de verilmiştir. Ekstraktta total protein içeriği 7.2 mg/mL olarak saptanırken, glukoz ve fruktoz içerikleri sırasıyla 4.67 mg/mL ve 3.15 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Günümüzde protein ihtiyacının karşılanması genellikle hayvansal proteinlerle sağlanmaktadır fakat artan obezite ve hiperkolesterolemiye bağlı olarak gelişen kardiyovasküler hastalıklar bitkisel proteinlere olan yönelimi de arttırmıştır. Bitkisel proteinler bitki fizyolojisi ve metabolizmasına etki eden depo proteinleridir. Depo proteinlerinin miktarı ve çeşidi, bitkinin protein açısından besleyici değerlerini ve fonksiyonel özelliklerini de belirlemektedir (Çetiner ve Bilek, 2018). Karadeniz bölgesinde, özellikle Giresun'da kök ve yaprak dokuları birlikte tüketilen *O. umbellatum* ekstraktının önemli miktarda protein içerdiği belirlenmiş ve besleyici özelliği doğrulanmıştır. Bitkiler yoğun olarak karbohidrat içermektedir ve bu karbohidratların büyük çoğunluğu selüloz, nişasta gibi çözünmez polisakkarit yapıdadır. Bu çalışmada özellikle çözünabilir karbohidratlardan glukoz ve fruktoz miktarı incelenmiştir. Her iki karbohidrat özellikle enerji metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Yüksek kan glukoz düzeyi leptin ya da insülin salınımını uyararak normal doyumluk cevabını tetiklerken fruktoz bu etkiyi göstermediği için obezite riskini yükseltmektedir. Ayrıca fruktoz alımı visseral adipoz dokuda artışa neden olurken glukoz alımı ise subkutan adipoz dokunun artışına yol açmaktadır (Arslan ve Şanlıer, 2016). Glukoz içeriğine kıyasla daha düşük düzeyde fruktoz içeren *O. umbellatum*'un yüksek protein içeriği sayesinde besleyici değerinin yanında aynı zamanda sağlıklı olduğu da söylenebilir.



Şekil 1. *O. umbellatum* ekstraktının total protein, glukoz ve fruktoz içeriği
Figure 1. Total protein, glucose and fructose content of *O. umbellatum* extract

O. umbellatum ekstraktının total fenolik ve flavonoid içeriği Şekil 2’de verilmiştir. Ekstrakta bulunan total fenolik ve flavonoid içeriği sırasıyla 41.63 ± 0.21 $\mu\text{gGAE/mL}$ ve 69.13 ± 0.33 $\mu\text{gKE/mL}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuç ile ekstrakta flavonoid oranının fenolik bileşiğe kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Fenolik ve flavonoid bileşikler bitkilerde yoğun olarak bulunan antioksidan bileşiklerdir. Bitkisel ekstraktların antioksidan özellik sergilemesinde fenolik ve flavonoid bileşiklerin rolü oldukça yüksektir. Flavonoidler, mikrobiyal enfeksiyona yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlenmektedir ve bu nedenle in vitro olarak çok çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite sergilemektedir. Flavonoidler birçok biyokimyasal özelliğe sahiptir, ancak hemen hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanan özelliği, antioksidan olarak hareket etme kapasiteleridir. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlıdır ve antioksidan mekanizmaları serbest radikal oluşumunun baskılanması ve antioksidan dengenin korunmasını kapsamaktadır (Rice-Evans,1996). *O. umbellatum* ekstraktında yüksek oranda bulunan fenolik bileşikler de serbest radikalleri yok ederek ve lipid peroksidasyonuna neden olan metal iyonları ile şelasyon yaparak antioksidan aktivite sergilemektedirler. Fenolik bileşikler, insan ve hayvan diyetinin önemli bir parçası olan 8000’den fazla farklı bileşiği kapsayan, çeşitli kimyasal yapılara ve farklı biyolojik aktivitelere sahip geniş bir kimyasal maddeler grubunu oluşturmaktadır. Fenolik bileşiklerin bitkilerdeki işlevi çok çeşitlidir. Bu bileşikler radikalik bileşiklere bir hidrojen atomu vererek lipidlerin ve diğer makromoleküllerin oksidasyonunu engellemektedir. Fenolik bileşiklerdeki bu özellikler, kardiyovasküler hastalıklar, gastrointestinal kanser, kolon, meme ve yumurtalık kanserleri ve lösemi gibi nörodejeneratif hastalık risklerinde azalma ile ilişkilidir. Fenolik bileşikler ayrıca anti-allerjenik, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteye de sahiptir (Towers ve Harborne,1964; Shahidi ve ark. 1995). Fenolik ve flavonoid bileşiklerin sahip olduğu biyolojik aktiviteler bulunduğu bitkinin de çeşitli biyolojik etkinlik sergilemesini sağlamaktadır. Rat ve ark. (2016) farklı ekolojik şartlarda yetişen *O.*

umbellatum'un fitokimyasal analizinde 7.55-28.9 mgGAE/g aralığında toplam fenolik madde, 5.9-23.5 mgQE/g aralığında toplam flavonoid bileşik içerdiğini tespit etmişlerdir.

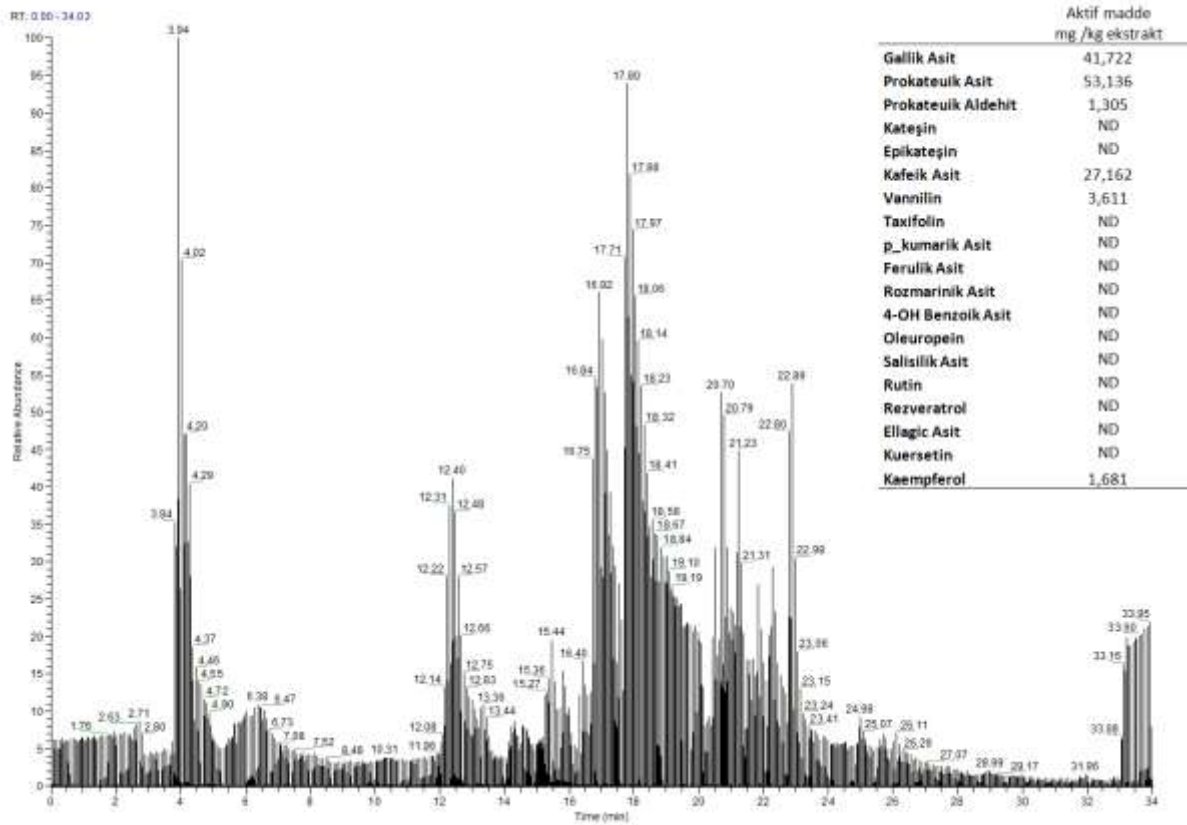


Şekil 2. *O. umbellatum* ekstraktının total fenolik ve flavonoid içeriği
Figure 2. Total phenolic and flavonoid content of *O. umbellatum* extract

3.2. LC-MS/MS Analizi

O. umbellatum ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildiği LC-MS kromatogramı Şekil 3'te verilmiştir. Toplam test edilen 19 fenolik bileşikten 6 bileşiğin varlığı tespit edilmiş, bu sonuç ile fenolik bileşik çeşitliliğinin düşük olduğu saptanmıştır. Ekstrakt içeriğinde majör bileşik olarak gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit bulunurken minör oranda prokateuik aldehit, vannilin ve kaempferol varlığı tespit edilmiştir. LC-MS analizinde *O. umbellatum* ekstraktının maksimum düzeyde prokateuik asit içerdiği saptanmıştır. 500'den fazla bitki türünün içeriğinde bulunan prokateuik asit bulunduğu bitki türlerine çeşitli farmakolojik özellik kazandırmaktadır. Özellikle yüksek oranda antioksidan aktivite sergileyen prokateuik asit, bu aktiviteyi serbest radikal oluşumunu engelleyerek, serbest radikalleri temizleyerek ve serbest radikal reaksiyonlarının katalizörü olan geçiş metal iyonlarını şelatlayarak gerçekleştirmektedir. Antioksidan aktivite yanında aynı zamanda antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antiülser ve antiviral gibi pek çok etkinliğe de sahiptir (Rice-Evans, 1996). Ekstraktta bulunan ve majör fenolik bileşiklerden olan gallik asit, çeşitli bitkilerde, sebzelerde, kabuklu yemişlerde ve meyvelerde bulunan doğal olarak oluşan bir ikincil metabolittir. Gallik asit güçlü antiinflamatuvar, antioksidatif, antitümör, antibakteriyel, antidiyabetik, antiobezite, antimikrobiyal ve antimiyokardiyal iskemi gibi birçok belirgin farmakolojik etkiye sahip düşük moleküler ağırlıklı bir tri-fenolik bileşiktir. Gallik asit bakterilerde hücre zarı pompalarını inhibe ederek antimikrobiyal aktivite sergilemekte ve aynı zamanda antimikrobiyal bileşiklerin etkinliğini de arttırmaktadır (Bai ve ark. 2021). Simoes ve ark. (2009) çeşitli ilaçlara karşı dirençli bakteri suşlarında gallik asidin aktif pompaları inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Major bileşik olarak saptanan diğer bir fenolik madde olan kafeik asit de güçlü biyolojik aktiviteye sahiptir. Ekstrakt

içerisinde tespit edilen kafeik asit, oksidatif stresi azaltan antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın ekspresyonunu artırarak antioksidan aktivite göstermektedir (Jamali ve ark. 2019). Nadanasabapathi ve ark. (2013) kafeik asit ve kafeik asit kombinasyonlarının güçlü serbest radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğunu, lipid peroksidasyonunu azalttığını ve serbest radikal aracılı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini belirtmiştir. Minör bileşik olarak saptanan vanilin aromatik bir halkaya bağlı aldehit, hidroksil ve eter gibi farklı fonksiyonel gruplara sahiptir ve antimikrobiyal, antikanser, nöroprotektif, antibiyotik güçlendirme gibi çeşitli biyoaktif özellikler sergilemektedir (Arya ve ark. 2020). Bir değer minör bileşik olan kaempferol antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser, kardiyoprotektif, nöroprotektif, antidiyabetik, antiosteoporotik, östrojenik/antiöstrojenik, analjezik ve antialerjik aktiviteler dahil olmak üzere çok çeşitli farmakolojik aktiviteye sahiptir (Abo-Salem, 2014). Gallik asit, prokateuik asit, kafeik asit ve kaempferol gibi aktif metabolitlerinin biyolojik aktivitelerinin kümülatif etkilerinin bir sonucu olarak, *O. umbellatum* ekstraktı da pek çok biyolojik aktivite kazanarak tıbbi bitki olarak sınıflandırılabilir.



Şekil 3. *O. umbellatum* ekstraktının LC-MS/MS analizine ait kromatogram
Figure 3. Chromatogram of LC-MS/MS analysis of *O. umbellatum* extract

3.3. Makro ve Mikro Element Düzeyleri

O. umbellatum ekstraktında bulunan bazı makro ve mikro elementlerin düzeylerine ait ICP-MS analiz sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir. *O. umbellatum* bitkisindeki makro ve mikro elementlerin miktarları incelendiğinde yüksek oranda K elementinin olduğu bunu sırayla Ca, Mg, Na, Fe, Zn elementlerinin izlediği tespit edilmiştir. ICP-MS analizi sonucunda K elementi 1836.14 mg/kg, Na 41.95 mg/kg, Ca ise 486.21 mg/kg ekstrakt oranlarında tespit edilmiştir. Literatürde farklı bölgelerde yetişen *O. umbellatum* ekstraktlarında analiz edilen K değerinin ortalama 2188.7 mg/kg - 2560 mg/kg aralığında, Ca değerinin 1280 mg/kg-657.78 mg/kg aralığında bir konsantrasyonda bulunduğu rapor edilmektedir. Na elementinin araştırıldığı çalışmalarda ise 33.49 mg/kg-55 mg/kg aralığında bir konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (Şimşek ve ark. 2017; Güzelsoy ve ark. 2017).

Bu çalışmada, *O. umbellatum* ekstraktında Mg değeri 167.36 mg/kg olarak tespit edilirken literatür çalışmalarında 195 mg/kg-179.64 mg/kg aralığında değerlerde Mg varlığı rapor edilmiştir (Şimşek ve ark. 2017; Güzelsoy ve ark. 2017). *O. umbellatum* ekstraktı ile ilgili gerçekleştirilen literatür çalışmalarında rapor edilen elementler benzerlik gösterirken elementlerin bulunma düzeyinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklar ekstrakte edilen bitkinin kök, gövde ve yaprak gibi farklı organlarının ekstrakte edilmesinden (sadece yaprak, yaprak+çiçek, kök+gövde vs.) kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada *O. umbellatum*’un besin olarak tüketilen kök ve yaprak kısımları birlikte ekstrakte edilmiştir. Ayrıca farklı ekolojik ortamlarda yetişen aynı türlerin içerdikleri fitokimyasal bileşikler ve elementler ortama adaptasyonu süresince gelişen biyokimyasal reaksiyonlara bağlı olarak da değişmektedir. Günlük diyetle tüketilen bitkisel besinler çeşitli düzeyde makro ve mikro elementler içermektedir. Bunlar içerisinde makro elementler diğer tüm elementlere kıyasla yüksek oranda bulunmaktadır. *O. umbellatum* ekstraktında yüksek oranda bulunan K elementi bitkilerde enzim aktivasyonu, fotosentez, stoma aktivitesi ve nişasta sentezi gibi pek çok metabolik yolda önemli bir role sahiptir (Prajapati ve Modi, 2012). Bitkisel gıdaların tüketimi yoluyla insanlara ulaşan K, Na elementi ile birlikte özellikle kalpte, kaslarda ve nöronlarda hücre zarı potansiyeli için gereklidir. Ca, kas kasılması, güçlü kemik ve diş oluşumu, kan pıhtılaşması, sinir uyarısı, iletim, kalp atışının düzenlenmesi ve hücrelerdeki sıvı dengesinde rol oynarken, Mg sinir ve kas fonksiyonunun korunmasında, bağışıklık sisteminin güçlenmesinde ve kan şekeri düzenlenmesi gibi pek çok biyokimyasal yollarda görev almaktadır. *O. umbellatum* ekstraktında tespit edilen bir element olan Fe ise oksijenin taşınması, deoksiribonükleik asit sentezi ve elektron taşınması dahil olmak üzere çok çeşitli metabolik süreçlere katıldığı için hemen hemen tüm canlı organizmalar için temel bir elementtir (Miles ve ark. 2001; Asia ve ark. 2010). Diğer elementler de insan dokularının büyük kısmının sağlıklı ve organize bir şekilde işleyebilmesine katkı sağlamaktadır ve bu kapsamda mikro/makroelementlerin günlük diyetle yeterli düzeyde alınması oldukça önemlidir. ICP-MS analizi ile yüksek oranda makro/mikro element içeriğine sahip olduğu tespit edilen *O. umbellatum*’un besin olarak tüketiminin insan sağlığı açısından faydalı olduğu söylenebilir.

Çizelge1. *O. umbellatum* ekstraktlarının makro/mikro element düzeyleri (mg/kg ekstrakt)
Table 1. Macro/micro element levels of *O. umbellatum* extracts (mg/kg extract)

		Na	Mg	K	Ca	Fe	Zn
	Derişim	41.95	167.36	1836.14	486.21	32.78	7.42
<i>O. umbellatum</i>	SS	0.25	1.40	18.07	8.89	0.13	0.43
	RSD (%)	0.59	0.84	0.98	1.83	0.40	5.78

SS: Standart sapma, RSD: Bağlı standart sapma (%)

3.4. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite

O. umbellatum ekstraktının antibakteriyel aktivitesi gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 2’de verilmiştir. Test edilen tüm bakteri türlerine karşı farklı derecelerde antibakteriyel aktivite elde edilmiştir. En yüksek etkinlik 15.9 ± 0.9 mm inhibisyon zonu ile *Staphylococcus aureusa*’a karşı, en düşük aktivite ise 7.3 ± 0.1 mm inhibisyon zonu ile *Pseudomonas aeruginosa*’ya karşı tespit edilmiştir. Ekstraktın tüm bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluşturması, geniş spektrumlu olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte *O. umbellatum* ekstraktının gram negatiflere kıyasla gram pozitiflere karşı daha yüksek etkinlik sergilediği de belirlenmiştir. Bakterilere karşı oluşan bu seçicilik gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasındaki yapısal farklılıktan kaynaklanmaktadır. Gram negatif bakterilerde hücreyi çevreleyen çift zar, antimikrobiyal bileşiklere karşı oluşan direncin ana nedenidir. Tüm bakteriler bir iç zara sahipken gram negatif bakterilerde seçici özellikte bir dış zar bulunmaktadır. Bu dış zar, pek çok bileşiğin hücre içerisine girmesini engelleyerek sidal etkilere karşı direnç sağlamaktadır. Gram pozitif bakterilerde bu seçici dış zar bulunmadığı için antimikrobiyal bileşikler bu bakterilerde daha yüksek etkinlik göstermektedir. Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarı oldukça gözenekli bir yapıya sahipken gram negatiflerde hücre duvarı yüksek lipid içeriğine sahiptir ve antimikrobiyallerin hücre içine geçişi dış zar proteinlerine bağlıdır (Breijyeh ve ark. 2020). Tüm bu yapısal farklılıklar Gram negatiflerin daha dirençli olmasını sağlamaktadır ve *O. umbellatum* ekstraktının gram pozitifler üzerindeki yüksek etkinliğini de açıklamaktadır.

O. umbellatum ekstraktının antifungal aktivitesi *Candida* türlerine karşı test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 2’de verilmiştir. *O. umbellatum* ekstraktının *Candida krusei* ve *Candida albicans*’a karşı benzer düzeyde bir etki sergilediği tespit edilmiştir. Ekstraktın antifungal aktivitesinin antibakteriyel etkinliğe kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum fungusların özellikle kitin ve ergosterol bakımından zengin hücre duvarı ile yakından ilişkilidir. *Candida* türlerinin antimikrobiyal madde varlığında hücre duvarında kitin seviyeleri arttırarak direnç gelişimini arttırdığı da bilinmektedir (Walker ve ark. 2013).

O. umbellatum ekstraktının antibakteriyel ve antifungal aktivitesi fitokimyasal içeriği ile yakından ilişkilidir. LC-MS analizi ile ekstrakt içeriğinde saptanan aktif bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye katkısı oldukça fazladır. Ekstrakt içeriğinde yoğun olarak bulunan prokateuik asit, bakteri üremesini inhibe ederek ve diğer antimikrobiyal bileşiklerin

sinerjistik etkilerini arttırarak sidal etki göstermektedir (Jayaraman ve ark. 2010). Diğer bir majör fitokimyasal içerik olan gallik asit ise bakterilerde akış pompalarını, folat sentezini ve arginaz aktivitesini inhibe etmektedir (Pudlo ve ark. 2017). LC-MS'te saptanan minör bileşiklerden vanilin ise bakterilerde membran bütünlüğünü bozmakta, hücre içi K iyonlarının hücre dışına sızmasına neden olmakta ve hücre içi pH homeostazını değiştirmektedir (Fitzgerald ve ark. 2004). LC-MS ile varlığı saptanan aktif bileşiklerin farklı mekanizmalarla bakteriler ve funguslar üzerinde sidal etki göstermesi, *O. umbellatum*'un antibakteriyel ve antifungal aktivitesini güçlendirmektedir.

Çizelge 2. *O. umbellatum* ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları

Table 2. Inhibition zones of *O. umbellatum* extract

Mikroorganizma	Ekstrakt İnhibisyon zonu (mm)	Amikasin İnhibisyon zonu (mm)	Nistatine İnhibisyon zonu (mm)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.7±0.3	18.1±0.9	ND
Gram negatif <i>Escherichia coli</i>	8.1±0.4	20.7±0.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.3±0.1	19.6±0.3	ND
<i>Bacillus subtilis</i>	13.2±0.5	17.5±0.1	ND
Gram pozitif <i>Streptococcus pyogenes</i>	11.8±0.4	18.3 ±0.3	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.9±0.9	21.2 ±0.6	ND
<i>Candida krusei</i>	10.6±0.3	ND	19.3 ±0.5
Fungus <i>Candidia albicans</i>	9.1±0.1	ND	17.5 ±0.3

Nistatine (30 µg), Amikasin 30 µg/ml), ND denenmedi

Literatürde de farklı bölgelerden toplanan *O. umbellatum*'un antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. Demirkol ve ark. (2017) Ordu'nun farklı bölgelerinden toplanan *O. umbellatum* ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin toplanan yöreye göre değişiklik gösterdiğini fakat genel olarak *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinin oluştuğunu, toplanan 10 örnekten sadece 2 tanesinin *E. coli*'ye karşı etki gösterirken, *Listeria monocytogenes*'e karşı herhangi bir antimikrobiyal etki gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Yiğit ve ark. (2003) Erzincan bölgesinde yetişen *O. umbellatum*'un klorofom ve metanol ekstraktlarının *P.aeruginosa*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*'a karşı herhangi bir etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

4. Sonuç

Endüstriyel gelişime bağlı olarak çevre kirliliğın ve kimyasallara maruziyetin artması pek çok hastalığın özellikle de kanserin görülme riskini arttırmaktadır. Günlük diyetinde tüketilen bitkisel besinler çeşitli hastalıkların tedavisinde ve hastalıklara yakalanma riskinin azaltılmasında önemli bir role sahiptir. Günümüzde hastalıkların çeşidinin ve sıklığının artması bitkisel kaynaklara olan ilgiyi de arttırmış, bitkisel gıdaların analizine dayalı bilimsel çalışmalar da ivme kazanmıştır. Bu çalışmada da, *O. umbellatum* bitkisinin özellikle besin olarak tüketilen kök, gövde ve yaprak ekstraktlarının fitokimyasal analizi, antibakteriyel ve antifungal etkinliği araştırılmıştır. Biyokimyasal reaksiyonlarda önemli role sahip olan K, Ca, Mg, Na, Fe, Zn makro/mikro elementlerin de yoğun miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. *Candida* türü funguslara, Gram pozitif ve Gram negatif

bakterilere karşı farklı düzeylerde antimikrobiyal etkinliği de tespit edilen *O. umbellatum*'un mikrobiyal enfeksiyonlara karşı koruyucu ve savunma sistemini de güçlendirici etkiye sahip olduğu açıktır. *O. umbellatum*'un biyolojik aktivitesi fiyokimyasal içeriği ile yakından ilişkilidir ve özellikle gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit gibi fenolik bileşikler antimikrobiyal aktivitenin oluşmasında önemli role sahiptir. Doğal, katkı maddesi içermeyen ve yan etkisi olmayan bitkisel gıdaların tüketimi kadar analizi ve biyolojik etkinliklerinin araştırılması da oldukça önemlidir. Doğal ve bitkisel dokuların antioksidatif, antimikrobiyal, antitumör, antiviral ve antikanserijenik gibi etkileri daha çok araştırılmalı ve bu çalışmalar doğal kaynaklara yönelime karşı rehber olmalıdır.

5. Kaynaklar

- Abo-Salem, O. M., 2014. Kaempferol Attenuates The Development of Diabetic Neuropathic Pain in Mice: Possible Anti-inflammatory and Anti-oxidant Mechanisms. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. 2(3), 424-430.
- Arslan, S., Şanlıer, N., 2016. Fruktöz ve Sağlık. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. (9)3, 150- 158.
- Arya, S.S., Sharma, M.M., Rookes, J.E., Cahill, D. M., Lenka, S.K., 2021. Vanilla Modulates the Activity of Antibiotics and Inhibits Efflux Pumps in Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Biologia. 76(2), 781-791.
- Asia, F., Gondal, S., Shahi, Z.A., Ahmad, H.K., Khan, Z.I. 2010. Sodium, Potassium and Magnesium Dynamics in Soil- Plant-Animal continuum. Pakistan Journal of Botany. 42(4), 2411-2421.
- Azap, E., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., 2017. *Smilax excelsa* L. Ekstraktlarının Ames/Salmonella/MiKrozom Test Sistemi İle Antitumör Etkisinin Araştırılması. Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. 5, 622-631.
- Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Yi, Z., Xiaobo, W., Meng, X., 2021. Gallic Acid: Pharmacological Activities and Molecular Mechanisms Involved in Inflammation-Related Diseases. Biomedicine & Pharmacotherapy. 133, 110985.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., Karaman, R., 2020. Resistance of Gram-negative Bacteria To Current Antibacterial Agents and Approaches To Resolve It. Molecules. 25(6), 1340.
- Buchvarov, Y., Balabanova-Radonova, E., Radenkova, I., Vankov, S., 1984. Isolation of Ornithogalum Cardiac Glycosides and Polysaccharides From Species, Growing In Bulgaria. Farmatsiya. 34, 33-37.
- Çetiner, M., Bilek, S.E., 2018. Bitkisel Protein Kaynakları. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi. 33(2), 111-126.
- Davis, P.H., Mill, R.R. Tan, K., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 10, Edinburgh University Press, Edinburgh 164-165.
- Demirkol, M., Çelik, Ö.F., Tarakçı, Z., 2017. Ordu İlinde Yetişen Sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) Bitkisinin Antibakteriyel Aktivitesi ve Toplam Fenolik Madde İçeriği. Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. 7(2), 312-318.
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., Narbad, A., 2004. Mode of Antimicrobial Action of Vanillin Against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology. 97(1), 104-113.
- Güzelsoy, N.A., Uçurum, Ö., Tokat E., Tan, A., Ay, T.S., Özbek K., 2017. Nutritional Properties of Some Wild Edible Plant Species in Turkey. Anadolu J. of Aegean Agricultural Research Institute. 27(2) , 39-45.
- Hahoul, M.N., Kleinberg, I., 1972. Differential Determination of Glucose and Fructose Yielding Substances with Anthrone Analytical Biochemistry. 50, 337-343.
- Jamali, N., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Kasraeian, M., Poordast, T., Ramezani, F., Zare, R., 2019. Combination Effect of Caffeine and Caffeic Acid Treatment on The Oxidant Status of Ectopic Endometrial Cells Separated From Patients With Endometriosis. Iranian Journal of Medical Sciences. 44(4), 315.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M.K., Lim, C.C., Tang, T.H., Sakharkar, K.R., 2010. Activity and Interactions of Antibiotic and Phytochemical Combinations Against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. International Journal of Biological Sciences. 6(6), 556-568.
- Kuroda, M., Mimaki, Y., Ori, K., Sakagami, H., Sashida, Y., 2004. Steroidal Glycosides from the Bulbs of *Ornithogalum thyrsoides*. Journal of Natural Products. 67(10), 1690-1696.

- Miles, P.H., Wilkinson, N.S., McDowell., L.R., 2001. Analysis of Minerals for Animal Nutrition Research, 3rd ed., Department of animal science, University of Florida, Gainesville, USA 117.
- Nadanasabapathi, S., Rufia, J., Manju, V.V. 2013. In Vitro Free Radical Scavenging Activity and Bioavailability of Dietary Compounds Caffeine, Caffeic Acid and Their Combination. International Food Research Journal. 20(6), 3159.
- Petrovska, B.B., 2012. Historical Review of Medicinal Plants' usage. Pharmacognosy Reviews. 6(11), 1.
- Prajapati, K., Modi, H.A., 2012. The Importance of Potassium In Plant Growth—A Review. Indian Journal of Plant Sciences. 1(2-3), 177-186.
- Pudlo, M., Demougeot, C., Girard-Thernier, C., 2017. Arginase inhibitors: A Rational Approach Over One Century. Medicinal Research Reviews. 37, 475–513.
- Rat, M.M., Gavarić, N.S., Kladar, N.V., Andrić, A.M., Anackov, G.T., Bozin, B.N., 2016. The Phenolics Of The *Ornithogalum umbellatum* L.(Hyacinthaceae): Phytochemical and Ecological Characterization. Chemistry & Biodiversity. 13(11), 1551-1558.
- Renda, G., Özel, A., Turumtay, E.A., Barut, B., Korkmaz, B., Ayvaz, M.C., Demir, A., 2019. Comparison of Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Three *Ornithogalum* L. species. Turkish Journal of Biochemistry. 44(3), 299-306.
- Rice-Evans, C.A, Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. Free Radical Biology and Medicine. 20, 933-956.
- Shahidi, F., Nacsk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster 27, 245-278.
- Simopoulos, A.P., Gopalan, C., 2003. Plants in Human Health and Nutrition Policy, 91, Karger, Basel/Switzerland 1-2.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16, 144-158.
- Şimşek, A., Şimşek A., Demirkol, M., Turan, E., 2017. Macro, Trace and Toxic Element of 4 Different Edible Wild Plants From Karadeniz Region. International Journal of Secondary Metabolite. 4(3), 225-237.
- Towers, G.H.N., Harborne, J.B., 1964. Biochemistry of Phenolic Compounds, 176, Academic Press, London UK 249–294.
- Walker, L.A., Gow, N.A., Munro, C.A., 2013. Elevated Chitin Content Reduces The Susceptibility of *Candida* Species To Caspofungin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 57, 146–154.
- Yalçın, E., Ergene, A., Yılmaz, F., 2009. Rafineri Atık Sularından İzole Edilen Mikroorganizmalar İle Biyosülfektan Eldesi: Hemolitik ve Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 21(2), 109-116.
- Yılmaz, N., Deveci, M., Dede, Ö., Şekeroğlu, N., 2004. Ordu ve Giresun İllerinde Doğal Olarak Yetişen Tıbbi Ve Aromatik Bitkilerin Tespiti, Kullanılma Alanları ve Yetiştirme Koşullarının Belirlenmesi. Üçüncü Milli Fındık Şurası. 432-447.
- Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., 2017. Measurement of The Total Protein In Serum By Biuret Method With Uncertainty Evaluation. Measurement. 112, 16-21.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The Determination of Flavonoid Contents On Mulberry And Their Scavenging Effects On Superoxide Radical. Food Chemistry. 64, 555–559.