

## Stenocephalae Bunge. Seksiyonuna Dâhil Olan Türlerin Antidiyabetik, Antimikrobiyal Etkisi ve Fitokimyasal İçeriğinin İncelenmesi

Leyla PAŞAYEVA<sup>1\*</sup>, Ufuk İNCE<sup>2</sup>, Havva KARADELİ<sup>1</sup>, Funda MARAŞLI<sup>1</sup>, Dilbeste ÖZTÜRK<sup>1</sup>,  
Selin URMAK<sup>1</sup>, Osman TUGAY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognози Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 30.09.2022

Kabul Tarihi/Accepted: 23.02.2023

ORCID ID (Yazar sırasına göre / by author order)

[orcid.org/0000-0003-3860-7222](https://orcid.org/0000-0003-3860-7222) [orcid.org/0000-0002-7316-4802](https://orcid.org/0000-0002-7316-4802) [orcid.org/0000-0001-9357-8749](https://orcid.org/0000-0001-9357-8749) [orcid.org/0000-0003-3218-2796](https://orcid.org/0000-0003-3218-2796)

[orcid.org/0000-0002-8731-0743](https://orcid.org/0000-0002-8731-0743) [orcid.org/0000-0001-9093-2669](https://orcid.org/0000-0001-9093-2669) [orcid.org/0000-0003-3980-7648](https://orcid.org/0000-0003-3980-7648)

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: leylapasayeva@erciyes.edu.tr

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, Stenocephalae seksiyonuna dâhil olan *Cousinia davisiana*, *C. foliosa*, *C. ramosissima* ve *C. stenocephala* türlerinin hipoglisemik ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesidir. Çalışma kapsamında bitkilerin toprak üstü kısmı toplandıktan sonra metanol ile oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktların  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glikozidaz inhibitör ve antimikrobiyal etkisi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bitkiler arasında *C. ramosissima* ekstresinin  $246.784 \pm 1.528 \mu\text{g mL}^{-1}$  IC<sub>50</sub> değeri ile diğer ekstraktlara ve akarboza göre daha yüksek  $\alpha$ -amilaz etki ve  $\alpha$ -glikozidaz ( $155.458 \pm 0.279 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) etki, ayrıca çalışılan ekstraktların orta derecede antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur. Bunun dışında aktif bulunan ekstrenin LC-MS/MS ile yapılan inceleme sonucunda fenolik bileşikler ve flavonoidleri yoğun olarak içerdiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ile özellikle *C. ramosissima* ekstresinin etkili  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glikozidaz inhibitör etkiye sahip olduğu ilk kez kanıtlanmakla birlikte, bu ekstraktların postprandiyal glikoz düzeylerini azaltmaya yardımcı olabileceğini göstermek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Cousinia*, Asteraceae, hipoglisemik etki, fenolik bileşikler, flavonoidler

## Investigation of Antidiabetic, Antimicrobial Effects and Phytochemical Composition of The Species From Stenocephalae Bunge. Section

**Abstract:** The aim of this study is to examine the hypoglycemic and antimicrobial effects of *Cousinia davisiana*, *C. foliosa*, *C. ramosissima*, and *C. stenocephala* species, which are included in the Stenocephalae section. Within the scope of the study, after the above-ground parts of the plants were collected, their extracts were prepared by maceration at room temperature with methanol, and the  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, and antimicrobial effects of these extracts were determined. When the results were evaluated, among the plants, the *C. ramosissima* extract was found to be more active in  $\alpha$ -amylase with  $246.784 \pm 1.528 \mu\text{g mL}^{-1}$  values compared to other extracts and higher  $\alpha$ -amylase activity and  $\alpha$ -glucosidase ( $155.458 \pm 0.279 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) effect compared to acarbose. It was also found that the extracts showed moderate antimicrobial activity. Apart from this, it was determined that the active extract contained phenolic compounds and flavonoids intensely as a result of the examination by LC-MS/MS. Although the results of this study prove for the first time that especially *C. ramosissima* extract has effective  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects, further studies are needed to show that these extracts can help reduce postprandial glucose levels.

**Keywords:** *Cousinia*, Asteraceae, hypoglycemic effect, phenolic compounds, flavonoids

## 1. Giriş

Diabetes mellitus, hipergliseminin ve lipit ve protein metabolizmasındaki bozuklukların ortaya çıkması ile meydana gelen insülin eksikliği sendromudur. Diyabetik hastaların tedavisinde esas amaç, erken postprandial hiperglisemiyi azaltmak, geç postprandial hiperglisemiyi kontrol etmektir. Bu kontrolü sadece diyetle sağlayamayan kişilerde karbonhidrat absorpsiyonunu yavaşlatacak ajanların etkili olması mümkündür. Bu nedenle gastrointestinal sistemdeki enzimlerin aktivitesini geçici olarak inhibe edebilen ilaçların postprandial glikoz yükselmeleri üzerinde etkili olması gerekir. Bundan dolayı  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glikozidaz enzim inhibitörleri diyabetik hipergliseminin düzenlenmesinde etkili bir ilaç grubu olarak geliştirilmişlerdir. Bu grup ilaçlar insülin sekresyonu ve insülin etkisi üzerinde doğrudan etkileri olmayıp, daha çok lokal etkileri ile glikozun absorpsiyonunu yavaşlatarak indirekt yoldan hipergliseminin önlenmesine yardımcı olurlar (Skelin ve ark., 2010). Günümüzde sentetik inhibitörlerin kullanımında, diyare, şişkinlik ve karın ağrısı gibi yan etkiler gözlemlendiğinden dolayı doğal inhibitörlerin arayışı sürmektedir.

*Cousinia* Cass. cinsi Asteraceae familyasına dahil olup, yaklaşık 600-700 türle temsil edilmektedir. Türkiye’de ise cinsin 6 seksiyon içinde 38 türü bulunmaktadır. Bunlardan *Stenocephalae* Bunge. seksiyonu ikisi endemik (*Cousinia davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Balansa) toplam dört türle (*C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss.) temsil edilmektedir. Bu seksiyon üyeleri çok yıllık, gövdeleri 15-60 cm, korimboz dallı, genellikle çalimsı olup; çoğunlukla kısa dikenli, çiçekler sarı, pembe ya da kırmızı, nadiren beyaz renktedir (Huber-Morath, 1975). Cinsde dâhil olan bazı türlerin hem Türkiye’de hem de dünya ülkelerinde halk tarafından solunum problemleri, pulmoner enfeksiyonlar, ağız ülseri, diş ağrısı, romatizma gibi birçok hastalığın tedavisinde; ayrıca, ağrıkesici ve yaraların iyileştirilmesinde kullanıldığı bilinmektedir (Singh, 2012; Amiri ve ark., 2014). Öte yandan türlerin sitotoksik, antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik etkilerinin ve fitokimyasal içeriğinin incelendiği çalışmalar literatürde sınırlı sayıda mevcuttur (Paşayeva ve ark., 2020).

Bu çalışmada; *Stenocephalae* seksiyonuna dâhil olan 4 türün topraküstü kısımları kullanılarak metanol ekstraktları hazırlanmış ve bu ekstraktların  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glikozidaz, antimikrobiyal etkisi ve aktif bulunan ekstraktın fitokimyasal kompozisyonu incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Bitkisel materyal

Çalışma kapsamında *C. davisiana* bitkisi Karaman ili Ermenek doğusundan (KNYA 26.976), *C. foliosa* Kahramanmaraş ili Ahir Dağı’ndan (KNYA 26.977), *C. ramosissima* Şanlıurfa ve Birecik çevresinden (KNYA 26.978) ve *C. stenocephala* bitkisi Şanlıurfa ili Ceylanpınar çevresinden toplanarak; teşhisi, Prof. Dr. Osman Tugay tarafından yapılmıştır. Bitkilere ait herbaryum örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesine ait herbaryumda muhafaza edilmektedir.

### 2.2. Ekstraksiyon

Bitkilerin toprak üstü kısımları kurutulduktan sonra değirmen yardımıyla öğütülerek toz haline getirilmiş; daha sonra, metanol ile oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstreler, ayrı ayrı süzülükten sonra; çözücülerini rotavaporoda 38 °C’de düşük basınç altında uçurulmuş ve böylelikle ham metanol ekstraktları [*C. davisiana* (CD), *C. foliosa* (CF), *C. ramosissima* (CR), *C. stenocephala* (CS)] elde edilmiştir. Rotavaporoda kuruluğa kadar uçurulan ekstraktlar liyofilize edilerek çalışmalara bu ekstraktlar üzerinden devam edilmiştir. Çalışma anına kadar ekstraktlar -20 °C’de saklanmıştır.

### 2.3. $\alpha$ -Amilaz inhibitör aktivitesi

Ekstrelerin  $\alpha$ -amilaz önleyici aktivitesi, Hasenah ve ark. (2006) metoduna göre küçük değişikliklerle gerçekleştirilmiştir (Ali ve ark., 2006). Bu kapsamda 40  $\mu$ l’lik değişen konsantrasyonlarda ekstre, 160  $\mu$ l fosfat tamponu (100 mM, pH= 6.8) ve 400  $\mu$ l nişasta tüpte karıştırılmıştır. Daha sonra, 200  $\mu$ l enzim (4 U ml<sup>-1</sup>) ilavesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Tüp 25 °C’de, 3 dakika inkübe edilmiş; ardından 200  $\mu$ l DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) renk reaktifi (5.31 M sodyum potasyum tartarat, 2 M NaOH ve 96 mM 3,5-dinitrosalisilik asit) ilave edilip ve 15 dakika 85 °C’de inkübe edilerek 1800  $\mu$ l distile su ilavesinden sonra ortaya çıkan karışımın absorbansı, 540 nm’de ölçülmüştür. Çeşitli konsantrasyonlarda (0.1-0.5 mg mL<sup>-1</sup>) akarboz standart olarak kullanılmıştır. Ekstreler olmaksızın kontrol hazırlanmış ve her deney üçlü tekrar halinde yapılmıştır.

### 2.4. $\alpha$ -Glikozidaz inhibitör aktivitesi

Ekstrelerin  $\alpha$ -glikozidaz önleyici aktivitesi standart yöntemle küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Ali ve ark., 2006). Buna göre, 96 kuyucuklu bir plakada 50  $\mu$ l fosfat tamponu (100

mM, pH= 6.8), 10 µl α-glikozidaz (1 U mL<sup>-1</sup>) ve 20 µl'lik değişen konsantrasyonlarda ekstre ve fraksiyonlar, 37 °C'de 15 dakika preinkübe edilmiştir. Ardından substrat olarak 20 µl p-NPG (5 mM) ilave edilmiş ve 20 dakika boyunca 37 °C'de tekrar inkübe edilmiştir. Reaksiyon 50 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M) ilave edilerek durdurulmuştur. Açığa çıkan p-nitrofenolün absorpsiyonu 405 nm'de multiplaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Çeşitli konsantrasyonlarda (0.1-0.5 mg mL<sup>-1</sup>) akarboz standart olarak kullanılmıştır. Ekstreler olmaksızın kontrol hazırlanmış ve her deney üçlü tekrar halinde yapılmıştır.

### 2.5. Antimikrobiyal etki

Çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 (sırasıyla Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler) ve *Candida albicans* ATCC 10231 (maya mantarı) ile bu mikroorganizmaların klinik izolatlarının bitki ekstrelerine duyarlılıkları araştırılmıştır. Çalışma; bakteriler için Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S28 protokolüne (Anonymous, 2021) ve mantarlar için CLSI M27-A3 protokolüne (Anonymous, 2008) göre yürütülmüştür.

Ekstrelerin mikroorganizmalara karşı potansiyel antimikrobiyal aktivitesini araştırmak amacıyla bakterilerin üremesi için Mueller Hinton Broth (MHB) ve mantarlar için RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium)-1640 besiyerleri kullanılmıştır.

Öncelikle, 96 kuyucuklu mikropalakadaki her bir kuyucuğa sıvı besiyerleri ilave edilmiştir. Hemen ardından, % 10'luk DMSO (dimetil sülfoksit)'da çözündürülen her bir ekstre'nin seri dilüsyonu (512-2 µg mL<sup>-1</sup>) hazırlanmıştır. Çalışmadaki mikroorganizmaların her birinin süspansiyonu ise McFarland:0.5 standardı kullanılarak hazırlanmış ve her bir kuyucuğa nihai yoğunluğu 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup> olacak şekilde inoküle edilmiştir. Bakteri içeren mikropalakalar 37 °C'de 24 saat ve mantar içeren mikropalakalar da 35 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Referans antibiyotikler ve antifungal aynı mikroorganizmalara karşı kontrol amaçlı test edilmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmaların üreme kontrolü ve besiyerlerinin sterilizasyon kontrolü de yapılmıştır. Çözücü olarak kullanılan % 10'luk DMSO'nun potansiyel antimikrobiyal aktivitesi de bu çalışmada kontrol edilmiştir. İnkübasyon sonrası makroskopik olarak mikrobiyal üremenin olmadığı son kuyucuk, her bir ekstre için Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak tayin edilmiştir. Makroskopik olarak üremeyi kontrol amacıyla MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium

bromide] yöntemi kullanılmıştır (Shi ve ark., 2007). Deney üç kez tekrarlanmıştır.

### 2.6. Fitokimyasal içerik analizi

Çalışma kapsamında aktif bulunan ekstre'nin fitokimyasal içeriğinin belirlenmesi amacıyla Elektron Sprey İyonlaşmalı (ESI) LC-MS/MS (Shimadzu LC-MS/MS-8040) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ekstre metanolde çözülerek 10 ppm konsantrasyonda cihaza uygulanmıştır. Çalışmada hareketli faz olarak A: asetonitril ve B: % 0.1 formik asit kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür verileri ve bileşiklerin kütle kütüphanesi [NIST/WILEY mass spectral database (version 2.3, USA)] ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

ESI-LC-MS/MS cihazının çalışma şartları; kolon sıcaklığı= 40 °C, kütle aralığı= m z<sup>-1</sup> 100-2000, kurutma sıcaklığı= 200 °C, nebulizer basıncı= 40 psi, kurutma gazı= 15 mL dak<sup>-1</sup>, kapiler voltaj= 4 kV, enjeksiyon hacmi= 1 µL, hareketli faz= A: asetonitril B: metanol ve % 0.1 formik asit, iyonlaştırma turu= ESI -/+.

### 2.7. İstatiksel analiz

Tüm ölçümler üçer kez yapılarak ve sonuçlar ortalama ± standart sapma (SS) cinsinden ifade edilmiştir. Analizler GraphPad Prism8 (Graphpad yazılımı, ABD) istatistiksel yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı değerler, one-way ANOVA Tukey's post hoc testi kullanılarak karşılaştırılmış ve 0.05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Dixon ve ark., 1951).

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. α-Amilaz ve α-glikozidaz aktivite sonuçları

Ekstrelerin α-amilaz inhibitör aktivitesi tayini deneyine ait IC<sub>50</sub> değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde ekstreler arasında CR ekstresinin (IC<sub>50</sub>= 246.784±1.528 µg mL<sup>-1</sup>) standart olarak kullanılan akarbozdan (IC<sub>50</sub>= 276.145±0.789 µg mL<sup>-1</sup>) daha etkili olduğu belirlenmiştir. CR ekstresini, CF ve CD ekstreleri izlerken; en düşük aktivitenin, CS ekstresinde olduğu görülmüştür (Tablo 1).

Ekstrelerin α-glikozidaz inhibitör aktivitesi tayini deneyine ait sonuçlar incelendiğinde, ekstrelerden hiçbirinin standart olarak kullanılan akarboza (IC<sub>50</sub>= 147.701±2.011 µg mL<sup>-1</sup>) kıyasla daha yüksek etki gösteremedikleri belirlenmiştir. Ancak hazırlanan ekstreler kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek α-glikozidaz inhibitör etkisinin CR ekstresinde (p<0.001; IC<sub>50</sub>= 155.458±0.279 µg mL<sup>-1</sup>) olduğu

gözlenmiştir. Ekstreler arasında CS ekstresinin ise en yüksek konsantrasyonda bile (1000 µg mL<sup>-1</sup>) inhibisyonu % 50'nin altına indiremediği görülmüştür. Çalışılan ekstreler birbiri arasında ve akarboz ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 1).

**Tablo 1. Ekstrelerin α-amilaz ve α-glikozidaz inhibitör etkisine ait IC<sub>50</sub> değerleri**

Table 1. IC<sub>50</sub> values of extracts for α-amylase and α-glucosidase inhibitory effect

Ekstreler	α-amilaz (IC <sub>50</sub> ) (µg mL <sup>-1</sup> )	α-glikozidaz (IC <sub>50</sub> ) (µg mL <sup>-1</sup> )
CD	615.316±3.826**	344.296±2.066**
CF	583.225±0.936**	406.179±1.035**
CR	246.784±1.528***	155.458±0.279***
CS	1012.601±1.986*	-
Akarboz	276.145±0.789	147.701±2.011

Ortalama ± SS olarak verilen değerler ±% 95 güven aralığında belirtilmiştir. \*: p<0.5, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 düzeyinde önemli farklılık

### 3.2. Antimikrobiyal aktivite sonuçları

Dört farklı *Cousinia* türünden elde edilen ekstrelerin ve referans antimikrobiyallerin MİK değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, ekstrelerin farklı suşlara karşı genel olarak 256-128 µg mL<sup>-1</sup> MİK değeri ile orta düzeyde antibakteriyel etki gösterdiği halde, CR ekstresinin *C. albicans* ve izolatına karşı 64 µg mL<sup>-1</sup> MİK değeri ile daha yüksek antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak hiçbir ekstrenin referans antimikrobiyaller olarak kullanılan maddeler kadar etkili olmadığı görülmüştür (Tablo 2).

**Tablo 2. Ekstre ve referans antimikrobiyallerin in vitro MİK değerleri (µg mL<sup>-1</sup>)**

Table 2. In vitro MIC values of extracts and reference antimicrobials (µg mL<sup>-1</sup>)

Ekstreler	Mikroorganizmalar					
	S.a.	S.a.*	E.c.	E.c.*	C.a.	C.a.*
CD	256	128	128	256	128	256
CF	256	128	128	128	128	256
CR	256	256	128	128	64	64
CS	256	256	128	128	128	128
Ampicilin	2	32	16	16	-	-
Gentamycin	1	8	1	16	-	-
Vancomycin	1	4	-	-	-	-
Fluconazole	-	-	-	-	1	1

S.a.: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, S.a.\*: *S. aureus* izolatı (MRSA), E.c.: *E. coli* ATCC 25922, E.c.\*: *E. coli* izolatı (geniş spektrumlu β-laktamaz enzimi içerir -GSBL-), C.a.: *Candida albicans* ATCC 10231, C.a.\*: *Candida albicans* izolatı

### 3.3. LC-MS/MS analiz sonuçları

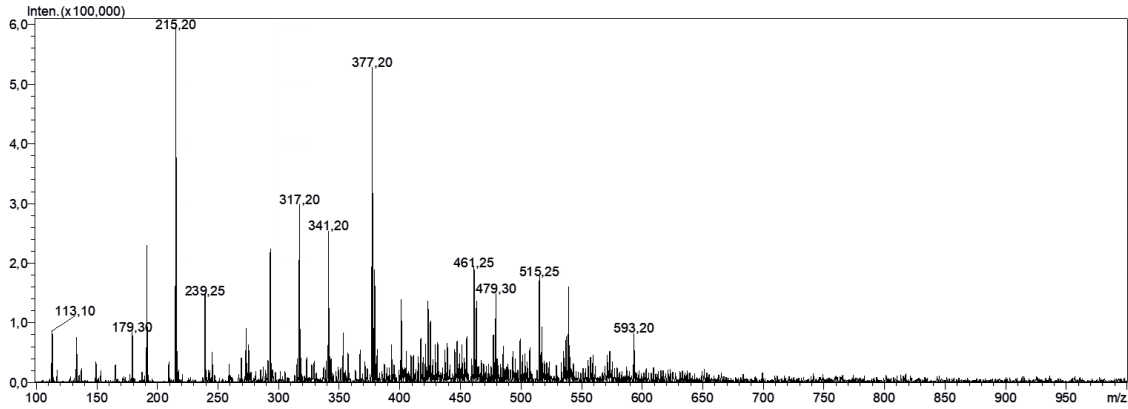
Çalışma kapsamında aktif bulunan CR ekstresine ait kütle spektrumu Şekil 1'de, spektrumlarda bulunan piklere ait ana fragmentasyonlar Tablo 3'te verilmiştir. Sonuçlara göre

ekstrede fenolik asit ve flavonoidler ağırlıklı olarak bulunmakta ve bu bileşiklerin etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Literatürde *Cousinia* türleri ile yapılan enzim inhibisyon deneyleri yok denecek kadar az olmakla birlikte; yapılan bir çalışmada, *C. iconica* bitkisinin etil asetat alt ekstresinin 864.57 ± 0.68 µg mL<sup>-1</sup> IC<sub>50</sub> değeri ile CR ekstresine göre daha düşük α-amilaz inhibitör etki gösterdiği görüldüğü; bitkiden hazırlanan ekstrelerin IC<sub>50</sub> değeri hesaplanamayacak derecede düşük α-glikozidaz inhibitör etkisine sahip olduğu görülmüştür. Öte yandan bitkinin daha aktif bulunan ekstresinin sinarin ve rutin bileşiklerince zengin olduğu bildirilmiştir (Paşayeva ve ark., 2021). Yapılan bir diğer çalışmada *C. aintabensis* BOISS. & HAUSSKN. bitkisinden elde edilen etil asetat ekstresinin diğer ekstrele göre daha yüksek α-glikozidaz ve α-amilaz inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (sırasıyla, IC<sub>50</sub>= 0.361±0.010 ve 1.010±0.010 mg mL<sup>-1</sup>). Aynı çalışmada, LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre ise ekstrenin içerdiği majör bileşikler sinarin ve izoramnetin-3-O-rutinozid olarak belirlenmiştir (Yılmaz ve ark., 2022). Her iki çalışmadan elde edilen verilerle bu çalışmanın sonuçları kıyaslandığında *C. ramosissima* ekstresinin daha yüksek α-amilaz ve α-glikozidaz inhibitör etki gösterdiği görülmektedir.

Antimikrobiyal etki ile ilgili literatür verileri değerlendirildiğinde; bir çalışmada, *C. microcarpa* bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanan kök ekstrelerinin gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak su ekstresi dışında diğer ekstrelerin gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyel etkisi tespit edilirken, gram negatif bakterilere karşı etki etmediği gözlenmiştir. Özellikle, kloroform ekstresinin 8 ve 12 µg mL<sup>-1</sup> MİK değeri ile diğer ekstrele göre *S. aureus* ve *B. subtilis* suşlarına karşı daha etkili olduğu bulunmuştur (Amiri ve ark., 2014).

Bir başka çalışmada, *C. onopordioides*, *C. rechingerae*, *C. hypopolia*, *C. shulabadensis*, *C. phyllocephala*, *C. smirnoviive* ve *C. verbascifolia* bitkilerinin antibakteriyel etkilerini incelemek amacıyla gram pozitif (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve gram negatif (*Escherichia coli* ve *Salmonella typhi*) bakteriler üzerinde testler yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda çalışılan ekstreler arasında sadece *C. phyllocephala* ekstresinin gram pozitif bakterilere karşı 4 µg mL<sup>-1</sup> MİK değeri ile daha etkili olduğu bulunmuştur (Shahverdi ve ark., 2007).



Şekil 1. CR ekstresine ait kütle spektrumu  
Figure 1. Mass spectrum of CR extract

Tablo 3. CR ekstresinde tespit edilen bileşiklerin kütle değerleri ve MS/MS fragmanları  
Table 3. Mass and MS/MS fragments of compounds determined in CR extract

[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragment iyonlar m/z	Bileşik adı	Kaynak
179	135, 87	Kafeik asit	Yılmaz ve ark. (2022)
609	301	Rutin	Yılmaz ve ark. (2022)
377	341, 215, 179, 161, 119	Kafeik asit türevi-I	Riethmüller ve ark. (2013)
191	191, 93, 85	Kinik asit	Clifford ve ark. (2003)
353	191	Klorojenik asit	Clifford ve ark. (2003)
341	179, 135	Kafeik asit 3-O glikozit	Paşayeva ve ark. (2021)
515	353, 191, 179	Sinarin	Paşayeva ve ark. (2021)
133	115	Malik asit	González-Caballero ve ark. (2011)
593	285, 255	Kemferol kumaroil hekzozit	Simirgiotis ve Schmeda-Hirschmann (2010)
461	285	Luteolin 7-O-glukuronit	Paşayeva ve ark. (2021)
623	315	Izoramnetin 3-O-rutinozid	Paşayeva ve ark. (2021)
499	173, 164, 163, 93	3-O-kafeoil-4-O-p kumaroilkinik asit	Gouveia ve Castilho (2012)
479	316, 271	Mirisetin-3-O-β-D galaktopiranozid	Saldanha ve ark. (2013)
317	-	Mirisetin	Saldanha ve ark. (2013)

Bir diğer çalışmada ise, *C. harazensis* ve *C. calocephala* bitkilerinin metanol ekstrelerinin gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Kocuriza rhizophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurim*) bakterilerine karşı etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 500-62.5 mg mL<sup>-1</sup>'lik konsantrasyonlarda hazırlanmış ekstreler suşlara uygulanarak inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Ekstreler kıyaslandığında en iyi sonucun *C. harazensis* ekstresinin *S. epidermidis* suşuna karşı 15.62 mg mL<sup>-1</sup> MİK ve *P. aeruginosa* ve *S. enterica* suşlarına karşı 62.5 mg mL<sup>-1</sup> MBK (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) değeri ile etkili olduğu belirlenmiştir (Salimi-Sabour ve ark., 2021). Behlil ve ark. (2019), *C. stocksii*, *Eremostachys thyrsoflora* ve *Gaillonia macrantha* bitkilerinin metanol ekstrelerinin antibakteriyel aktivitelerini gözlemek amacıyla gram pozitif (*Staphylococcus aureus*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella*

*pneumoniae*) bakteriler üzerinde antimikrobiyal testler yapılmıştır. Çalışmada agar metodu ve pozitif kontrol olarak amoksisilin kullanılmıştır. Sonuç olarak *C. stocksii* ekstresinin özellikle *K. pneumoniae* suşuna karşı daha etkili olduğu görüldükçe (21 mm zon çapı), *E. thyrsoflora* ekstresinin hem *K. pneumoniae* (21 mm zon çapı), hem de *S. aureus* suşlarına karşı etkili olduğu görülmüştür (22 mm zon çapı).

Literatürdeki bu çalışmalar ile çalışmamız sonuçları göz önüne alındığında, özellikle literatürdeki verilerin oldukça değişken olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamız sonucunda test edilen ekstrelerin genel olarak orta düzeydeki antimikrobiyal etkisi ve özellikle CR ekstresinin nispeten iyi derecedeki antifungal etkisinin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak hem α-amilaz, α-glikozidaz enzimlerini inhibe etme ve hem de antimikrobiyal etki açısından yüksek etkiye sahip ekstrenin CR ekstresi olduğu görülmüş ve bu etkinin ekstrenin içerdiği bileşiklerden kaynaklanabileceği

düşünülmüştür. Nitekim belirlenen bileşiklerden kafeik asit, rutin, klorojenik asit, sinarin, mirisetin gibi bileşiklerin yüksek  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glikozidaz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Funke ve Melzig, 2005; Oboh ve ark., 2015a,b; Meng ve ark., 2016). Yapılan çalışmalardan da görüldüğü üzere özellikle yüksek inhibisyon etki gösteren ekstrelerin majör bileşikleri *C. iconica* bitkisi için sinarin ve rutin, *C. aintabensis* bitkisi için ise sinarin ve izoramnetin 3-O-rutinozit olarak belirlenmiştir (Paşayeva ve ark., 2021; Yılmaz ve ark., 2022). Bu verilerden yola çıkarak *C. ramosissima* bitkisinin de yüksek hipoglisemik etkisinin sinarinden kaynaklandığı söylenebilir.

#### 4. Sonuçlar

Sonuç olarak bu çalışma ile yüksek endemizm oranına sahip *Cousinia* cinsine ait türlerden *C. ramosissima* türünün önemli ölçüde in vitro antidiyabetik etkiye sahip olduğu görülmüş ve etkiden sorumlu bileşikler belirlenerek standardizasyon çalışmalarına yön verebileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu ekstrelin toksisite çalışmaları ile hayvan modelinde antidiyabetik etkisi de ileri çalışmalarla desteklenmelidir.

#### Yazarların Katkı Beyanı

Yazarlar; makaleye eşit katkıda bulduklarını, makalenin yayına hazır son halini gördüklerini/okuduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

#### Finansman

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2209/A nolu ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından TLO-2021-11460 nolu proje ile desteklenmiştir.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

#### Kaynaklar

Ali, H., Houghton, P., Soumyanath, A., 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 449-455.

Amiri, M.S., Hosseini, H.A., Rajai, P., 2014. Preliminary investigation on phytochemical composition and antibacterial activity of the root of *Cousinia microcarpa* Boiss. *Asian Journal of Medical and Pharmaceutical Researches*, 4(4): 156-159.

Anonymous, 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute Document, M27-A3 and Supplement S, 3, 6-12.

Anonymous, 2021. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Behlil, F., Samiullah, K.N., Akbar, A., Tareen, R.B., Achakazai, A.K.K., Ali, I., Rehman, A., 2019. Phytochemical screening and antioxidant activity determination of some medicinally important plants of Balochistan. *Pakistan Journal of Botany*, 51(2): 1-8.

Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N., 2003. Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10): 2900-2911.

Dixon, W.J., Massey, Jr., Frank, J., 1951. Introduction to Statistical Analysis. McGraw-Hill.

Funke, I., Melzig, M., 2005. Effect of different phenolic compounds on  $\alpha$ -amylase activity: Screening by microplate-reader based kinetic assay. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(10): 796-797.

González-Caballero, V., Pérez-Marín, D., López, M.-I., Sánchez, M.-T., 2011. Optimization of NIR spectral data management for quality control of grape bunches during on-vine ripening. *Sensors*, 11(6): 6109-6124.

Gouveia, S.C., Castilho, P.C., 2012. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48(2): 712-724.

Hasenah, P., Houghton, J., Soumyanath, A., 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(3): 449-455.

Huber-Morath, A., 1975. *Cousinia*. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 5: 329-353.

Meng, Y., Su, A., Yuan, S., Zhao, H., Tan, S., Hu, C., Deng, H., Guo, Y., 2016. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4): 444-449.

Oboh, G., Ademosun, A.O., Ayeni, P.O., Omojokun, O.S., Bello, F., 2015a. Comparative effect of quercetin and rutin on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5): 1103-1110.

Oboh, G., Agunloye, O.M., Adefegha, S.A., Akinyemi, A. J., Ademiluyi, A.O., 2015b. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 26(2): 165-170.

- Paşayeva, L., Eruygur, N., Ayaz, F., Tugay, O., Fatullayev, H., 2021. Assessment of the antioxidant and enzyme inhibition activities of *Cousinia iconica* with focus on phytochemical investigation by LC-MS/MS. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(6): 1178-1188.
- Paşayeva, L., Kararenk, A.C., Koşar, M., 2020. *Cousinia* Cass. cinsinin geleneksel kullanımı, fitokimyasal içeriği ve biyolojik etkileri. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(2): 293-307.
- Riethmüller, E., Alberti, Á., Tóth, G., Béni, S., Ortolano, F., Kéry, Á., 2013. Characterisation of diarylheptanoid-and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS. *Phytochemical Analysis*, 24(5): 493-503.
- Saldanha, L.L., Vilegas, W., Dokkedal, A.L., 2013. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*, 18(7): 8402-8416.
- Salimi-Sabour, E., Shirazi, F.H., Mahboubi, A., Mojab, F., Irani, M., 2021. Biological Activities and the Essential Oil Analysis of *Cousinia harazensis* and *C. calocephala*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(3): 140.
- Shahverdi, A.R., Khorramizadeh, M.R., Attar, F., Saadat, F., Vahid, S., Ghahraman, A., 2007. Concomitant chemopreventive and antibacterial effects of some Iranian plants from the genus *Cousinia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 325-330.
- Shi, L., Ge, H.-M., Tan, S.-H., Li, H.-Q., Song, Y.-C., Zhu, H.-L., Tan, R.-X., 2007. Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(4): 558-564.
- Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD-ESI-MS and free radical quenching techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6): 545-553.
- Singh, K.N., 2012. Traditional knowledge on ethnobotanical uses of plant biodiversity: a detailed study from the Indian western Himalaya. *Biodiversity Research and Conservation*, 28: 63.
- Skelin, M., Rupnik, M., Cencič, A., 2010. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 27(2): 105-113.
- Yılmaz, F.K., Paşayeva, L., Tugay, O., 2022. LC-ESI-MS/MS-based phytochemical profile, antioxidant and enzyme inhibition activities of extracts from *Cousinia aintabesis* Boiss. & Hausskn. *Farmacia*, 70(2): 287-294.

**ALINTI:** Paşayeva, L., İnce, U., Karadeli, H., Maraşlı, F., Öztürk, D., Urmak, S., Tugay, O., 2023. Stenocephalae Bunge. Seksiyonuna Dâhil Olan Türlerin Antidiyabetik, Antimikrobiyal Etkisi ve Fitokimyasal İçeriğinin İncelenmesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 10(1): 11-17.

**CITATION:** Paşayeva, L., İnce, U., Karadeli, H., Maraşlı, F., Öztürk, D., Urmak, S., Tugay, O., 2023. Investigation of Antidiabetic, Antimicrobial Effects and Phytochemical Composition of The Species From Stenocephalae Bunge. Section. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 10(1): 11-17. (In Turkish).