

***Peganum harmala* L. (Nitrariaceae) Bitkisinin α -Amilaz ve α -Glukozidaz Enzim İnhibisyon, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi**

Hafize YUCA¹, Bilge AYDIN^{1,2}, Enes TEKMAN^{3,4}, Gamze GÖGER⁵, Songül KARAKAYA^{3*}, Zühal GÜVENALP¹, Ayşe Mine GENÇLER ÖZKAN⁴

¹Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD, Erzurum, Türkiye

²Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD, Erzincan, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik AD, Erzurum, Türkiye

⁴Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik AD, Ankara, Türkiye

⁵Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi AD, Edirne, Türkiye

*sorumlu yazar: songul.karakaya@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi: 16.06.2022 Düzeltme Geliş Tarihi: 03.08.2022 Kabul Tarihi: 05.08.2022

Öz

Peganum harmala (Nitrariaceae) önemli bir tıbbi bitkidir. Türkiye'de halk arasında "üzerlik" olarak bilinen ve nazarlık olarak kullanılan *P. harmala*, ilk defa Dioscorides tarafından "Moly" olarak adlandırılmıştır. Bu çalışmada, bitkinin meyve ve herbasından hazırlanan metanolik ekstraktların α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan aktivite *in vitro* DPPH* ve ABTS** süpürücü aktivite deneyleri ile ölçülmüş, aynı zamanda ekstraktların içerdiği total fenolik bileşen miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden tespit edilmiştir. DPPH* süpürücü kapasite deneyinde 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de en yüksek aktiviteyi standart maddeler trolox (TR) ve α -tokoferol (TK) gösterirken; meyvenin (M) herbaya (H) göre daha iyi etki gösterdiği kaydedilmiştir [(TR) % 91.4>(TK) % 45.5>(M) % 9.4>(H) % 8.3]. ABTS** süpürücü aktivite deneyinde de sonuçlar (TR) % 97.1>(TK) % 90.1>(M) % 10.3>(H) % 9.1 şeklinde kaydedilmiştir. Total fenolik bileşen miktarı değerlendirildiğinde meyve içeriğinin, herbaya göre daha zengin olduğu tespit edilmiştir [(M)74.9>(H)73.3 μg GAE/mg ekstre]. Antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei* suşlarına *in vitro* mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. α -Glukozidaz inhibisyon deneyinde 5 mg/mL 'de meyve % 36 oranında etki gösterirken (IC_{50} = 6907 $\mu\text{g}/\text{mL}$); akarboz % 63 inhibisyon göstermiştir (IC_{50} = 4738 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Herba hiçbir konsantrasyonda etki göstermemiştir. α -Amilaz enzim inhibisyonu deneyinde ise 5 mg/mL 'de inhibisyon sıralaması şöyledir: akarboz (% 59)> herba (% 32)> meyve (% 29). Meyve ve herbasının en etkili olduğu maya *C. tropicalis* olup, Mik değeri her ikisi için de 160> $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak elde edilmiştir. Bu nedenle *P. harmala*'nın antidiyabetik ve antimikrobiyal olarak kullanılabilirliği ve sentetik ilaçlara karşı bitkisel alternatif olabileceği sonucuna varılabilir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Antimikrobiyal, α -Amilaz, α -Glukozidaz, *Peganum harmala*, Nitrariaceae.

Evaluation of α -Amylase and α -Glucosidase Enzyme Inhibition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Peganum harmala* L. (Nitrariaceae)

Abstract

Peganum harmala (Nitrariaceae) is an important plant. It is popularly known as "üzerlik" and used as evileye in Turkey, was named "Moly" by Dioscorides. In this study, α -amylase and α -glucosidase inhibition, antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of fruit and herba were investigated. Antioxidant activity was measured by DPPH* and ABTS** scavenging assays, and total amount of phenolic component was determined in terms of gallic acid equivalent (GAE). In DPPH* scavenging assay, trolox (TR) and α -tocopherol (TC) showed the highest activity at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$; fruit (F) showed better effect than herba (H) [(TR) 91.4%>(TC) 45.5%>(F) 9.4%>(H) 8.3%]. In ABTS** scavenging assay, results were as (TR) 97.1%>(TC) 90.1%>(F) 10.3%>(H) 9.1%. In total amount of phenolic component assay, fruit content was richer than herba [(F)74.9>(H)73.3 μg

GAE/mg extract]. Antimicrobial activity was performed on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei* strains by microdilution method. In α -glucosidase inhibition assay, at 5 mg/mL, fruit showed an effect of 36% (IC₅₀= 6907 μ g/mL); acarbose showed 63% inhibition (IC₅₀= 4738 μ g/mL). Herba had no effect at any concentration. In the α -amylase inhibition assay, order of inhibition at 5 mg/mL was as follows: acarbose (59%) > herba (32%) > fruit (29%). The yeast most affected by fruit and herba was *C. tropicalis*, and the MIC value was obtained as >160 μ g/mL for both. Therefore, it can be concluded that *P. harmala* can be used as antidiabetic and antimicrobial and can be a herbal alternative to synthetic drugs.

Key words: Antioxidant, Antimicrobial, α -Amylase, α -Glucosidase, *Peganum harmala*, Nitrariaceae.

Giriş

Peganum harmala L., Akdeniz'in doğusundan kuzey Hindistan'a kadar olan kuru bölgelere özgü bir bitkidir. Bitki Orta Asya'da ortaya çıkmıştır, ancak şimdi Afrika, Orta Doğu, Hindistan, Güney Amerika, Meksika ve Güney ABD'de yabancı olarak yetişmektedir. Ülkemizde "üzerlik" olarak bilinen ve Türk halılarında kullanılan boyalardan, geleneksel olarak "Türk Kırmızısı" olarak bilinen zengin renkli tekstil boyasının kaynağı olmuştur. Türkiye'de yaygın yabancı bir tür olarak yetişen üzerlik bitkisinin tohumları halk hekimliğinde antihemoroid ve merkezi sinir sistemi uyarıcısı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, Türkiye'de bitkinin tohumları yakılarak kötü ruhlardan uzaklaşmak amacıyla da kullanılmaktadır (Kartal ve ark.,2003). *P. harmala* tüysüz, çok yıllık dik bir bitkidir ve mayıs-temmuz aylarında çiçek açmaktadır. Sonbahar mevsimine doğru olgunlaşan kapsül tipi meyvelerin içinde üçgen piramit şekilli 3-5 mm uzunlukta, kahverengi-siyah renkli, üzeri pürüzlü ve kanatlı tohumlar bulunmaktadır. Özellikle tohumlarda ve köklerde bulunan alkaloidler (harmin, harmalin, harmol ve harman vb.) aktif bileşikleridir ve total alkaloid miktarı % 4-7 arasında değişmektedir (Koçak ve Şahin, 2009). Yapılan çalışmalarda bitkinin antispazmodik, antikolinergik, antihistaminik, antiadrenergik, antimikrobiyal, analjezik, antidepresif, antidiyabetik, hipotansif ve antitumor olduğu rapor edilmiştir (Moloudizargari ve ark., 2013).

Diabetes mellitus (DM), artan obezite kriziyle beraber son yıllarda en acil ve yaygın sorunlardan biri haline gelmiştir ve günümüzde dünya çapında 5.2 milyon ölümlü ABD'de ve dünya çapında yedinci önde gelen ölüm nedenidir.

DM, kardiyovasküler hastalıkların oluşmasında önemli bir risk faktörüdür ve bu da DM'li kişilerde en yaygın ölüm sebebidir. Nefropati, retinopati ve nöropati dahil olmak üzere DM'nin mikrovasküler komplikasyonlarına ek olarak; makrovasküler komplikasyonlarda ise diyabet süresinin artmasıyla koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık ve karotis arter hastalığı

şeklinde daha yaygın hale gelmektedir (Glovaci ve ark., 2019).

Birçok çalışma, tıbbi ve aromatik bitkilerin antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar gibi pek çok biyolojik etkileri olan zengin fitokimyasallar için kaynak olduğunu göstermiştir. Aromatik ve tıbbi bitkiler, terapötik özelliklere sahip çeşitli sekonder metabolitlere sahiptir. Son zamanlarda, bitki ekstraktlarının antioksidanları ve antimikrobiyal aktiviteleri, farmasötikler, alternatif ilaçlar ve doğal terapideki birçok uygulamanın temelini oluşturmuştur (Abderrahim ve ark., 2019).

Farmakolojik endüstriler bir takım yeni antibiyotikler üretmiş olsa da, mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnci artmıştır. Bazı antibiyotikler, ilaç direnci nedeniyle neredeyse kullanılamaz hale gelmiştir. Sonuç olarak, mikrobiyal kontrole yönelik yeni yaklaşımlar düşünülmelidir. Yıllar içinde Dünya Sağlık Örgütü, geleneksel ilaçları hem mikrobiyal hem de mikrobiyal olmayan hastalıklar için güvenli çareler olarak savunmuştur (Nenaah, 2010).

Bu çalışmada, *P. harmala* bitkisinin meyve ve toprak üstü (herba) kısımlarından hazırlanan metanolik ekstraktların α -amilaz ve α -glukozidaz enzim inhibisyon, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Bitki materyali

P. harmala 2018-2019 yıllarında Gümüşhane'den toplanmış ve Atatürk Üniversitesi Biyoçeşitlilik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne AUEF 1382 Herbaryum numarası ile kaydedilmiştir.

Ekstraksiyon ve fraksiyonlama

P. harmala bitkisinin meyve ve toprak üstü kısımları kurutulduktan sonra 65 g tartılmış ve 8 saat boyunca oda sıcaklığında metanol içerisinde hareketli maserasyona tabii tutulmuştur (Maserasyon: Heidolph MR3001). Süzülen ekstraktlar kuruluğa kadar uçurulmuştur (Rotavapor: Heidolph VV2000, Almanya) ve bu prosedür kalan posalar ile 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstre miktarları sırasıyla 9.23 g ve 8.69 g olarak bulunmuştur.

In vitro α -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu Tayini

α -Glukozidaz enzim inhibisyonu etki tayini, Bachhawat ve ark. (2011) yönteminde bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakada 50 μ L fosfat tamponu (50 mM, pH 6.9), 10 μ L α -glukozidaz enzimi (1 Unite/mL) ve 20 μ L numune (50-5000 μ g/mL konsantrasyon aralığı) karıştırılıp 37°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Karışıma substrat olarak 20 μ L 3 mM *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozit ilave edilmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 50 μ L 0.1 M sodyum karbonat ilavesiyle tamamlanmıştır. Bütün çözeltiler tampon sisteminde hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak akarboz kullanılmıştır. Oluşan sarı renkli *p*-nitrofenol miktarı 405 nm'de belirlenmiştir. Her tayin 3 kez tekrarlanmıştır.

Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

In vitro α -Amilaz Enzim İnhibisyonu Tayini

α -Amilaz enzim inhibisyonu etki tayini Nampoothiri ve ark. (2011)'ye göre yapılmıştır. 100 μ L numune (50-5000 μ g/mL konsantrasyon aralığı) ve 20 mM sodyum fosfat tamponu içinde (6 mM sodyum klorür ile pH 6.9) hazırlanmış 100 μ L domuz pankreatik α -amilaz (0.5 mg/mL) 25°C'de 10 dk. 24 kuyucuklu mikropalaka içinde inkübe edilmiştir. 100 μ L %1'lik nişasta çözeltisi (aynı tamponda hazırlanmış) her kuyucuğa ilave edilmiş ve örnekler 25 °C'de 10 dk. daha inkübe edilmiştir. Reaksiyon durdurulmuş, 200 μ L dinitrosalisilik asit renk reaktifi ilave edilmiş ve karışım 100 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş, her örnekten 50 μ L alınarak 96 kuyucuklu mikropalakaya transfer edilmiştir. Her kuyucuktaki reaksiyon karışımına 200 μ L distile su ilave edilerek dilüe edilmiş ve absorbansları 540 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırılmıştır. Akarboz pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her tayin 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

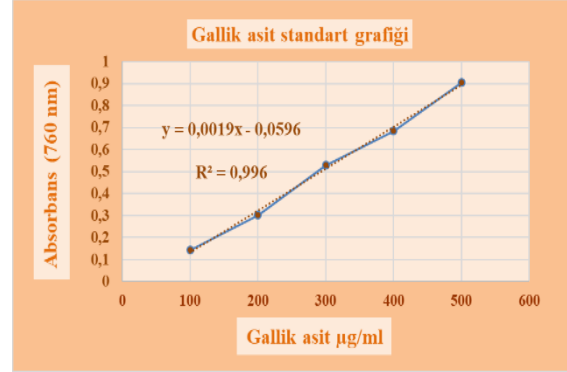
$$\% \text{inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Total Fenolik Bileşen Miktar Tayini

Çalışmada *P. harmala* bitkisinin meyve ve toprak üstü kısımlarından metanol kullanılarak hazırlanan 2 ayrı ekstrenin total fenolik bileşen miktarı Folin ve Denis tarafından geliştirilen, Singleton tarafından iyileştirilen ve tarafımızca da modifiye edilen yöntem kullanılarak gallik asit eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir (Sevindik ve ark., 2016). Çalışmamızda kullanılan standart bileşik gallik asitten 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 μ g/ml konsantrasyon aralığında bir seri hazırlanmıştır. Ardından bu çözeltiler Folin-Ciocalteu reaktifi ve Na₂CO₃ ile muamele edilmiştir. Gallik asit standart grafiği 760 nm'de konsantrasyona karşı absorbans değerleri distile sudan oluşan köre karşı okunarak elde edilmiştir

(Şekil 1). Ekstrelerden ise 1 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlanmış ve absorbansları aynı şekilde kaydedilmiştir. Ekstrelerin verdikleri absorbanslar standart grafikten elde edilen (760 nm) Absorbans= 0.0019×Gallik asit-0.0596 denkleminde yerine koyularak toplam fenolik bileşen miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Her analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Şekil 1. Gallik asit standart grafiği



DPPH• radikali süpürücü aktivite

Bitkinin meyve ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin DPPH• radikali süpürücü aktivite tayini Blois metodu esas alınarak yapılmıştır (Blois, 1958). Yöntemde α -tokoferol ve troloks standart olarak tercih edilmiş, 1 mM DPPH• solüsyonu üzerinde antioksidan etkileri bakımından test edilmiştir. Ekstrelerin (10-300 μ g/ml) konsantrasyon aralığında bir seri dilüsyonu hazırlanmış 1 mM DPPH• solüsyonu kullanılarak serbest radikal süpürücü etkileri tespit edilmiştir. Tüm ölçümler etanolden oluşan köre karşı 517 nm'de kaydedilmiştir (Sevindik ve ark., 2016). Her analiz 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A: 517 nm'de verdiği absorbans değeri.

ABTS•• radikali süpürücü aktivite

ABTS•• radikali süpürücü aktivite tayini Re ve arkadaşlarının geliştirdiği metot esas alınarak yapılmıştır (Re ve ark. 1999). Metot uygulanırken 2 mM ABTS•• çözeltisi hazırlanmış, α -tokoferol ve troloks standart olarak tercih edilmiştir. Ekstrelerin (10-300 μ g/mL) konsantrasyon aralığında bir seri dilüsyonu hazırlanmış 2 mM ABTS•• çözeltisi kullanılarak serbest radikal süpürücü etkileri tespit edilmiştir. Tüm ölçümler fosfat tamponundan oluşan köre karşı 734 nm'de kaydedilmiştir (Sevindik ve ark., 2016). Her analiz 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A: 734 nm'de verdiği absorbans değeri.

Antimikrobiyal Aktivite Yöntemi

P. harmala bitkisinin meyve ve toprak üstü kısımlarının (640-5120 µg/mL) antimikrobiyal aktivitesi Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2006; CLSI, 2008) tarafından yayınlanan aerobik mikroorganizmalar için kullanılan mikrodilüsyon tekniği (M-100-S16) ve funguslar için kullanılan mikrodilüsyon tekniği (M-27-A2) protokollerine adapte edilmek suretiyle *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Candida tropicalis* ATCC 750, *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 14243 suşlarına karşı çalışılmıştır.

Standart olarak klaritromisin ve terbinafin (0.25-128µg/mL) kullanılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK, µg/mL) belirlenmiştir.

Mikroorganizma Süspansiyonlarının Hazırlanması

Test edilecek *Candida* izolatlarının Patato Dektroze Agar (PDA)'da saf kültürleri elde edildikten sonra 24 saatlik kültüründen birkaç koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland (1-5x10⁶ hücre/mL) süspansiyon bulanıklığında hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan toplamda 1/20x1/50=1/1000 seyreltme yapılmıştır. Deney için 96 "U" tipi kuyucuklara sahip mikropaklar kullanılmıştır.

Bakteri suşları için ise Mueller Hinton Agar (MHA)'da 24 saat üreyen kolonilerden alınarak MHB bulunan tüplere aktarılmış, tekrar 35-37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland No: 0.5 (bakteriler için yaklaşık 10⁸ cfu/mL) tüpüne göre bulanıklık ayarı türbidometre kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra testte kullanılacak son inokulum miktarı 5x10⁵ cfu/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

Deneyler için 96 "U" tipi kuyucuklara sahip mikropaklar kullanılmıştır. 1. sütuna ekstre ve antibiyotiklerden 100 µL, kalan 2-10. sütunlara ise 50 µL besiyeri konulmuştur. İki katlı seri dilüsyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüm kuyucuklara (11. sütun besiyeri kontrolü olarak kullanılmıştır) 50 µL hazırlanan bakteri süspansiyonundan eklenmiştir. Aynı işlemler mayalar için 1. sütuna ekstre ve antifungal maddeden 200 µL, kalan 2-10. sütunlara ise 100 µL besiyeri konulmuştur. İki katlı seri dilüsyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, tüm kuyucuklara (11. sütun besiyeri kontrolü olarak kullanılmıştır) 10 µL hazırlanan maya süspansiyonundan eklenmiştir.

Daha sonra mikropakların kapakları kapatılarak 35-37°C de 16-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa %0.01'lik 15 µL rezaurin (Sigma) eklenmiş ve bu işlemin ardından mikropaklar tekrar 35°C'de 1 saat

inkübe edildikten sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

İnkübasyon sonunda pembe renkli alanlar üremenin olduğu, mavi renkli kalan alanlar ise üremenin olmadığını göstermektedir. Mavi renkte gözlenen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu test edilen mikroorganizma için o antimikrobiyal numunenin MİK değeri (µg/mL) olarak belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, *P. harmala* bitkisinin meyve ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanolik ekstrelerin α-amilaz ve α-glukozidaz enzim inhibisyon, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

P. harmala'nın meyve ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanolik ekstrelerin α-glukozidaz ve α-amilaz enzim inhibisyon etkileri akarboza karşı değerlendirilmiştir. α-Glukozidaz enzim inhibisyonu deneyinde 5 mg/mL konsantrasyonda meyve % 36 oranında etki gösterirken (IC₅₀= 6907 µg/mL); akarboz % 63 inhibisyon göstermiştir (IC₅₀= 4738 µg/mL) (Çizelge 1). Herba ise hiçbir konsantrasyonda etki göstermemiştir. α-Amilaz enzim inhibisyonu deneyinde ise 5 mg/mL konsantrasyonda inhibisyon sıralaması şöyledir: akarboz (% 59) > herba (% 32) > meyve (% 29).

Çizelge 1. *Peganum harmala*'dan elde edilen metanolik ekstrelerin α-glukozidaz inhibisyon etki tayini sonuçları.

| Konsantrasyon (µg/mL) | α-Glukozidaz İnhibisyon (%) | | |
|-----------------------|-----------------------------|-------|---------|
| | Herba | Meyve | Akarboz |
| 5000 | -11.92 | 36.12 | 62.88 |
| 2500 | -11.83 | 12.69 | 49.05 |
| 1000 | -8.61 | 1.42 | 31.58 |
| 750 | -9.05 | 3.46 | 20.81 |
| 500 | -6.07 | -3.79 | 16.39 |
| 250 | -5.70 | -2.15 | 7.91 |
| 100 | -5.55 | -3.11 | 6.51 |
| 50 | 0.22 | -5.01 | 3.76 |

Yapılan bir çalışmada Cezayir halk tıbbında kullanılan *P. harmala*'nın da dahil olduğu altı bitkiden farklı oranlarda (0, % 50, % 80, ve % 100) hazırlanan etanol ekstrelerinin 5000 µg/mL konsantrasyonda α-glukozidaz enzim inhibisyonu etkileri değerlendirilmiş ve sonuçlar kersetin ile karşılaştırılmıştır. Kersetin aynı konsantrasyonda % 60 inhibitör etki gösterirken; *P. harmala*'nın herbasından hazırlanan etanol ekstrelerinin hiçbiri bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde etki göstermemiştir (Hellal ve ark., 2020). Bir başka çalışmada da bitkinin herbasından hazırlanan

metanol ve su ekstralarının hiçbirisi, akarboz (% 51) ile karşılaştırıldığında etki göstermemiştir (Gholam ve ark., 2008).

Yapılan diğer bir çalışmada, streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik erkek ratlarda *P. harmala*'nın tohumlarından hazırlanan hidroalkolik ekstrenin antidiyabetik etkisi araştırılmıştır. 64 normal Wistar albino erkek rat (200-230 g) rastgele 8 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu ve diyabetik ratlar 4 hafta boyunca normal tuzlu su ve üç farklı dozda (30, 60 ve 120 mg/kg) ekstre ile oral yoldan tedavi edilmiştir. Ekstrenin uygulanması ile, diyabetik gruba göre tedavi edilen grupta glikoz seviyesinde belirgin bir düşüş görülmüştür (Komeili ve ark., 2016). Benzer bir çalışmada, bitkinin tohumlarından hazırlanan hidroalkolik ekstre STZ ile indüklenmiş diyabetik ratlardan oluşan üç gruba 30, 60 ve 120 mg/kg dozda uygulanmış ve standart ilaç metformin ile karşılaştırılmıştır. Diyabetik ratlarda kan glukoz seviyeleri kontrol grubuna göre azalmıştır ($P < 0.05$) (Porbarkhordari ve ark., 2014). Bir başka çalışmada da bitkinin tohumlarından hazırlanan etanolik ekstrenin hipoglisemik etkisi, STZ ile indüklenen diyabetli ratlarda değerlendirilmiştir. Oral yoldan verilen ekstre iki dozda (150 ve 250 mg/kg vücut ağırlığı) diyabetik sıçanların maksimum kan şekeri seviyesinin sırasıyla % 30.3 ve % 48.4 düşmesine neden olmuştur. Standart ilaç metformin ise % 45.5 oranında etki göstermiştir (Singh ve ark., 2008).

Literatür araştırmasında, *P. harmala*'nın herba ve tohumları üzerinde yapılmış antidiyabetik çalışmalar olduğu görülmektedir. α -Glukozidaz enzim inhibisyonu deneyleri bitkinin herbasından hazırlanan ekstrelerde değerlendirilirken; meyve üzerinde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bitkinin α -amilaz enzim inhibisyonu etkisini inceleyen hiçbir çalışma bulunamamıştır. *In vivo* çalışmalarda ise genellikle bitkinin tohumlarından hazırlanan ekstraların antidiyabetik etkisi değerlendirilmiştir. Bitkinin herba ve meyvesinin antidiyabetik etkileri karşılaştırılmalı olarak ilk defa bizim çalışmamızda değerlendirilmiştir.

Serbest radikaller yaşam döngüsü içerisinde oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalar yaşlanmadan kansere kadar birçok hastalığın temelinde serbest radikallerin yer aldığına işaret etmektedir (Hayet ve ark., 2010). Sağlıklı bir metabolizmada oksidanlar ve antioksidanlar bir denge halindedir. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması halinde ateroskleroz, kronik böbrek hastalıkları, diyabet, immun sistem hastalıkları, nörodejenerasyon, kanser gibi birçok hastalık gelişebilmektedir (Mazandarani ve ark.,

2012). Tıbbi bitkiler içerdikleri etkili fitokimyasallar sayesinde antioksidan etki göstererek pek çok hastalığa karşı koruyucu etki göstermektedir. Ayrıca yapılan birçok çalışma tıbbi bitkilerin zengin fitokimyasal kaynağı olmasından dolayı antimikrobiyal, antidiyabetik, anti-inflamatuar etki gibi çoklu etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Ait Abderrahim., 2019).

Yapılan bir çalışmada *P. harmala* tohumlarından elde edilen metanolik ekstrenin total fenolik bileşen içeriği ve DPPH radikali süpürücü kapasitesi test edilmiş, standart olarak kullanılan askorbik asite kıyasla etkinin daha düşük olduğu gözlenmiştir (240.32 ± 50.56 mg/g ekstre) (Ait Abderrahim., 2019).

P. harmala toprak üstü kısımlarından petrol eteri (P), kloroform (K), etil asetat (E), *n*-butanol (B) ve metanol (M) kullanılarak hazırlanan ekstraların standart olarak kullanılan troloksa (TR) karşı DPPH radikali süpürücü kapasitesinin araştırıldığı bir çalışmada standart bileşikten sonra en güçlü etki metanol ekstresinde gözlenmiştir [(TR)23.1>(M)6>(K)3.2>(P)1.2>(E)0.8>(B)0.3 IC_{50}] (Edziri ve ark., 2010). Yaptığımız çalışmada; *P. harmala*'nın meyve (M) ve toprak üstü kısımlarından (H) hazırlanan metanolik ekstraların antioksidan etkilerini tespit etmek amacı ile ekstraların DPPH serbest radikali süpürücü kapasiteleri test edilmiş ve standart olarak kullanılan α -tokoferol (TK) ve troloksa (TR) karşı değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre ekstraların gösterdiği etki standartlardan daha az olmakla birlikte meyve ekstresinin toprak üstü ekstresinden daha iyi DPPH* süpürücü aktivite gösterdiği kaydedilmiştir [(TR) % 91.4>(TK) % 45.5>(M) % 9.4>(H) % 8.3; 40 μ g/mL % inhibisyon]. ABTS katyon radikali süpürücü aktivite değerlendirme testlerinde de yine benzer sonuçlar elde edilmiş, ekstraların ABTS** radikali süpürücü etkisi standart olarak kullanılan α -tokoferol ve troloksun gerisinde kalmıştır. Ekstreler kendi arasında kıyaslandığında meyve ekstresinin toprak üstü ekstresinden daha iyi ABTS** radikali süpürücü etkisi olduğu tespit edilmiştir [(TR) % 97.1>(TK) % 90.1>(M) % 10.3>(H) % 9.1; 40 μ g/mL % inhibisyon] (Çizelge 2). Ekstreler total fenolik bileşen miktarı bakımından gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden değerlendirildiğinde sonuçlar antioksidan aktivite testleri ile paralellik göstermiş, meyve ekstresinin total fenolik bileşen miktarının toprak üstü ekstresine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [(M)74.9>(H)73.3 μ g GAE/ mg ekstre] (Çizelge 3).

Çizelge 2. *Peganum harmala*'dan elde edilen metanolik ekstrelerin ABTS** ve DPPH* radikal süpürücü aktivite tayini sonuçları.

| | ABTS** Radikali Süpürücü Aktivite | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | % İnhibisyon (40 µg/mL) | % İnhibisyon (50 µg/mL) |
| Toprak üstü kısımlar/herba | 9.17 ± 0.006 | 10.64 ± 0.037 |
| Meyve | 10.36 ± 0.019 | 13.21 ± 0.007 |
| Troloks | 97.14 ± 0.004 | 98.15 ± 0.0007 |
| α-Tokoferol | 90.12 ± 0.0009 | 94.57 ± 0.002 |
| | DPPH* Radikali Süpürücü Aktivite | |
| Toprak üstü kısımlar/herba | 8.30 ± 0.012 | 9.85 ± 0.055 |
| Meyve | 9.41 ± 0.011 | 13.98 ± 0.012 |
| Troloks | 91.41 ± 0.02 | 92.64 ± 0.001 |
| α-Tokoferol | 45.50 ± 0.044 | 57.99 ± 0.12 |

Çizelge 3. Total fenolik bileşen miktar tayini sonuçları.

| Ekstreler | Total Fenolik Bileşen (µg GAE/mg ekstre) |
|---------------------------------------|--|
| Toprak üstü Kısımlar/Herba (H) | 73.38 ± 0.0007 |
| Meyve (M) | 74.94 ± 0.0008 |

P. harmala bitkisinin meyve ve herba kısımlarının MİK değerleri Çizelge 4'te verilmiştir. Bitki ekstralarının bakteri suşlarına (MİK=1280-

2560 µg/mL) kıyasla maya suşlarına karşı daha etkili (MİK=320-160> µg/mL) olduğu görülmektedir. *P. harmala* meyve metanol ekstresinin en etkili olduğu maya *C. tropicalis* ATCC 750 olmuş ve MİK= 160> µg/mL olarak elde edilmiştir. *P. harmala* meyve ekstresinin çalışılan bakteri suşları arasında *S. aureus* ATCC 6538 suşuna karşı MİK =1280 µg/mL olarak bulunmuştur.

Çizelge 4. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (µg/mL).

| Ekstreler | <i>E. coli</i> ATCC 8739 | <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | <i>B. subtilis</i> ATCC 19659 | <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | <i>C. krusei</i> ATCC 14243 | <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 |
|----------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Meyve | 2560 | 1280 | 2560 | 2560 | 320 | 160> |
| Herba | 2560 | 2560 | 2560 | 1280 | 320 | 160> |
| Klaritromisin | 32 | 2.0 | 0.125 | - | - | |
| Terbinafin | - | - | - | 4.0 | 8.0 | 8.0 |

P. harmala meyveli herba metanol ekstresinin aynı şekilde en etkili olduğu maya *C. tropicalis* ATCC 750 olmuş ve MİK= 160> µg/mL olarak elde edilmiştir. Bakteri suşlarına karşı ise MİK= 2560 µg/mL olarak bulunmuştur.

P. harmala'nın herbasından hazırlanan etil asetat, kloroform, bütanol ve metanol ekstraları Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri türleri üzerinde yapılmış bir çalışmada, tüm ekstralar, MİK= 5 mg mL⁻¹ olacak şekilde antibakteriyel aktivite göstermiştir. Etil asetat, metanol ve bütanol ekstralarının MİK değerleri (0.51 - 8 mg mL⁻¹) arasında antibakteriyel aktivite göstermiştir (Edziri ve ark., 2010)

Farklı bir çalışmada *P. harmala* tohum ekstresi *S.aureus* ATCC 33862, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* klinik

izolat suşlarına karşı çalışılmıştır. *P. harmala* tohum ekstresi *S. aureus* (MİK= 0.5 mg/mL) ve *C. albicans* (MİK= 0.6 mg/ mL) türleri üzerine etkili bulunmuştur (Ait Abderrahim ve ark., 2019). Genel olarak suşlar farklı olsa da bizim çalışmamızda da *Staphylococcus* ve *Candida* türlerine etki görülmektedir.

P. harmala meyvelerinin kloroform ve metanol ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri, *S. aureus* PTCC 1431, *B. subtilis* PTCC 1023, *P. aeruginosa* PTCC 1074, *E. coli* PTCC 1330, *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* ICMP 5089, *Pseudomonas viridiflava* ICMP 2848, *Rathayibacter toxicus* ICMP 9525 ve *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ICMP 13 suşlarına karşı çalışılmıştır. *P. harmala* meyve metanol ekstresi, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı MİK= 1.56 µg mL⁻¹'de etkili

bulunmuştur. Kloroform meyve ekstresi ise *P. aeruginosa* suşuna karşı $MİK=1.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'de etkili suşlar olarak bulunmuştur. *P. harmala* meyve ekstralarının, literatür çalışmalarında, Gram pozitif *S. aureus* ve Gram negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı etkili olduğu görülmüştür ($MİK=1.56 \mu\text{g / ml}$). (Hadadi ve ark., 2020). Yapılan bu çalışmada da genel olarak *Staphylococcus* üzerine bir etki görülmektedir. Bizim elde ettiğimiz bulgular da bu tür üzerinde etkiyi ortaya koymaktadır.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızın sonuçlarının yeni antibiyotik kombinasyonları veya gıda koruyucu maddelerdeki araştırmalara katkı sağlayacağını düşünüyoruz. *In vitro* andiyabetik aktivite sonuçlarına göre meyve ekstresi α -glukozidaza karşı akarbozun yarısı kadar etki gösterirken; α -amilaz enzimine karşı ise hem meyve hem de herba ekstraları akarbozun yarısı kadar etki göstermişlerdir. Total fenolik bileşen miktarı değerlendirildiğinde meyve içeriğinin, herbaya göre daha zengin olduğu tespit edilmiştir. Meyve ve herbasının en etkili olduğu maya *C. tropicalis* olup, $MİK$ değeri her ikisi için de $160 > \mu\text{g/mL}$ olarak elde edilmiştir. Bitkinin anti-diabetik, antioksidan ve antimikrobiyal etki potansiyelleri vardır, bu nedenle daha ileri çalışmalar yapılabilir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Ait Abderrahim, L., Taïbi, K., ve Ait Abderrahim, C. 2019. Assessment of the antimicrobial and antioxidant activities of Ziziphus lotus and Peganum harmala. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43(2): 409-414.
- Bachhawat, J. A., Shihabudeen, M. S., ve Thirumurugan, K. 2011. Screening of fifteen Indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(4): 267-74.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617): 1199-1200.
- Clinical and Laboratory Standards Institute , W. 2006. Clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibilitests for bacteria that grow aerobically. *Approve Standard M7-A7, CLSI, seventh ed, PA, USA*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *Approved standard M27-A3*.
- Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, M. A., Patrich, G., Matieu, M., Ammar, S., Ali, S. M., Laurent, G., Zine, M. ve Aouni, M. 2010. Antibacterial, antiviral and antioxidant activities of aerial part extracts of Peganum harmala L. grown in Tunisia. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92(7): 1283-1292.
- Folin, O. ve Denis, W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of biological chemistry*, 12(2): 239-243.
- Gholam, H. A., Falah, H., Sharififar, F. ve Mirtaj, A. S. 2008. The inhibitory effect of some Iranian plants extracts on the alpha glucosidase. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(37): 1-9.
- Glovaci, D., Fan, W., ve Wong, N. D. 2019. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Current cardiology reports*, 21(4): 1-8.
- Hadadi, Z., Nematzadeh, G. A. ve Ghahari, S. 2020. A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. *BMC chemistry*, 14(1): 1-11.
- Hayet, E., Maha, M., Mata, M., Mighri, Z., Laurent, G. ve Mahjoub, A. 2010. Biological activities of Peganum harmala leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9(48): 8199-8205.
- Hellal, K., Maulidiani, M., Ismail, I. S., Tan, C. P. ve Abas, F. 2020. Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of six Algerian traditional medicinal plant extracts and ¹H-NMR-based metabolomics study of the active extract. *Molecules*, 25(5): 1247.
- Kartal, M., Altun, M. L., ve Kurucu, S. 2003. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of Peganum harmala L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31(2): 263-269.
- Koçak, Y., ve Şahin, A. 2009. *Peganum harmala* L.(üzelik) tohum ekstresinin analjezik aktivitesi ve akut toksitesinin fareler üzerinde belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(1): 27-30.
- Komeili, G., Hashemi, M. ve Bameri-Niafar, M. 2016. Evaluation of antidiabetic and

- antihyperlipidemic effects of *Peganum harmala* seeds in diabetic rats. *Cholesterol*, 2016.
- Mazandarani, M., Sineh Sepehr, K., Baradaran, B. ve Khuri, V. 2012. Autecology, phytochemical and antioxidant activity of *Peganum harmala* L. seed extract in North of Iran (Tash Mountains). *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 85-90.
- Moloudizargari, M., Mikaili, P., Aghajanshakeri, S., Asghari, M. H., ve Shayegh, J. 2013. Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacognosy reviews*, 7(14): 199.
- Nampoothiri, S. V., Prathapan, A., Cherian, O. L., Raghu, K. G., Venugopalan, V. V., ve Sundaresan, A. 2011. In vitro antioxidant and inhibitory potential of *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1): 125-131.
- Nenaah, G. 2010. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 81(7): 779-782.
- Porbarkhordari, E., Foladsaz, K., Hoseini, S. H., Danafar, H., Kheiri Manjili, H. R. ve Ramazani, A. 2014. The hypoglycemic effects of an ethanol extract of *peganum harmala* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3): 47-54.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10): 1231-1237.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1): 49-55.
- Sevindik, H. G., Ozek, T., Yerdelen, K. O., Onal, M., Ozbek, H., Guvenalp, Z. ve Demirezer, L. O. 2016. Chemical Composition, Antioxidant Capacity, Acetyl-and Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities of the Essential Oil of *Thymus haussknechtii* Velen. *Records of Natural Products*, 10(4): 503-507.
- Singh, A. B., Chaturvedi, J. P., Narender, T. ve Srivastava, A. K. 2008. Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of clinical biochemistry*, 23(4): 391-393.