



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ**

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

Türkiye’de yetişen *Pelargonium* türlerinin kök ekstraktlarının fitokimyasal içerikleri *in vitro* antioksidan özellikleri ve yaygın gıda patojenleri üzerine antimikrobiyal etkisinin araştırılması

Proje No: FAB-2022-10940

Proje Türü
Araştırma Başlangıç Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr. Arzu KAVAZ YÜKSEL

Araştırmacılar:

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YÜKSEL
Dr. Öğr. Üyesi Elif Feyza TOPDAŞ

Temmuz-2023

ERZURUM

Önsöz

Yeryüzünde doğal olarak bulunan ve insanlar tarafından gıda manasında kullanılan bitkiler mevcuttur. Bunun yanında doğrudan gıda olarak tüketilmeyen fakat; insanoğlunun çeşitli hastalıkları iyileştirmek, rahatsızlıkları gidermek için kullandığı bitkiler halk sağlığı açısından geçmişten beri kullanılmaktadır. *Pelargonium* (sardunya) toprak altı ve üstü dokularının ekstraktları çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan aromatik ve tıbbi bir bitkidir. Bu bitkinin tıbbi manada kullanılması geçmiş yıllara dayansa da bilimsel çalışmalar sayesinde kimyasal içeriği ve sağlık yararları ortaya çıkarılmıştır. Araştırmalar bu bitkinin daha çok *P. sidoides* ve *P. reniforme* türleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu bitkinin asıl anavatanı Afrika kıtası da olsa ülkemizde *Pelargonium* cinsine ait *Pelargonium endlicherianum* ve *Pelargonium quercetorum* türleri mevcuttur. İklimin, toprak yapısının ve ekolojik koşulların bitkilerin içerdiği fitokimyasal bileşenlerin üzerine etkisi göz önüne alındığında ülkemize özgü olan bu iki türün kök ekstraktlarının antioksidan, antibakteriyel özelliklerinin yanısıra fitokimyasal içerik tayini önemli bir sonuç olacaktır.

Bu proje Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FAB-2022-10940). Desteklerinden dolayı ilgili birime teşekkür ederiz.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. <i>Pelargonium</i>	5
2.2. Fitokimyasal yapısı, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri	6
3. Materyal ve Metot	9
3.1. Bitki Materyalleri	9
3.2. Ekstrelerin Hazırlanışı	9
3.3. LC-MS/MS için numunelerin hazırlanması ve LC-MS/MS ile fitokimyasal içerik tayini	9
3.4. Antimikrobiyal Testler	10
3.4.1. Kullanılan Bakteriler	10
3.4.2. Disk Difüzyon yöntemi	10
3.4.3. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi	11
3.4.4. Mikro dilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesi	11
3.5. Antioksidan Aktivite	11
3.5.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini	11
3.5.2. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi	12
3.5.3. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi	12
3.5.4. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini	12
4. BULGULAR	13
4.1. Materyallerin mineral içeriği	13
4.2. Antioksidan analiz sonuçları	13
4.3. Antimikrobiyal analiz sonuçları	15
4.4 Fitokimyasal içerik sonuçları	16
5. Kaynaklar	18

ÖZET

Pelargonium türleri toprak altı ve üstü dokularının ekstraktları çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan aromatik bir bitkidir. Bilimsel çalışmalar bu bitkinin daha çok *P. sidoides* ve *P. reniforme* türleri üzerine yoğunlaşmıştır. Ülkemizde *Pelargonium* cinsine ait *Pelargonium endlicherianum* ve *Pelargonium quercetorum* türlerine özgü çalışmalar da sınırlı sayıdadır. Bu proje ülkemize özgü bu iki türün kök ekstraktlarının antioksidan, antibakteriyel özelliklerinin yanısıra fitokimyasal içerik tayinine odaklanmıştır.

Bitki kök ekstraktları %11 etanol, %70 alkol ile Ekstraktların antibakteriyel aktivitesi değerlendirildiğinde metanol ekstraktlarının daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. *S. aureus*'un her üç türe ait hem etanol hem de metanol ekstraktlarına en duyarlı bakteri olduğu görülmüştür.

Antioksidan aktivite için DPPH, FRAP ve ABTS yöntemlerinde çözücü türünün önemli olduğu ve %70 metanol ekstraksiyonunun antioksidan aktiviteyi etkileyen bileşenler için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, spektroskopik olarak tespit edilen toplam flavonoid ve fenolik madde içeriğinin (metanol ekstrelerinde yüksek olması bu sonucu desteklemiştir.

Sonuç olarak Avrupa'da ticari öneme haiz olan sadece *P. sidoides*'ten elde edilen ekstraktların yaygın olarak kullanıldığı düşünüldüğünde; ülkemizde yetişen bu iki türün ekstraktlarının da ticarileştirmesi için daha fazla çalışmaların yapılması gerekmektedir.

1. GİRİŞ

Bu çalışmada; asıl anavatanı Güney Afrika olan ve ülkemizde özellikle Doğu Anadolu Bölgesinde halk arasında sağlık açısından faydalı olduğuna inanılarak kullanılan sardunya bitkisine ait kök materyalinin mineral madde ve fenolik bileşen profili, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla Hakkâri ilinden temin edilen *Pelargonium endlicherianum* ve *Pelargonium quercetorum* türlerine ait ve ticari olarak satılan *P. sidoides* türlerinin köklerinin kurutularak toz haline getirilmiş formlarının metanol ve etanol ekstraktları kullanılmıştır. İki farklı çözücünün kullanıldığı bu çalışmada ülkemize ait iki türün tıp dünyasında yaygın olarak kullanılan *P. sidoides*'e göre farklılığı da ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pelargonium*

Pelargonium cinsi Geraniaceae familyasına dahil olup yaklaşık 270 farklı türe sahip çok yıllık çalimsı bitkilerdir ve cinsin yaklaşık %80'i Güney Afrika'da yetişmektedir. *Pelargonium*

sidoides Güney Afrika'da geleneksel ilaç olarak kullanılan Geraniaceae familyasının geofit türlerinden biridir. Bu bitkinin etli, parlak kırmızı yumru veya rizomları farklı kültürel gruplar tarafından yaygın olarak diyare ve dizanteride; köklerinden hazırlanan dekoksionlar gastrointestinal bozukluklar, göğüs ağrısı, solunum yolu enfeksiyonları ve tüberküloz tedavisinde uzun yıllar geleneksel olarak kullanılmıştır. Bu sebeple *P. sidoides* köklerinden yıllar süren klinik araştırmalar sonucu bitkinin yerel adından gelen ve uluslararası ismi "Umckaloabo" olan ilaç üretilmiştir. İlacın üst solunum yolları hastalıkları ve soğuk algınlığında, bağışıklık sistemini güçlendirerek belirtilerin şiddetini hafiflettiği ve hastalığın süresini kısalttığı belirtilmiştir. *Pelargonium* türlerinin önemi, Güney Afrika'da geleneksel ilaç olarak kullanılan *P. reniforme* ve *P. sidoides* ile belgelenmiştir. Günümüzde *P. sidoides*'in etanolik ekstresi EPs® 7630 kulak, burun ve boğaz hastalıkları ile birlikte solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Uslu ve ark. 2009; Karatoprak ve ark. 2017).

P. endlicherianum'un Türkiye'de geniş bir dağılım gösterir ve Akdeniz ile İran-Turan bölgeleri arasında rastlanır. *P. quercetorum* ise Irak'ta geniş dağılım gösterir ve Türkiye'deki dağılımı İran ve Irak'a yakın güneydoğu köşelerinde sınırlıdır. *P. endlicherianum*; dayanıklı rizom köklü, büyük ve çekici eflatunkırmızı çiçekli, uzun saplı, tüylü ve elsi yapraklıdır. Türkiye'deki yaygın ismi solucan otudur. *P. quercetorum*, *P. endlicherianum*'a göre daha büyük ve daha çok sayıda yaprağa sahiptir ve daha az tüylüdür.

Geraniaceae familyası yeryüzünde 11 cins ve 750 türle, Türkiye'de ise Biebersteina, Geranium, Erodium ve Pelargonium olmak üzere dört cins ve toplam 62 tür ile temsil edilmektedir. Bu familyanın en önemli cinsi olan *Pelargonium*'ların Türkiye bitki örtüsünde iki türü kayıtlıdır. *Pelargonium quercetorum* Agnew.'de bu türlerden biridir. Takson genel olarak Kuzey Irak'ta yayılış gösterirken Türkiye'de Hakkâri ilinde yayılış göstermektedir. Yörede bahar aylarında popüler olan bu bitki Tolk ya da Tolik olarak bilinir. Yüksek rakımları ve nemi seven bu bitkinin aynı zamanda Kari (*Arum elongatum* Stev.) bitkisine benzer özellikleri bulunmaktadır. Yöre halkı tarafından önem verilen bu bitkinin yörede aynı zamanda ticari bir değeri de bulunmaktadır. Yöre halkı bu bitkiyi tıbbi amaçla kullanmanın yanı sıra gıda amaçlı olarak da kullanmaktadır (Şeker Karatoprak; 2018).

2.2. Fitokimyasal yapısı, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri

Avrupa Farmakopesi'ne göre, *Pelargonium* kökü, pirogallol olarak ifade edilen tanenlerin en az %2'sini içermelidir. Avrupa Farmakopesinin tanımlama yöntemi, metanol kök

ekstresinin ince tabaka kromatografi temeline dayanmaktadır. Fakat; teknolojinin gelişimiyle birlikte yeni analiz yöntemleriyle içerik belirlenmesi yapılmıştır. *Pelargonium* ekstresinin HPLC analizine dayanan bileşenleri belirlenmiştir (Bladt ve Wagner, 1988). Schnitzler ve ark. (2008), LC-MS spektroskopisi ile *P. sidoides*'in sulu kök ekstraktının bileşiklerini analiz etmiştir. Baskın olarak kumarinler, basit fenolik yapının yanı sıra flavonoid ve kateşin türevleri, *Pelargonium* özündeki ana bileşenler olarak tanımlanmıştır. *Pelargonium* türlerinin kök metabolitlerinin yapısal incelemesi, fenolik asitler, flavonoidler, flavan-3-oller ile ilişkili proantosiyanidinler ve bir fitosterol dahil olmak üzere diğer çeşitli bileşiklerin karakterizasyonu ile sonuçlanmıştır. Gallik asit ve metil esteri dışında, bu metabolitlerin çoğu nispeten düşük verimlerde bulunmuştur. Buna karşılık, oligomerik ve polimerik proantosiyanidinler, kateşin ve gallokatekin varlıkları ile, baskın genişletici birimler olarak yüksek konsantrasyonda meydana gelir (Gödecke ve diğerleri, 2005; Kolodziej, 2002). *P. reniforme* kök ekstraktındaki metabolitlerin heterojenliği, reniformin olarak adlandırılan benzeri görülmemiş bir diterpen esterinin karakterizasyonu ile gösterilmiştir (Latte ve diğerleri, 2007). Bu bitki türlerinin kök ekstraktlarının temelinde bu maddeleri bulunduruyor olması bölgesel olarak temelde aynı olsa da kalitatif ve kantitatif olarak değişiklik gösterebileceği bilinmektedir (Baraniak ve Kania-Dobrowolska, 2020; El Aanachi ve ark. 2020).

Klinik olmayan veriler, *Pelargonium* özütünün terapötik uygulaması için bir kanıt sağlamaktadır. Birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı orta düzeyde antibakteriyel etki, mikroorganizmaların insan hücrelerine istilası ve yapışmasına müdahale, bağışıklık tepkilerinin indüklenmesi (gelişmiş fagositoz, oksidatif patlama ve insan periferik kan fagositlerinin hücre içi öldürülmesi) ve mukolitik özellikler (iyileştirme yoluyla) siliyer fonksiyonu) *Pelargonium* özütleri için in vitro olarak gösterilmiştir. Günümüzde doğal kaynaklı bunun gibi özütlerin sahip olduğu fenolik antioksidanlara ve içeriklere olan yoğun ilginin sebebi sadece oksidatif hasarın sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özelliklerine değildir. Aynı zamanda antibakteriyel etki ile gıda güvenliğini sağlamada yardımcı olma ve gıda ürünlerinin ömrünü uzatmaları da söz konusudur.

Günümüzde doğal kaynaklı bunun gibi özütlerin sahip olduğu fenolik antioksidanlara ve içeriklere olan yoğun ilginin sebebi sadece oksidatif hasarın sebep olduğu çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici özelliklerine değildir. Aynı zamanda antibakteriyel etki ile gıda güvenliğini sağlamada yardımcı olma ve gıda ürünlerinin ömrünü uzatmaları da söz konusudur.

Bu kapsamda antibakteriyel ve antioksidan çalışmalardan bazıları aşağıdaki gibi özetlenmiştir: Kayser ve Kolodziej (1997), *P. sidoides* ve *P. reniforme*'nin ekstraktların ve bu bitkilere özgü tanımlanan bileşiklerin (scopoletin, umckalin, 5,6,7-trimetoksikumarin, 6,8-dihidroksi-5-7-dimetoksikumarin, (+)- kateşin, gallik asit) antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve beta-hemolitik *Streptococcus* 1451) ve Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*) dahil olmak üzere 8 mikroorganizmaya karşı yapılan çalışmada ham *Pelargonium* özlerinin, test edilen bakterilere karşı orta derecede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Lewu et al. (2006a) tarafından *P. sidoides*'in aseton ve metanol ekstreleri 10 bakteriye (*B. cereus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *M. kristinae*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. pooni*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) karşı antibakteriyel aktivite açısından araştırılmıştır. *Staphylococcus epidermidis* dışında, her iki solventten elde edilen ekstraktlar, bu çalışmada test edilen tüm Gram pozitif bakterilere karşı önemli aktivite göstermiştir. Lewu et al. (2006b) tarafından *P. sidoides* sürgünlerinin ve köklerinin antibakteriyel aktivitesine ilişkin karşılaştırmalı bir çalışmada, her iki kısımdan alınan ekstraktların MİK değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, farklı popülasyonlardan toplanan bitki materyallerinin benzer biyoaktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. *Staphylococcus epidermidis* ve *Micrococcus kristinae* dışında hem köklerden hem de yapraklardan elde edilen ekstraktlar, 1 ila 7.5 mg/ml arasında değişen MİK ile test edilen tüm Gram pozitif bakterilere karşı aktivite göstermiştir. Gram-Negatif bakteriler ya hiç inhibe edilmemiş ya da çok az inhibe edilmiştir. Özetlenen bu çalışmalarda kullanılan türler *P. sidoides* ve *P. reniforme* olmasına rağmen Türkiye'de yetişen *Pelargonium* türlerinden olan *P. endlicherianum*, *P. quercetorum* benzer birçok etkili antimikrobiyal molekülün önemli rezervuarı olduğu bildirilmektedir (Karatoprak et al. 2017).

Antioksidan özelliği bilinen ve bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik madde grupları başlıca fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, antosiyaninler ve karotenlerdir (Jimenez et al. 1999). *Pelargonium* cinsine ait türler ise fenolik bileşiklerce oldukça zengindir.

P. inquinans ile yapılan in vitro antioksidan aktivite deneylerinde metanol, etil asetat, butanol, n-hekzan ve su ekstreleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikalini (DPPH●) güçlü süpürücü etki göstermişlerdir. in vitro ve aynı zamanda hücre ortamında da güçlü antioksidan etkiye

sahip etil asetat ekstresi ve bu ekstreden izole edilen 1,2,3,4,6-pentaO-galloyl- β -Dglukoz'un ise doza bağılı olarak hücreyi oksidatif olarak hasardan koruduğu gözlenmiştir (Piao et al. 2008).

P. betulinum ve *P. crispum* türlerinin ham aseton ekstreleriyle yapılmış olan DPPH• radikali süpürücü etki tayini deneyinde, IC50 değeri $4,72 \pm 0,14$ μ g/mL olan askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılmış ve ekstrelerin IC50 değerleri sırasıyla $4,13 \pm 0,14$ μ g/mL ve $4,49 \pm 0,18$ μ g/mL şeklinde bulunmuştur. Bu iki türde askorbik asit kadar antioksidan aktivite göstermiştir (Lalli et al. 2008). *P. graveolens* L'Herit. ex Ait.'in yaprak ve çiçeklerinden elde edilen metanol ve su ekstreleri, 1,1-difenil-2- pikrilhidrazil (DPPH•) ve 2,2'-azinobis (3-ethylbenzotiazolin-6- sülfonat) (ABTS+•) radikallerini süpürücü etki tayininde butil hidroksi toluen (BHT) ile kıyaslanabilir derecede aktif bulunurken uçucu yağı ise BHT' den daha aktif bulunmuştur. *P. reniforme* CURT. türünden izole edilen tanen ve flavonoidlerin referans antioksidan madde olarak kullanılan askorbik asitten daha yüksek DPPH• radikalini süpürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Latté et al. 2004). *P. radula* (Cav.) L'Hérit türünün yapraklarının etanol, su ekstreleri ve uçucu yağı ile yapılan radikal süpürücü etki, şelat kapasitesi, indirgeme gücü ve β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu engelleyici etki tayininde ekstreler antioksidan olarak bulunurken uçucu yağın ise ekstrelerden daha aktif olduğu gözlenmiştir (Petlevski et al. 2013). *P. purpureum* Steud. yaprak ekstreleri ile yapılan in vivo bir çalışmada plazma ve bazı organların antioksidan kapasitesinin ölçümü yapılmıştır. Çalışmada demir indirgeme ve total radikal yakalayıcı antioksidan parametreleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre *P. purpureum*, plazma, kalp ve akciğer doku homojenatlarında antioksidan kapasiteyi artırmıştır (Koutelidakis et al. 2009).

Pelargonium sp.'ye ait kök ve dokularda birçok çalışma mevcut olsa da özellikle ülkemizde de var olan *P. endlicherianum*, *P. quercetorum* türleri için çalışmalar azdır. Ülkemizde yetişen bu türlerin köklerinin ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan ve fitokimyasal özelliklerinin bu projeye tespiti literatüre katkı sağlayacaktır.

3. Materyal ve Metot

3.1. Bitki Materyalleri

Bu projede *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. ve *Pelargonium quercetorum* Agnew (Hakkâri sardunyası) kökleri ve *P. sidoides* türünün toz hali (%99 food grade) temin edildi.

3.2. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyallerin (Yerli iki tür) kurutulmuş toprak altı kısımları (100 g) kabaca toz edilerek 50 g toz edilmiş kök kısmı %11'lik etanol ve diğer 50 g kısmı %70'lik metanol ile çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 8'er saat süreyle üç defa ekstre edildi. Elde edilen ekstratlar birleştirilip vakum altında rotavaporda (37-38 °C) yoğunlaştırıldı. Toz halinde temin edilen *P. sidoides* için işlemler aynen tekrarlandı. Tüm ekstratlar liyofilize edildi ve analiz anına kadar +4 °C'de saklandı (Karatoprak et al. 2017).

3.3. LC-MS/MS için numunelerin hazırlanması ve LC-MS/MS ile fitokimyasal içerik tayini

Ektratlardan fitokimyasal içerik tayini LC-MS/MS yöntemiyle yapılacaktır. Bu amaçla ekstratların 20 µL'si LC-MS/MS cihazına enjekte edilecektir. LC-MS/MS analiz koşulları; validasyonu daha önce yapılan ve uluslararası Industrial Crops and Products dergisinden yayınlanan ("Yılmaz, M. A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC-MS/MS method validation. Industrial Crops and Products, 149, 112347.") literatür dikkate alındı. Açıkça; 53 fitokimyasal bileşenin tespiti için ayarlanan ikili MS cihazı bağlanmış bir Nexera modeli Shimadzu UHPLC kullanılarak yapılacaktır. Sıvı kromatografisi LC-30AD ikili pompa, DGU-20A3R degazör, KTO-10AS vp kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici ile donatılmıştır. Kromatografik ayırma, C18 ters-faz analitik kolonu Inertsil ODS-4 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) ile gerçekleştirilecektir. Kolon sıcaklığı 40°C'de sabit tutulacaktır. Elüsyon gradienti mobil faz A (su, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ile oluşturulacaktır. Gradient programı B çözücüsünün aşağıdaki değerlerine göre t (dk) uygulanacaktır. B %: (0.40), (20.90), (23.99), (24.40), (29.40). Çözücü akış hızı: 0.5 mL/dk olarak uygulanıp enjeksiyon hacmi 4µL olarak ayarlanacaktır. MS tespiti Shimadzu LC-MS 8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynak işletimi ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. LC-MS/MS verileri Lab Solutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldı. Çoklu reaksiyon takip işlemi (MRM) modu analizi ölçmek için kullanılacaktır. Çalışmada her bir bileşik analizi için üçer kez uygulama yapıldı. Birincisi kantitatif sonuçlar için yapıldı. İkincisi ve üçüncüsü ise teyit amaçlı yapıldı. Optimum Electrospray Ionization (ESI) parametreleri; 350°C ara yüz sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı, 400°C ısı bloğu sıcaklığı, 3L/dk. Nebullizer gaz akışı ve 15 L/dk. kurutucu gaz akışı olarak belirlendi (Köksal ve ark., 2017; Yılmaz,

2020).

3.4. Antimikrobiyal Testler

Antimikrobiyal testler öncesinde ekstraktlar 0.20 veya 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirildikten sonra steril deney tüplerine alınıp kullanıldı.

3.4.1. Kullanılan Bakteriler

Bu araştırmada kullanılan bakteriler [(*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644)] Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden elde edilen gıda kaynaklı izolatlardır. Ekstraktların antibakteriyel etkilerinin belirlenmesi kültürler Trypticase Soy Yeast Extract (TSYE) besiyerinde 35-37 °C'de 24 saat aktive edildi. Bakteriyel yoğunlukları 0,5 McFarland standardı kullanılarak 1×10^8 CFU mL⁻¹ 'e ayarlandı.

3.4.2. Disk Difüzyon yöntemi

Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından otomatik pipetle 100 µL alınarak TSA besiyeri üzerine dökülecek ve önceden steril edilmiş bir özeyle besiyerine yayılması sağlandı. Sonraki süreçte Whatman no:1 kağıttan hazırlanan bitki ekstraktları emdirilmiş 6 mm çapındaki diskler besiyerine konumlandırıldı. 37°C/18-24 saat inkübasyon sonrası zon çapları mm olarak ölçüldü.

3.4.3. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi

Ekstraktların antibakteriyel etkisi agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Bunun için kültürden 0.5 McFarland mikroorganizma solüsyonu hazırlandı ve 100 µL inokulum drigalski spatülü ile agar yüzeyine yayıldı. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan süspansiyon için Muller Hinton Agar (MHA) kullanıldı. Agarda istenilen çaplarda delik oluşturabilmek için agar delici kullanıldı ve her kullanımdan sonra alkol içerisine batırıp çıkarılıp ve ateşle yakılıp sterilize edildi. Steril olan agar delici ile 6 mm çapına sahip kuyucuklar açıldı. Açılan bu kuyucuklara ise 30 µL bitki ekstreleri eklendi. Yeteri kadar kuruma gerçekleştikten sonra bakteriler 37°C/18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda zon çapları mm olarak ölçüldü.

3.4.4. Mikro dilüsyon yöntemiyle MİK belirlenmesi

Ekstraktların Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak CLSI M07-A10 kılavuzu dikkate alındı. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanıp olan taze bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton Broth (MHB) (180 µL) F tabanlı 96 kuyucuklu mikropatlara, 20 µL olarak eklendi (Wiegand et al. 2008). Ardından iki kat seyreltim metodu ile hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlara sahip (6,25-100 mg/mL) bitki ekstrelerinden 180 µL

kuyucuklara aktarıldı. Mikroplaklar 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir mikroplakada bir adet sterilit kontrol kuyucuğu (seyreltimlerde kullanılan besiyeri, 200 µL) ve bir adet üreme kontrol kuyucuğu (sadece inokulum eklenmiş besiyeri; 180µL+20µL) bulunmaktadır. Mikroorganizmaların yoğunlukları 600 nm'de mikroplak okuyucu (Epoch, BioTek Instruments, Inc.) ile belirlendi. Bulanıklığın artık görülmediği, üremenin tamamen inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi (Bilikova et al. 2015).

3.5. Antioksidan Aktivite

3.5.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini

Etanol ve metanol ekstraktlarının fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi ile total olarak belirlendi (Singleton et al. 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Bunun için öncelikle gallik asitten bir standart grafik hazırlandı. Stok çözeltiden 1000 µg ekstre alınarak bir vezin kabına konulacak ve hacim 23 ml'ye saf suyla tamamlandı. Karışıma 0,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ve 3 dakika sonra da 1,5 ml %2'lik Na₂CO₃ ilave edildi. Numuneler 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin 760 nm'deki absorbansı, saf sudan oluşan köre karşı okundu. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalen (GAE) miktarı standart grafikten elde edilen denklem yardımıyla tespit edildi. Sonuçlar gallik asit ekivalent olarak verildi (Bursal, 2009).

3.5.2. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi

DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre yapıldı (1958). Serbest radikal olarak DPPH•'ın 1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltiler kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanoldan oluşan köre karşı 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH• çözeltisi kullanıldı. Azalan absorbans geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verecektir.

3.5.3. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi

ABTS radikali giderme aktivitesi Re ve arkadaşlarının yaptığı metoda göre belirlendi (1999).

Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanacaktır. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık persülfat çözeltisi ilave edilerek ABTS radikalleri üretildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbanısı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile $0,700 \pm 0,025$ nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılacak olan materyalin etanol, metanol ekstraktların farklı konsantrasyonlarına (10-30 µg/ml) 1'er ml ABTS radikal çözeltisi ilave edilecek ve yarım saat inkübe edildi. Etanoldan oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanıslar kaydedildi.

3.5.4. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini

Ekstraktlardan 1:4 oranında saf su ile karıştırılmış ve 0,15 ml NaNO₂ (%5) çözeltisi eklendi. 6 dakika bekletildikten sonra 0,15 ml AlCl₃ (%10) çözeltisi eklendi. Tekrar 6 dakikalık bir beklemeden sonra 2 ml NaOH (%4) çözeltisi eklenmiş ve 5 ml ye saf su ile tamamlandı. Homojen hale geldikten 15 dakika sonra absorban değeri 510 nm'de ölçüldü. Standart olarak kuersetin kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Materyallerin mineral içeriği

Tablo 1. *P. sidoides*, *P. endlicherianum* ve *P. quercetorum* kök örneklerine ait mineral içeriği (µg/kg)

Örnek	Na	Mg	K	Mn	Fe	Cu	Zn	Se
<i>P. sidoides</i>	601.923	99.377	681.251	68.333	106.357	7.291	<0.000	360.814
	610.852	97.102	690.450	67.210	105.456	7.310	<0.000	378.452
	608.702	101.84	678.212	67.101	107.252	7.254	<0.000	358.145
<i>P. endlicherianum</i>	511.035	86.690	66.990	53.965	183.209	0.5197	<0.000	216.650
	515.102	85.152	69.254	56.378	187.250	0.5520	<0.000	212.422
	509.084	87.223	63.280	52.210	185.284	0.5412	<0.000	217.690
<i>P. quercetorum</i>	516.453	106.616	44.149	75.875	210.960	<0.000	<0.000	239.935
	520.652	105.520	42.120	75.533	212.052	<0.000	<0.000	240.114
	614.410	107.256	43.215	78.420	214.850	<0.000	<0.000	242.520

Tablo 1'de araştırmada yer verilen 3 türe ait örneklerde 8 elementin kantitatif sonuçları verilmiştir.

8 element içerisinde mineral çeşitliliği bakımından *P. sidoides* ve *P. endlicherianum* daha zengin görünmektedir. Her 3 örnekte Zn elementi tespit edilememiştir (<0.000). Akkemik ve ark. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada *P. quercetorum* türünün potasyum (3.21%), kalsiyum (0.77%), fosfor (0.23%) ve magnezyum açısından (0.22%) zengin olduklarını bildirmişlerdir. Bu projede

türlerin mineral içerikleri kalitatif açıdan değerlendirildiğinde *P. quercetorum* haricinde diğer iki türün aynı elementleri içerdikleri görülmektedir.

4.2. Antioksidan analiz sonuçları

Tablo 2.'de görüldüğü üzere 3 tür için farklı iki (metanol ve etanol) çözücü ile ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve üç farklı yöntemle antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. %11 etanol ve %70 metanol çözücü olarak kullanılmıştır. Metanolik kök ekstresinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı etanolik ekstreye göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

%70 Metanol kök ekstresinin toplam fenolik ve flavonoit içerik bakımından zengin olduğu ve antioksidan aktivite deneylerinde de güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir.

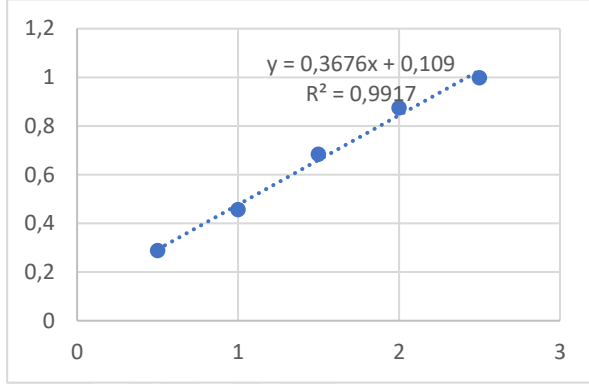
Yapılan bir çalışmada *P. sidoses* standardize ekstresinden hazırlanan Umca® ekstresinin toplam fenol içeriği 9.43 ± 0.28 mgGAE/g ekstre bulunmuştur. Bu içerik *P. quercetorum* %11 etanolik kök ekstresinin toplam fenol içeriğine göre (162.90 ± 6.95 mgGAE/gekstre) oldukça düşük olup *P. quercetorum*'un fenolik içerik bakımından zengin olduğunu göstermektedir (Çakal, 2009). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *P. endlicherianum* köklerinden hazırlanan %70'lik metanol ekstresinin indirgeyici gücünün % 11'lik etanol ekstresinden daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da literatürdeki verileri desteklemektedir.

Tablo 2. *P. sidoses* (PeSİD), *P. endlicherianum* (PeEnd) ve *P. quercetorum* (PeQue) kök tozu ekstraktlarının antioksidan sonuçları

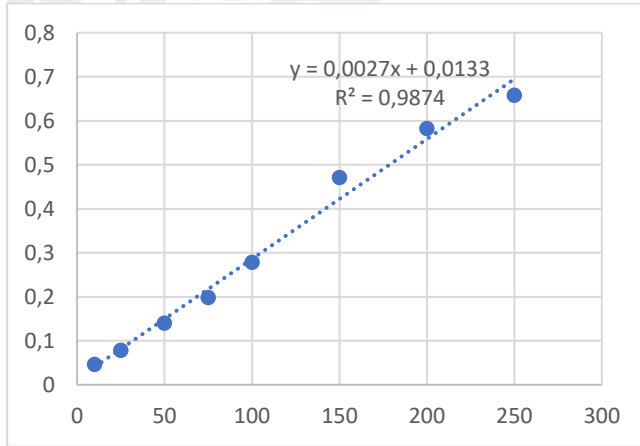
Numune Adı	Topla m Fenolik Madde (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid Madde (mg QE/g)	DPPH (IC ₅₀) (µg/mL)	DPPH µM Trolox/ g	DPPH mM Trolox/10 0 g	ABTS (IC ₅₀) (µg/mL)	ABTS µM Trolox/ g	ABTS mM Trolox/10 0 g	FRAP (µm Trolox/g)
PeQue- Etanol	34,200	14,038	223,55	46,66	4,67	47,67	114,213	11,421	169,21
	34,808	14,478	222,95	46,92	4,69	47,53	114,213	11,421	177,91
	34,656	14,588	228,96	46,18	4,62	46,33	116,227	11,623	150,98
PeQue- Metanol	50,688	22,291	147,88	16,47	1,65	29,03	18,503	1,850	265,23
	50,726	22,584	140,58	16,31	1,63	30,13	17,512	1,751	265,23
	49,852	21,117	142,27	16,26	1,63	28,70	18,860	1,886	247,28
PeSid- Etanol	8,936	2,080	880,42	3,09	0,31	130,41	4,200	0,420	51,96
	8,252	1,933	765,98	3,61	0,36	156,89	3,440	0,344	47,06
	8,328	1,970	900,00	3,04	0,30	119,14	4,680	0,468	52,77
PeSid- Metanol	13,191	3,180	319,79	8,56	0,86	83,90	6,602	0,660	83,51
	13,685	3,327	302,48	9,00	0,90	87,80	6,338	0,634	91,68
	13,533	3,180	293,48	8,79	0,88	87,41	6,292	0,629	78,62
PeEnd- Etanol	8,670	1,933	791,16	3,53	0,35	140,20	3,936	0,394	52,50
	8,024	1,823	817,76	3,20	0,32	151,49	3,642	0,364	52,23
	8,708	2,043	786,60	3,51	0,35	143,61	3,859	0,386	44,34
PeEnd- Metanol	13,191	2,960	325,74	8,47	0,85	101,71	5,424	0,542	78,89
	12,621	2,813	312,45	8,75	0,88	96,35	5,734	0,573	71,00
	13,153	3,107	302,21	9,05	0,90	89,26	6,245	0,625	74,54
BHA	-	-	7,028	-	-	2,052	-	-	-
BHT	-	-	6,915	-	-	2,058	-	-	-
Trolox	-	-	7,098	-	-	2,183	-	-	-

α Tokoferol	-	-	19,480	-	-	4,284	-	-	-
--------------------	---	---	--------	---	---	-------	---	---	---

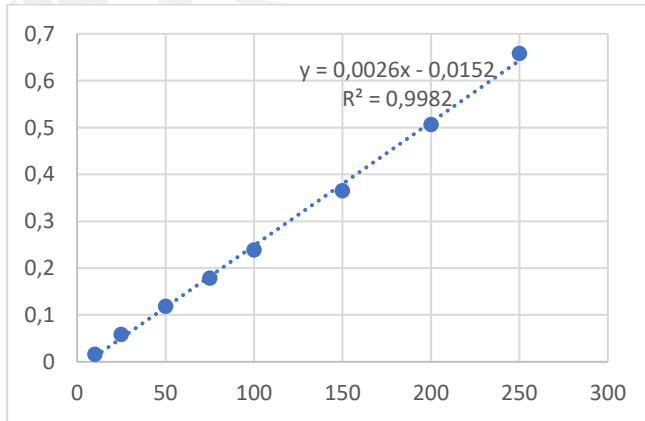
Şekil 1, 2 ve 3'te antioksidan analizlerinde kullanılan standart maddelerin R^2 değerlerini gösteren eğriler verilmiştir.



Şekil 1. FRAP için trolox grafiği



Şekil 2. Toplam flavonoid için quercetin grafiği



Şekil 3. Toplam fenolik madde için gallik asit grafiği

4.3. Antimikrobiyal analiz sonuçları

Ülkemiz zengin bir bitki örtüsüne sahiptir ve *Pelargonium* türlerinden *P. endlicherianum* ve *P. quercetorum* ülkemizde yetişmektedir. Ülkemizde doğal olarak yetişen *P. endlicherianum* bitkisi ile ilgili literatürde çok az çalışmaya rastlanmıştır. O nedenle bu projede *P. sidoides* ile benzer biyolojik aktiviteye sahip olabileceği düşünülerek Türkiye’ de yetişen *P. endlicherianum*’un kök ekstresinin antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır.

Son zamanlarda tüketiciler gıda güvenliği konusunda giderek daha fazla bilinçlenmeye başlamıştır. Gıda endüstrisinde bakterileri ve diğer zararlı mikroorganizmalara karşı kullanılan sentetik koruyucuların rolü gıda bozulmalarını önlemek ve raf ömrünü arttırmaktır. Fakat bu sentetik koruyucuların insanlarda olumsuz izlenimler bıraktığı bilinmektedir. Bu nedenle gıda endüstrilerinde doğal koruyucu olarak kullanılacak doğal antimikrobiyallerin araştırılmasına büyük çaba sarf edilmektedir (Gyawali ve Ibrahim, 2014). Ayrıca; hem gıda güvenliği hem de insan sağlığı için kullanılan birçok antibiyotige karşı mikroorganizmalar yoğun şekilde direnç kazanmışlardır. Birçok çalışmada *Pelargonium* türlerinin esansiyel yağları, farklı çözücülerle elde edilen ekstraktları çeşitli bakteri ve fungusların kontrol altına alınması veya yok edilmesi için kullanılmıştır. Bu çalışmalarda MIK değerinin <100 mg/ml olduğu durumda güçlü, 100-500 mg/ml arasında olduğu değerlerde orta, 500-1000 mg/ml seviyesinde ise zayıf antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu kapsamda projeden elde edilen verilerde hem etanol hem de metanol ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*’e karşı güçlü antibakteriyel etki gösterdiği söylenebilir (Tablo 3).

Tablo 3. Farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktların MIK (mg/ml) ve zon (çap, mm) değerleri

Mikroorganizmalar	%11 Etanol						%70 Metanol					
	PeQue		PeSid		PeEnd		PeQue		PeSid		PeEnd	
	MIK	Zon	MIK	Zon	MIK	Zon	MIK	Zon	MIK	Zon	MIK	Zon
<i>Escherichia coli</i>	75	5	75	5	75	6	50	5,5	50	5,3	50	5,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	7	25	6	25	6,5	12,5	7,5	12,5	7	12,5	8
<i>Salmonella Typhimurium</i>	100	4	100	4	100	4	100	5	100	5	100	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	75	3	75	3	75	3,2	50	3,2	50	3,2	50	3,4

Tablo 3’e bakıldığında hazırlanan ekstraktların farklı konantrasyonlarda inhibe edici etki gösterdiği görülmektedir. Her üç türden elde edilen ekstraktlara karşı en duyarlı bakterinin *Staphylococcus aureus* olduğu görülmüştür.

Bitkilerden sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu için en iyi ekstraksiyon çözücüsü alkol olarak kabul edilmektedir. Alkoller içerisinde ise metanol ve su karışımlarının bitkiye ait özgü biyoaktif bileşenleri daha iyi ekstrakte ettiği için tercih edildiği bilinmektedir. Bu projede standart ekstraksiyon metodu olarak kabul edilen %70’lik metanol yöntemi kullanılmıştır. Bununla birlikte %11’lik etanolün tıbbi literatürde *P. sidoides*’in ekstraksiyonu için kullanıldığı bilindiğinden dolayı çalışmamıza bu yöntem de ilave edilmiştir. Bitkilerden elde edilen özütler içerisinde en fazla antimikrobiyal etkiyi fenolik bileşikler göstermektedir. Antioksidan sonuçlarımız göz önüne alındığında metanol ekstraktlarının hem toplam fenolik hem de flavonoit miktarı açısından daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. İki sonuç birlikte düşünüldüğünde antimikrobiyal etkinin bu sebeple metanol ekstraktlarında daha fazla olduğu düşünülebilir.

Bakteriyel kaynaklı hastalıklarda *P. sidoides* ve *P. reniforme*’nin kök ekstrelerinin tedavi edici olarak kullanılması, bu ekstrelerin antimikrobiyal, antioksidan ve immünomodülatör gibi çeşitli

biyolojik etkilere sahip olması nedeniyledir. Bu açıdan değerlendirildiğinde ülkemizde yetişen iki türden elde edilen kök ekstraktlarının da tıbbi manada kullanımı yaygın olan *P. sidoides* ve *P. reniforme* gibi kullanıma alternatif olabileceği sonucuna varılabilir.

Lewu ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir araştırmada *P. sidoides*' in köklerinin metanol ve aseton ekstrelerinin Gram pozitif (*Bacillus cereus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Micrococcus kristinae*, *S. pyogenes*), Gram negatif (*E. coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) ve funguslar (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporium*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium notatum*) üzerine antimikrobiyal aktivitesi agar dilüsyon tekniği ile araştırılmıştır. Bütün ekstreler ile Gram pozitif bakterilere karşı inhibitör aktivite saptanmış ve MİK değerleri 1-5 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

P. reniforme'nin kök ve yaprak ekstreleri *S. epidermidis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumonia* gibi alkol suistimali sonrası karaciğere yüksek derecede endotoksin salarak harabiyet oluşturan bakterilere karşı etkili bulunmuştur ve bu durum Afrika'da geleneksel kullanımına da açıklık getirmektedir (Adewusi ve Afolayan, 2009).

4.4 Fitokimyasal içerik sonuçları

70'lik metanol ve %11'lik etanol ekstrelerinde tanımlanan aposinin (1-(4-Hidroksi-3-metoksifenil) etanon) ana madde olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrelerde benzoik asit türevlerinden; gallik asit, 3,5-dihidroksi benzoik asit ve vanilik asit, hidroksisinnamik asit türevlerinden; ferulik asit ve kafeik asit, flavonoit türevlerinden kersetin, tanen türevlerinden ise 1,2,3,4,6-pentagalloyl glukozun varlığı tespit edilmiştir. LC-MS/MS sonuçlarının alınmasında her üç türe ait kök ekstrelerinin mikslerinin içeriğine bakılmıştır (Tablo 4).

	%11 Alkol	%70 Alkol
Gallik asit	0,532	1,072
3,5 dihidroksi benzoik asit	3,010	3,250
Kafeik asit	1,420	1,520
Homovanilik asit	0,324	0,356
Vanilik asit	0,120	0,136
Aposinin	2,560	2,860
1,2,3,4,6-Pentagalloyl glukoz	0,540	0,556
Ferulik asit	0,086	0,900
Kersetin	0,664	0,755

Literatürde *P. sidoides* ve *P. reniforme*'nin çeşitli fenolik ve polifenolik bileşikler taşıdığı, köklerinin ise 6,7,8-trihidroksikumarin ve 8-hidroksi-5,6,7- trimetoksikumarin içerdiği belirtilmiştir. Yapısal olarak kumarinle ilişkilendirilen umkalin ana bileşik olarak tespit edilmiştir. Skopoletin, 7-hidroksi-5,6- dimetoksikumarin ve 7-hidroksi-5,6-dimetoksikumarinin 7-metil eter ve 7-glukozit türevi, *P. reniforme* de dahil olmak üzere *P. betulinum*, *P. capitatum*, *P. cucullatum*, *P. hirtum*, *P. luridum*, *P. moreanum*, *P. myrrifolium*, *P. radula*, *P. salmoneum*, *P. sidaefolium*, *P. triste* ve *P. zonale* türlerinde tanımlanmıştır. *P. inquinans* türünde aktif bileşik 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glukoz olarak belirlenmiştir (Adewusi ve Afolayan, 2009);

Bu projede LC/MS-MS sonuçlarının yorumlanması için kullanılan standartlara ait kalibrasyon eğrileri EK-1 olarak Kaynaklar kısmından sonra verilmiştir.

5. Kaynaklar

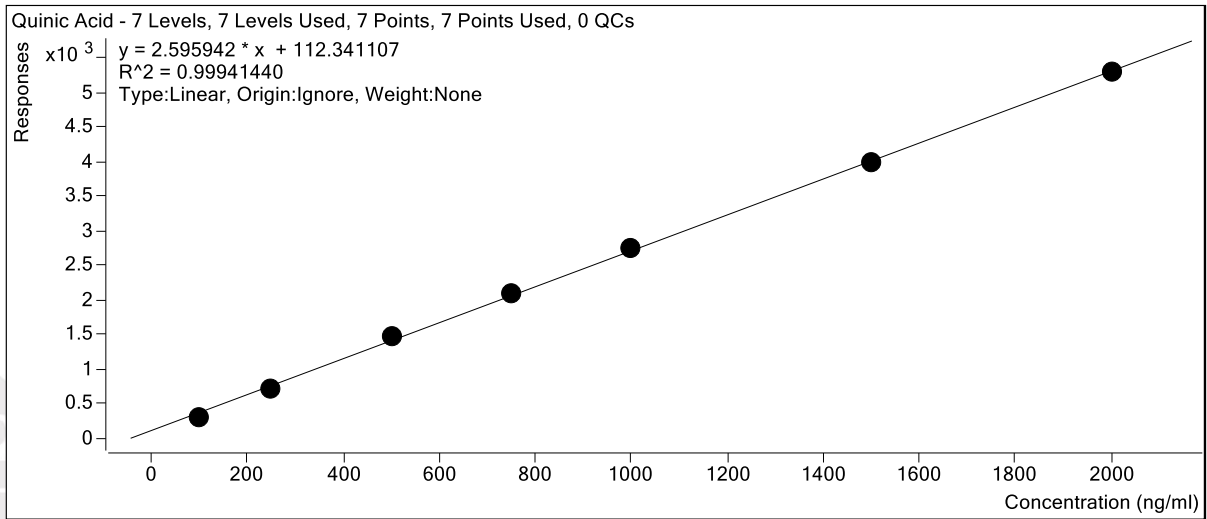
1. Çakal S (2009). *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. (Geraniaceae) kök ekstrelerinin UMCA® preparatı ile karşılaştırılmalı araştırılması, (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir 2009, ss 15-27. <https://earsiv.anadolu.edu.tr/xmlui/handle/11421/7224>
2. Gödecke, T., Kaloga, M., & Kolodziej, H. (2005). A phenol glucoside, uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 60(6), 677-682.
3. Kolodziej H. *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides* – their botany, chemistry and medicinal use. In: Lis-Balchin M, editor. *Geranium and Pelargonium*. Taylor & Francis, London 2002, 262-290
4. Latte KP, Kaloga M, Kolodziej H. Reniformin, a unique diterpene ester from the roots of *Pelargonium reniforme*. *Nat Prod Commun* 2007, 2:883-886
5. Jimenez M, Garcia-Carmona, F. Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 1993-2000.
6. Piao X, Piao XL, Kim HY, et al. Antioxidative Activity of Geranium (*Pelargonium inquinans* Ait) and its Active Component, 1,2,3,4,6-Penta-Ogalloyl- β -Dglucose. *Phytother Res* 2008; 22, 534–538.
7. Latté KP, Kolodziej H. Anti-oxidant properties of phenolic compounds from *Pelargonium reniforme*. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 4899–4902.
8. Petlevski R, Flajs D, Kalodjera Z, et al. Composition and antioxidant activity of aqueous and ethanolic *Pelargonium radula* extracts. *S Afr J Bot* 2013; 85: 17– 22.
9. Koutelidakis AE, Argiri K, Serafini M, et al. Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition* 2009; 25: 453–458.
10. Lalli YY, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, et al. in vitro biological activities of South African *Pelargonium* (Geraniaceae) species. *S Afr J Bot* 2008; 74: 153– 157.
11. Karatoprak, G. Ş., Aydin, G., Altinsoy, B., Altinkaynak, C., Koşar, M., & Ocsoy, I. (2017). The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 21-26.
12. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Freeradical scavenging action of medicinal herbs from Ghana *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *Gen Pharmacol* 1999;32:661-667.
13. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.

14. Bílikova, K., Huang, S., Lin, I., Šimuth, J., & Peng, C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*, 68(1), 190-196.
15. Köksal, E., Tohma, H., Kılıç, Ö., Alan, Y., Aras, A., Gülçin, I., & Bursal, E. (2017). Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*: analysis of its phenolic compounds using HPLCMS/MS. *Scientia pharmaceutica*, 85(2), 24.
16. Yilmaz, M. A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Industrial Crops and Products*, 149, 112347.
17. Karatoprak, G. Ş., Aydın, G., Altinsoy, B., Altinkaynak, C., Koşar, M., & Ocsoy, I. (2017). The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 21-26.
18. Uslu, H., Yoruk, O., Ayyildiz, A., & Aktan, B. (2009). Antibacterial spectrum of *Umckaloabo* (*Pelargonium sidoides*) on upper airway infection agents. *Eur. J. Gen. Med*, 6, 245-248.
19. Baraniak, J. & Kania-Dobrowolska, M. (2020). *Pelargonium* root (*Pelargonium sidoides* DC) extract in paediatric patients-food supplement or medicine?. *Herba Polonica*, 66(2)
20. El Aanachi, S., Gali, L., Nacer, S. N., Bensouici, C., Dari, K., & Aassila, H. (2020). Phenolic contents and in vitro investigation of the antioxidant, enzyme inhibitory, photoprotective, and antimicrobial effects of the organic extracts of *Pelargonium graveolens* growing in Morocco. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101819.
21. Kayser O, Kolodziej H. Antibacterial activity of extract and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Med* 1997, 63:508-510.
22. Lewu FB, Grierson DS, Afolayan AJ. Extracts from *Pelargonium sidoides* inhibit the growth of bacteria and fungi. *Pharm Biol* 2006a, 44:279-282.
23. Lewu FB, Grierson DS, Afolayan AJ. The leaves of *Pelargonium sidoides* may substitute for its roots in the treatment of bacterial infections. *Biol Conserv* 2006b, 128:582-584.
24. Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>.
25. Adewusi EA, Afolayan AJ. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (Geraniaceae). *Afr J Biotechnol* 2009, 8 (22): 6425-6433.
26. Saraswathi J, Venkatesh K, Nirmala B, et al. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* species. *J Med Plants Res* 2011; 5(13): 2587-2598.

EK-1: LC-MS/MS Kalibrasyon eğrileri

Target Compound

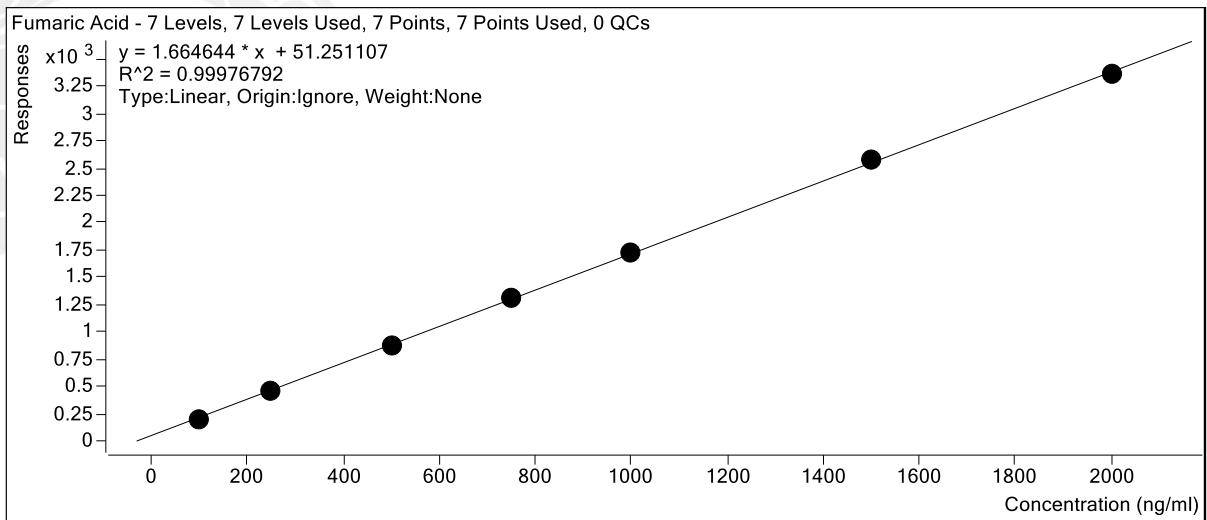
Quinic Acid



Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
Calibration	1	☒	319	100,000	3,1868
Calibration	2	☒	734	250,000	2,9362
Calibration	3	☒	1461	500,000	2,9219
Calibration	4	☒	2087	750,000	2,7820
Calibration	5	☒	2762	1000,000	2,7621
Calibration	6	☒	3976	1500,000	2,6509
Calibration	7	☒	5283	2000,000	2,6414

Target Compound

Fumaric Acid

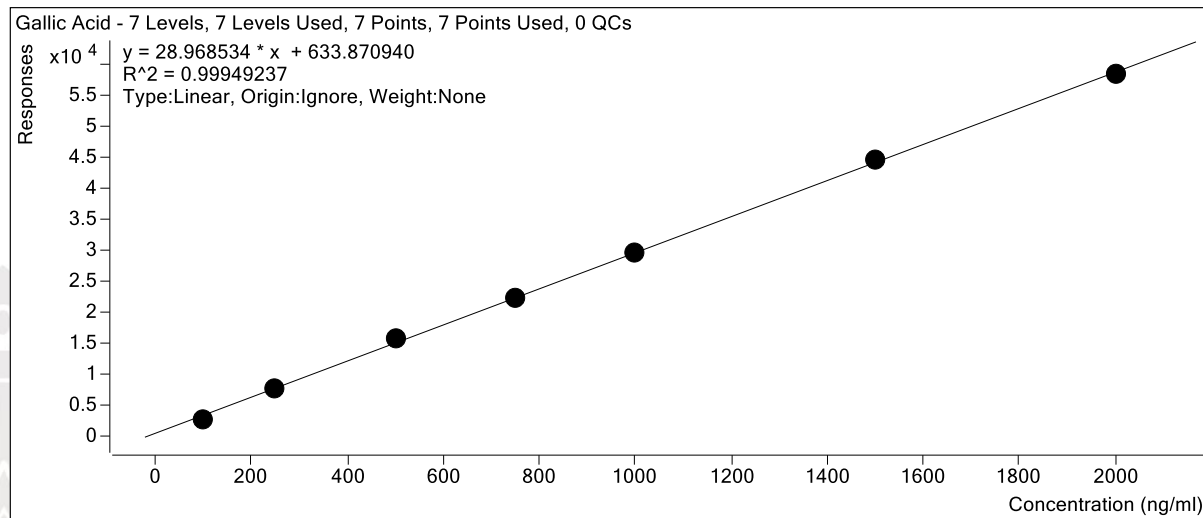


Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
Calibration	1	☒	208	100,000	2,0788
Calibration	2	☒	455	250,000	1,8192
Calibration	3	☒	886	500,000	1,7715

Calibration	4	☒	1305	750,0000	1,7394
Calibration	5	☒	1737	1000,0000	1,7374
Calibration	6	☒	2568	1500,0000	1,7121
Calibration	7	☒	3355	2000,0000	1,6773

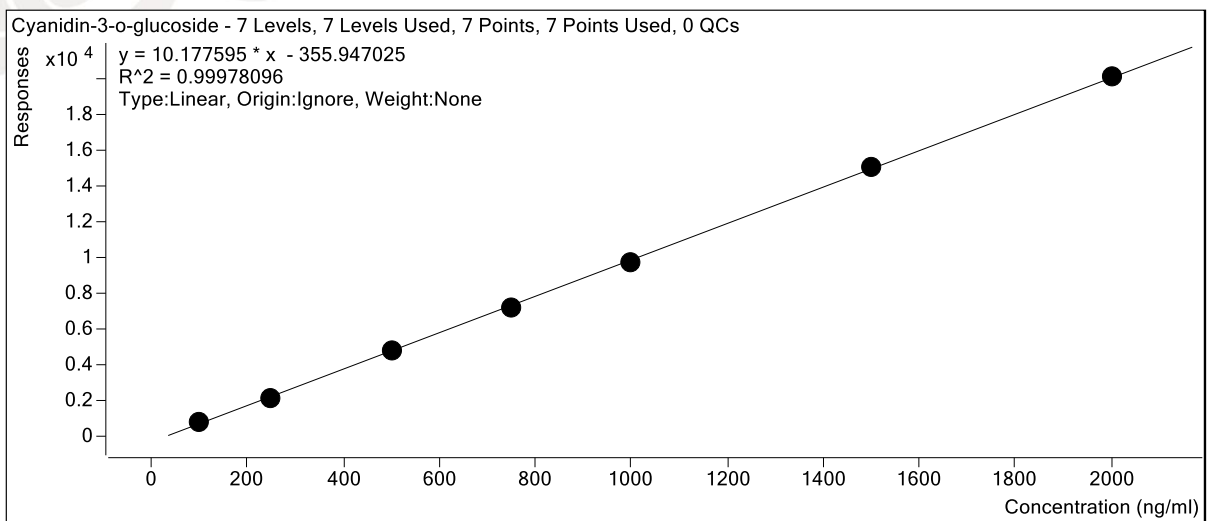
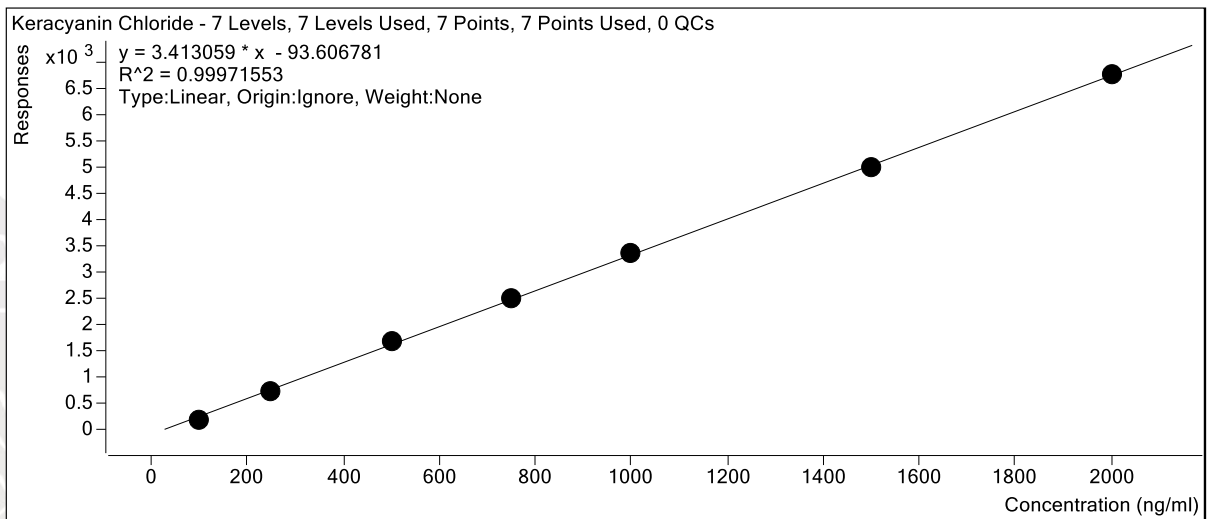
Target Compound

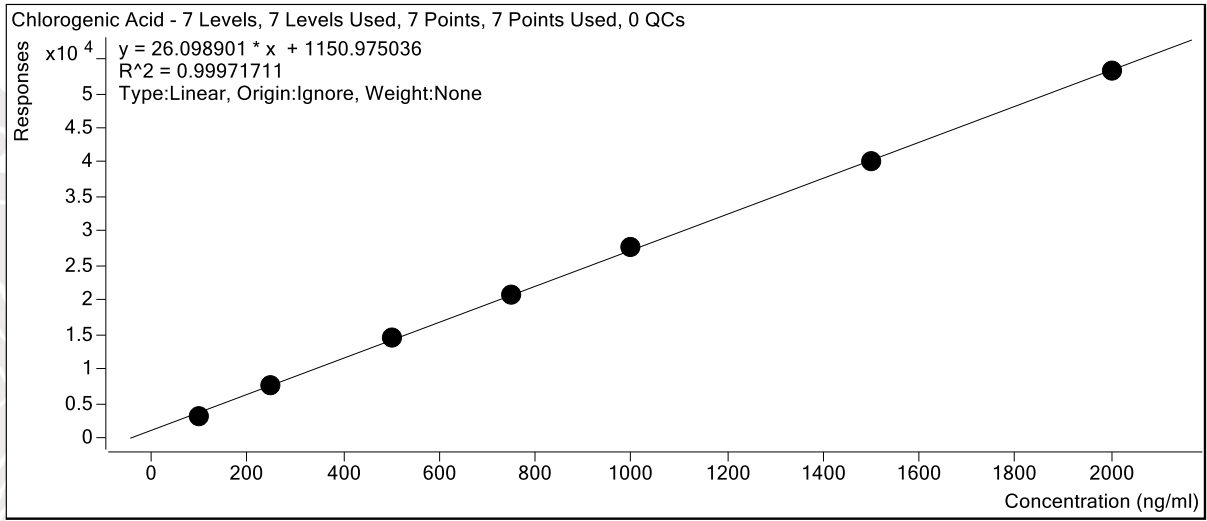
Gallic Acid



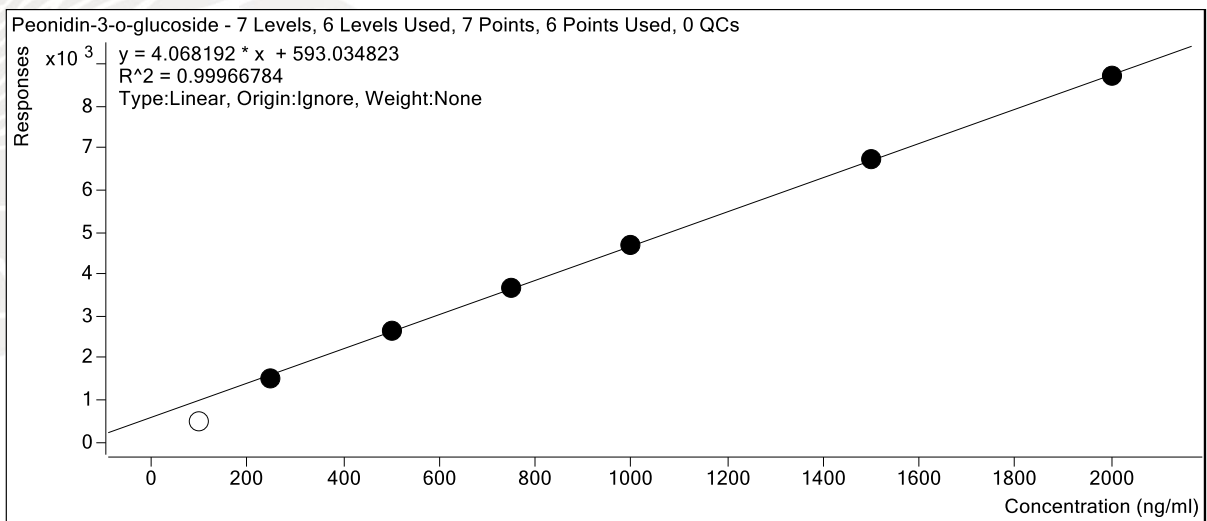
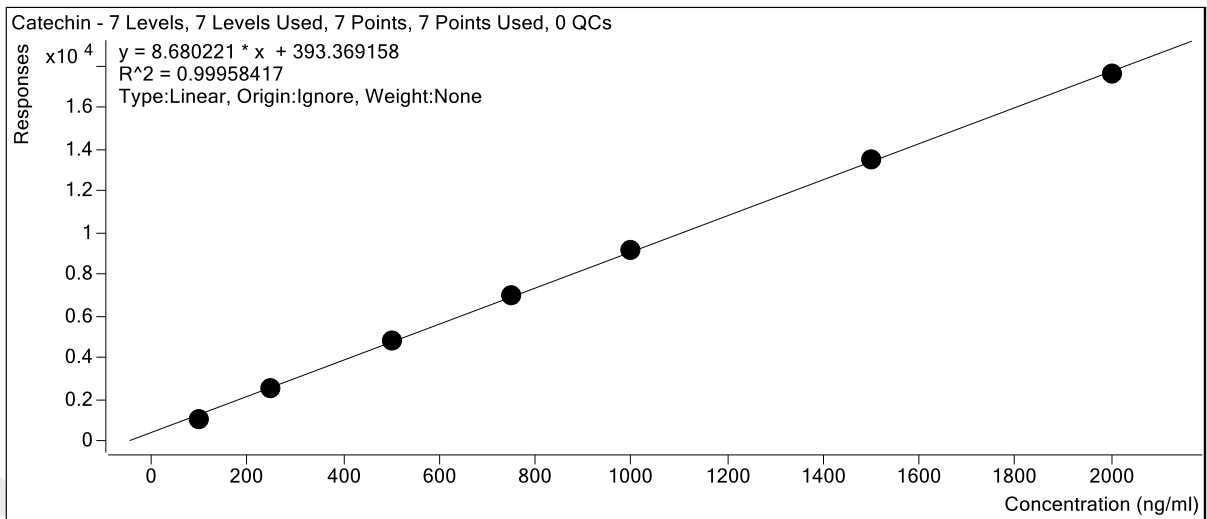
Cal Type	Level	Enabled	Response	Exp Conc	RF
Calibration	1	☒	3019	100,0000	30,1880
Calibration	2	☒	7657	250,0000	30,6294
Calibration	3	☒	15892	500,0000	31,7842
Calibration	4	☒	22318	750,0000	29,7578
Calibration	5	☒	29682	1000,0000	29,6818
Calibration	6	☒	44421	1500,0000	29,6142
Calibration	7	☒	58155	2000,0000	29,0777

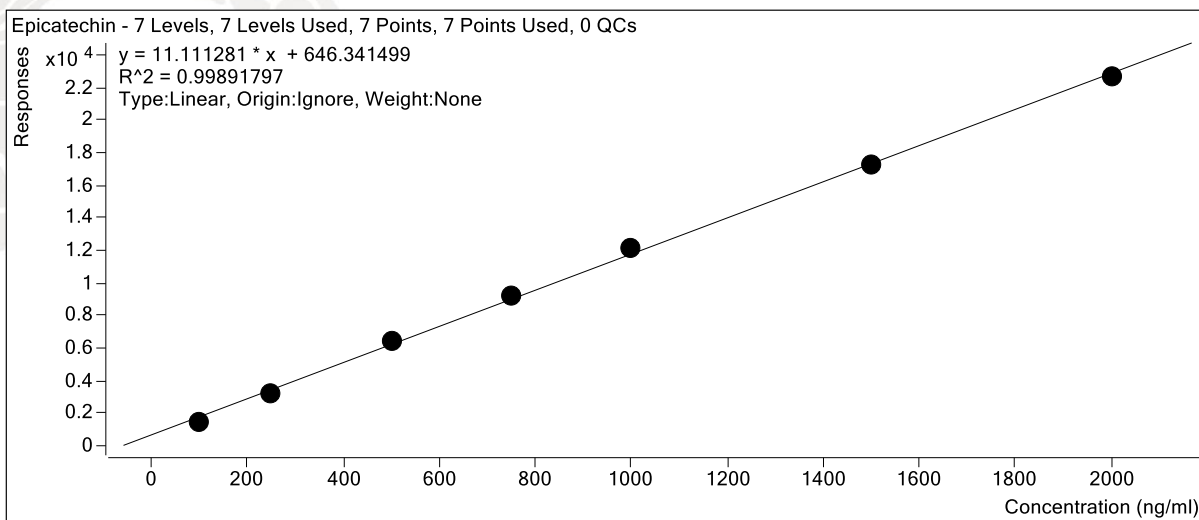
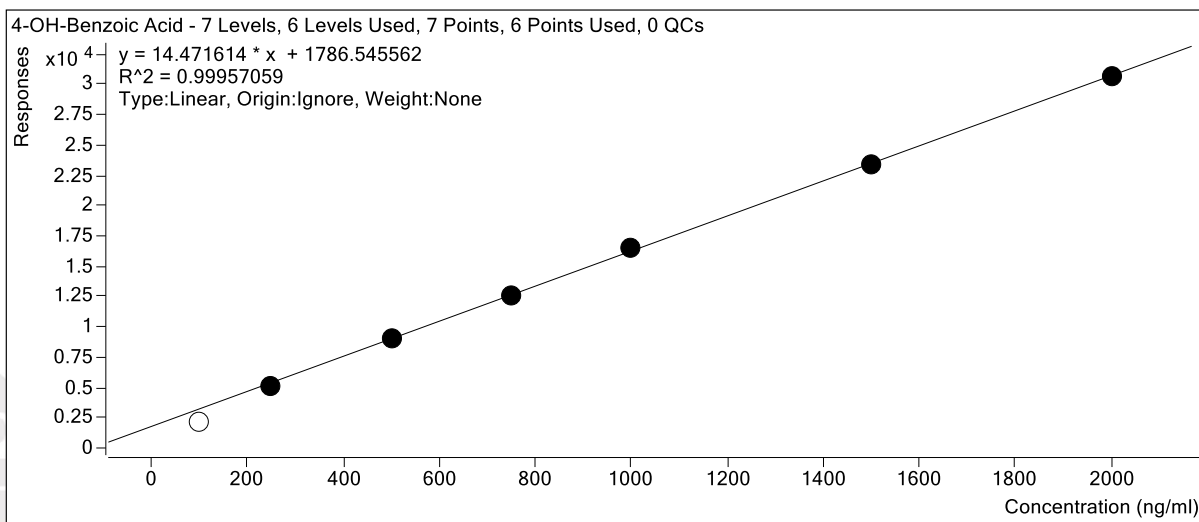
ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

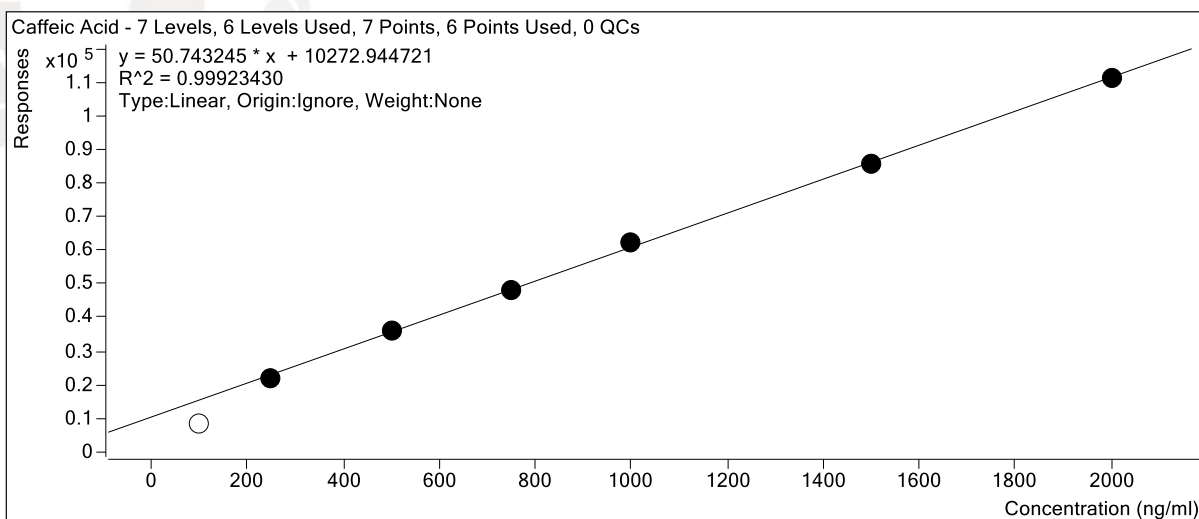
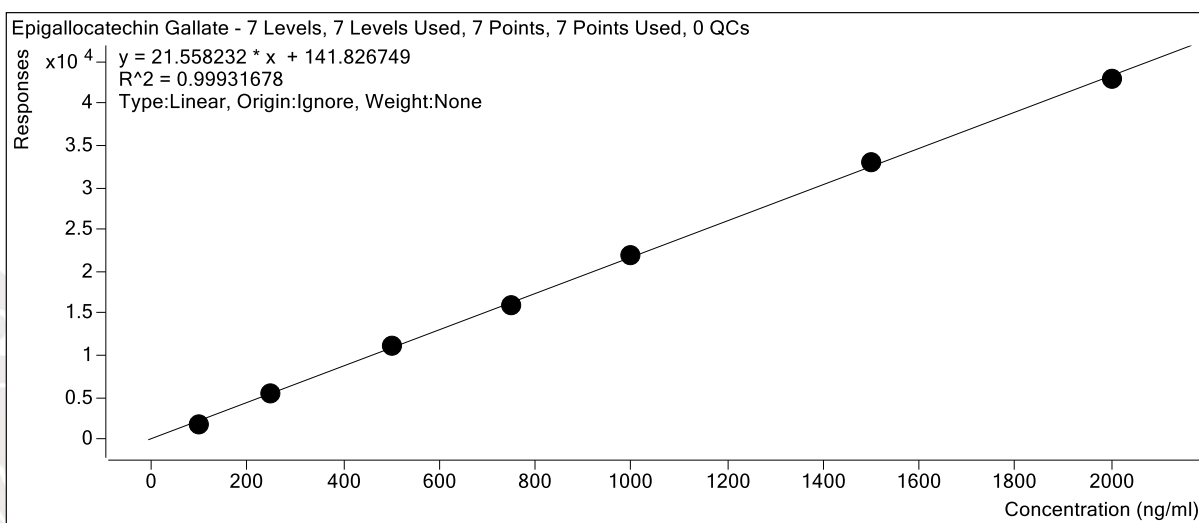


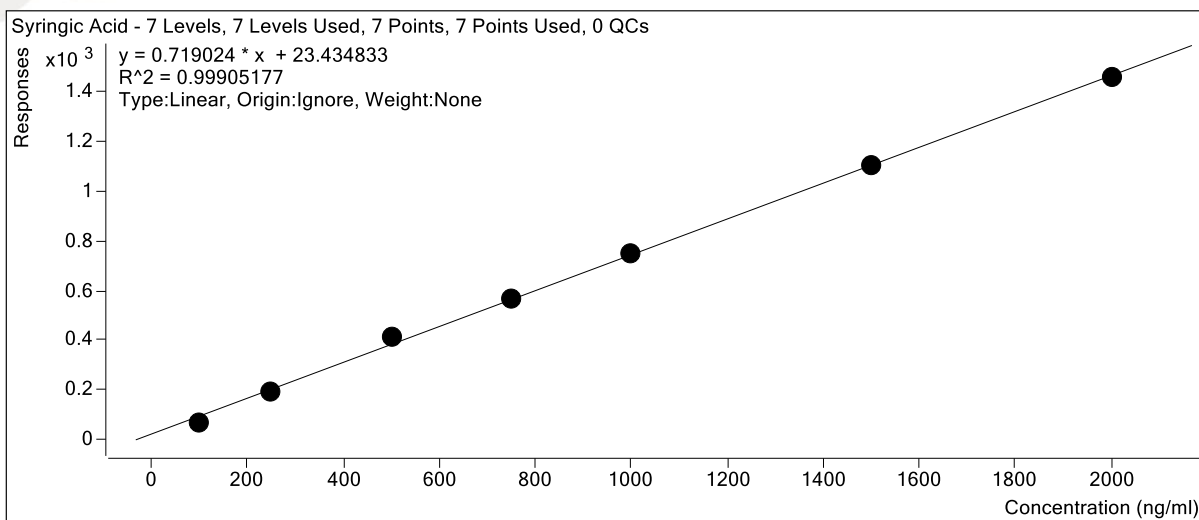
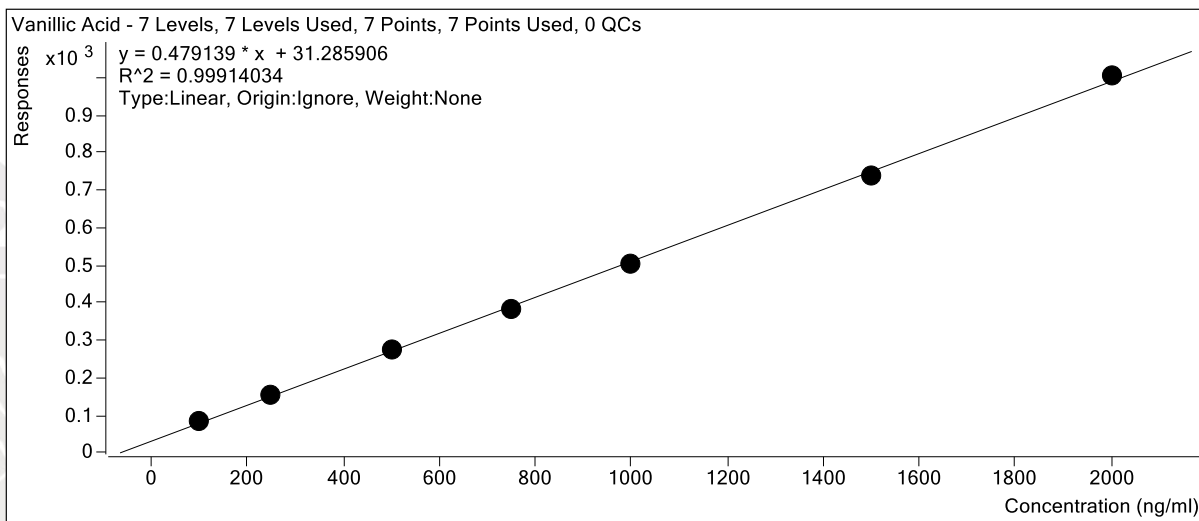


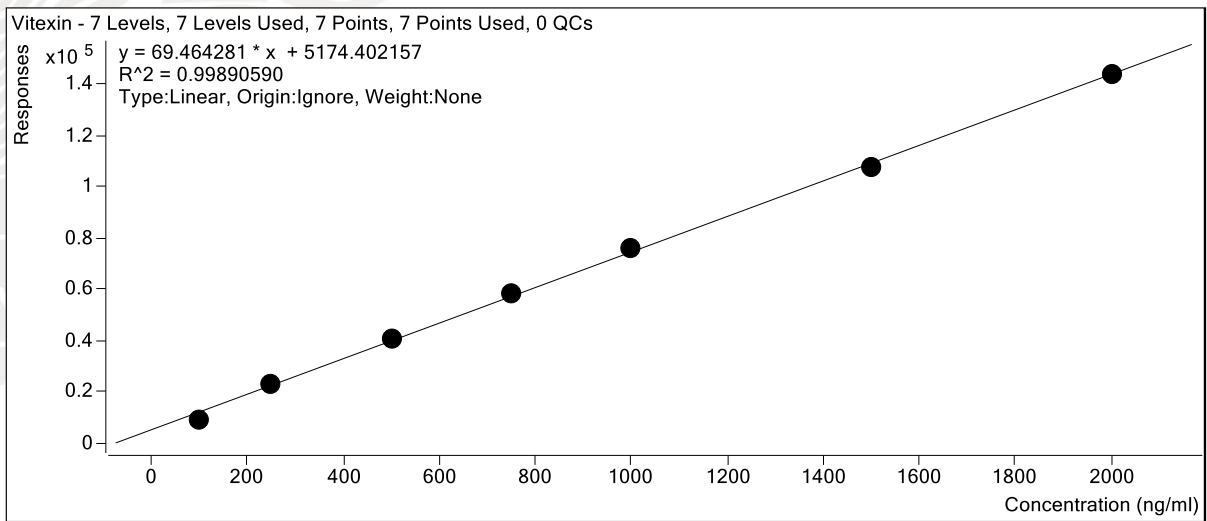
ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

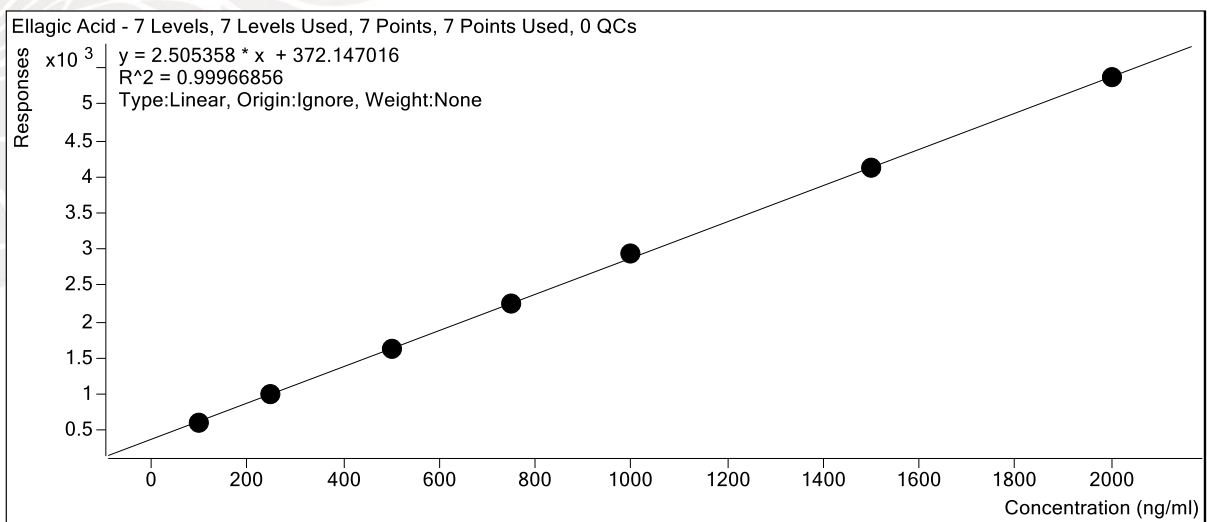
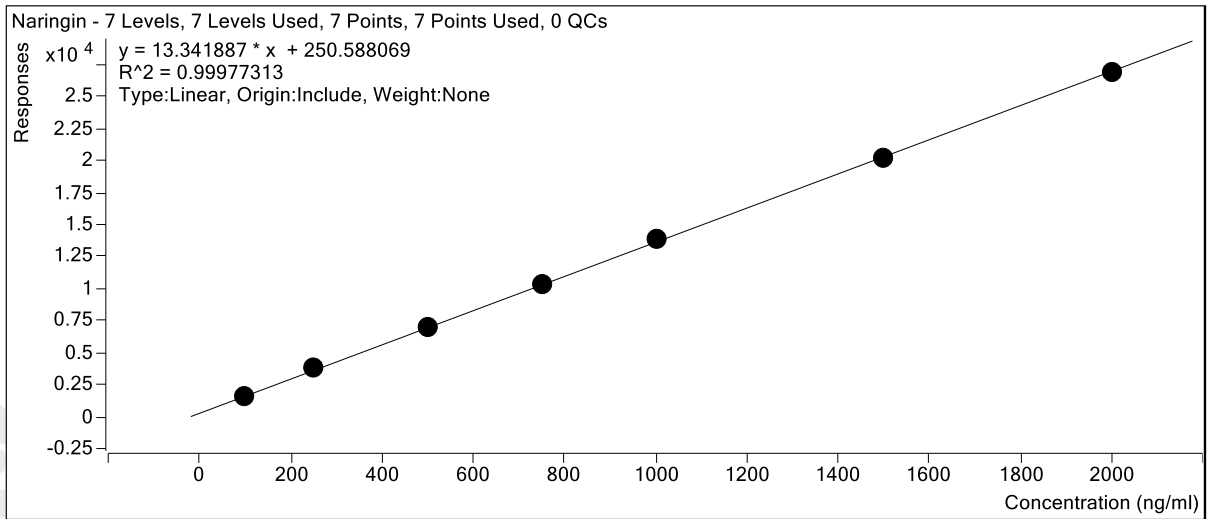


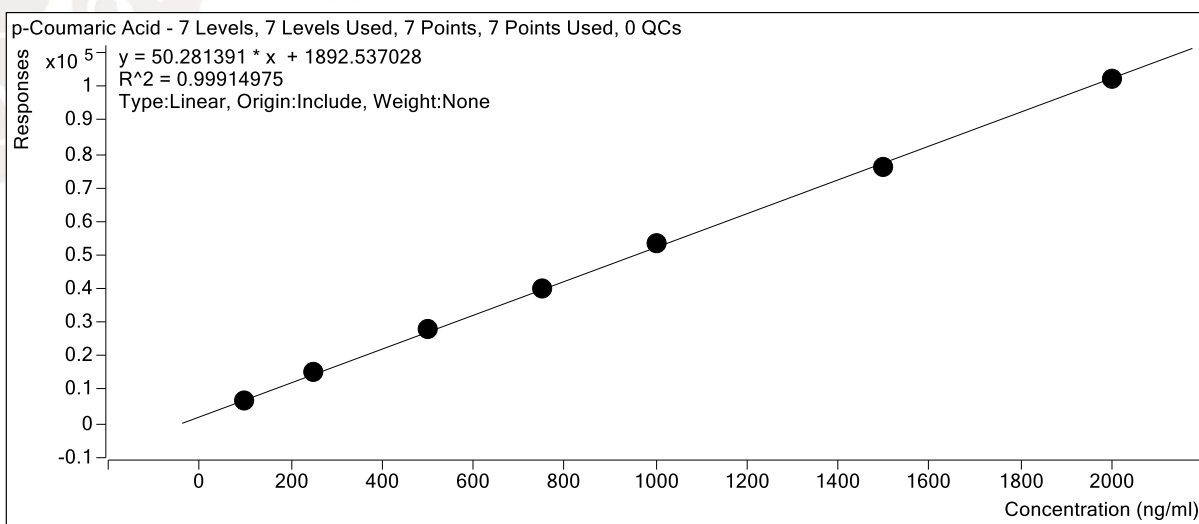
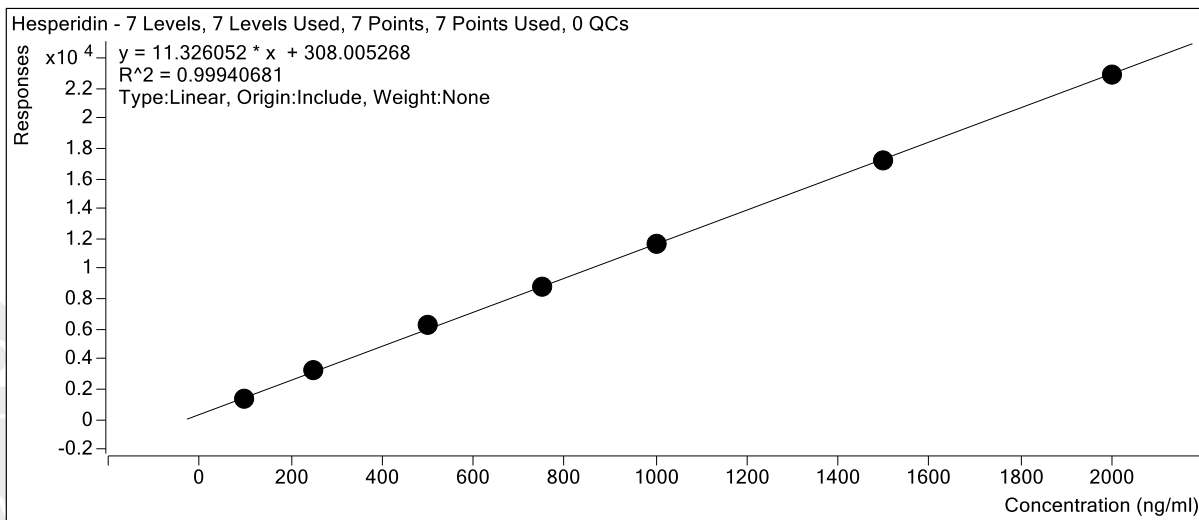


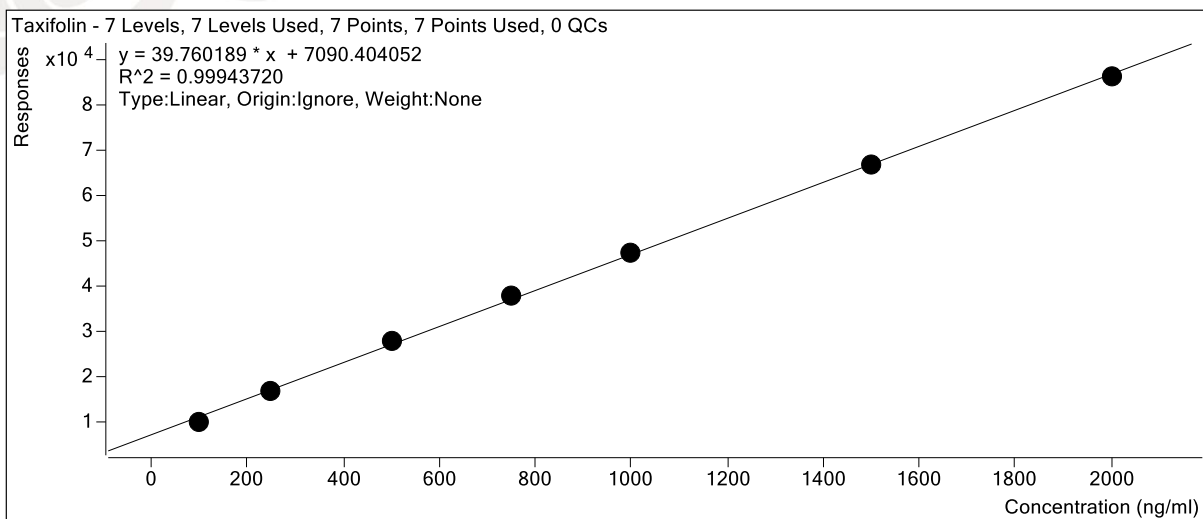
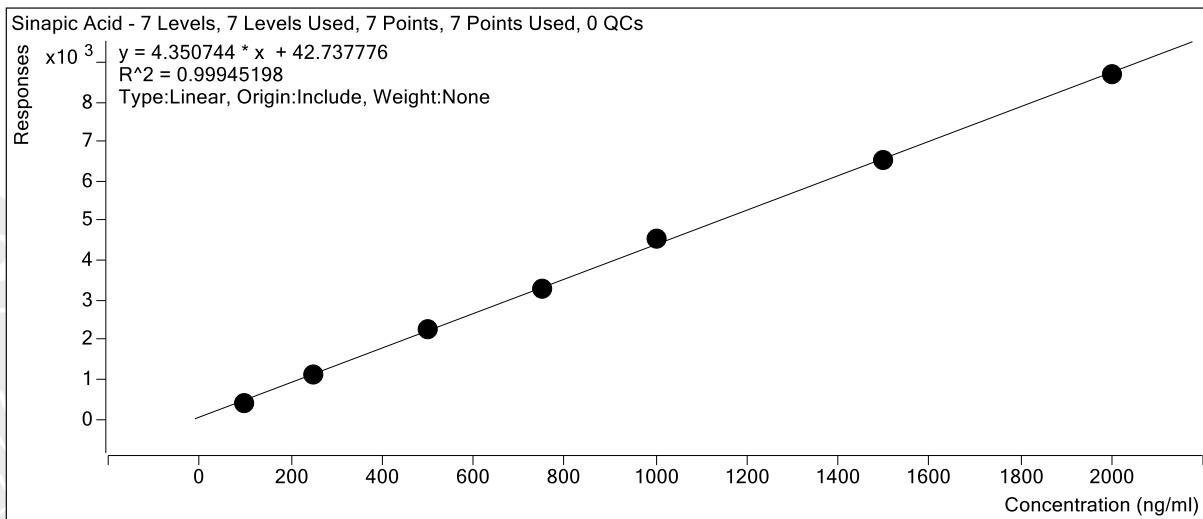


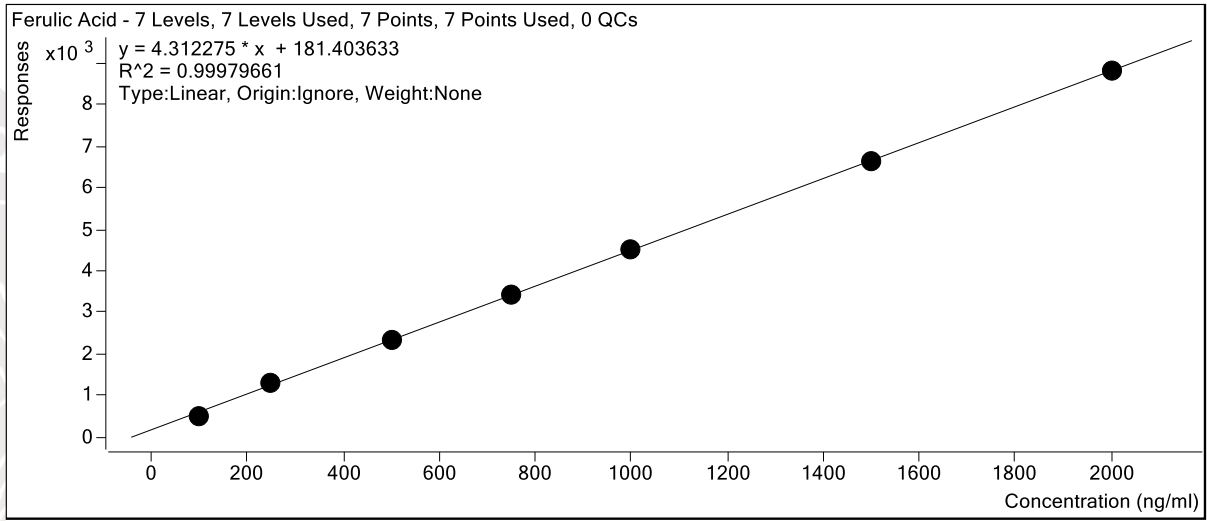




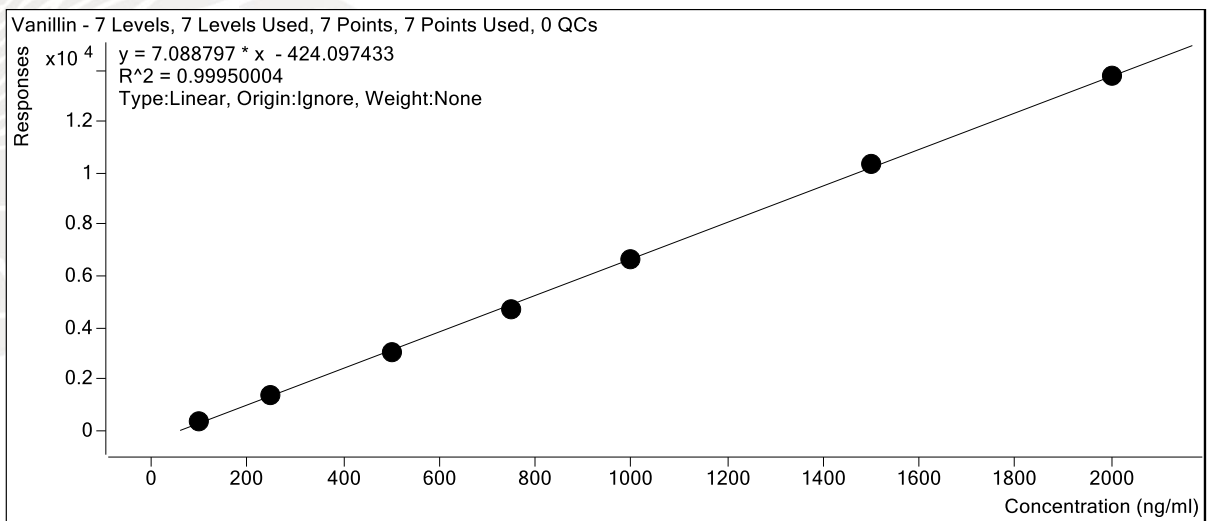
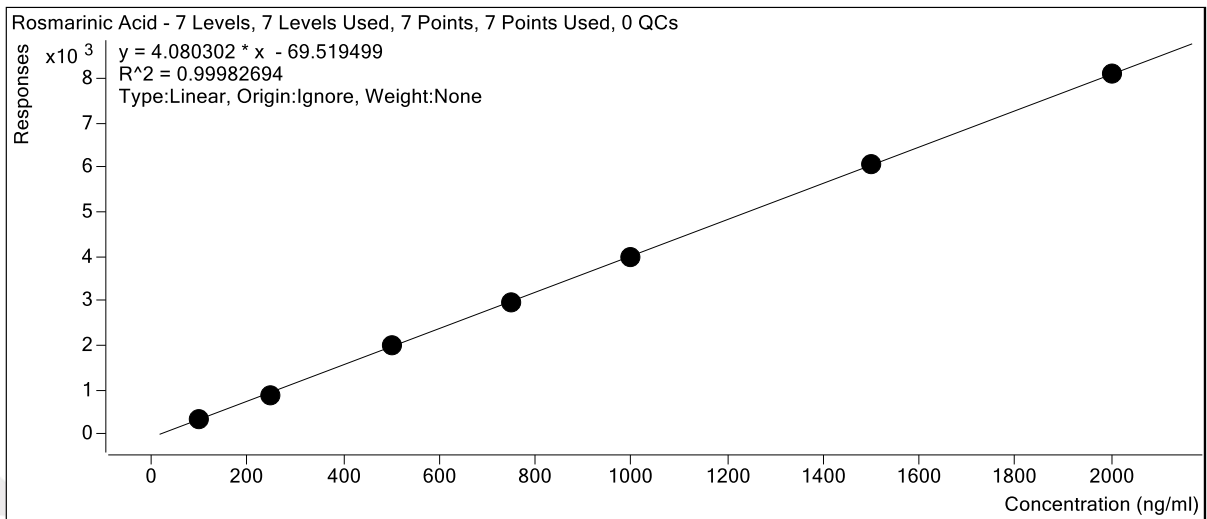


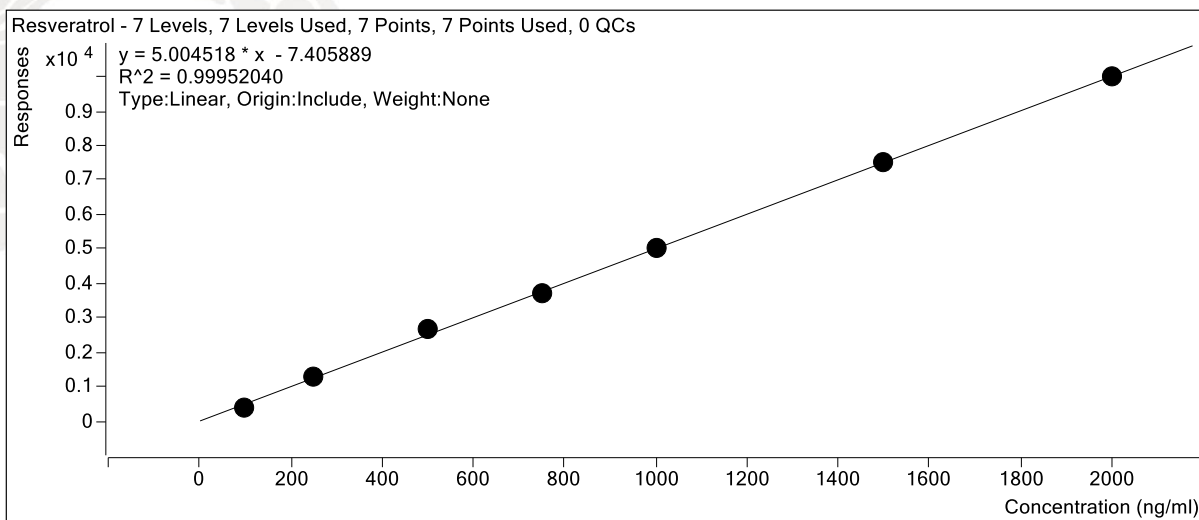
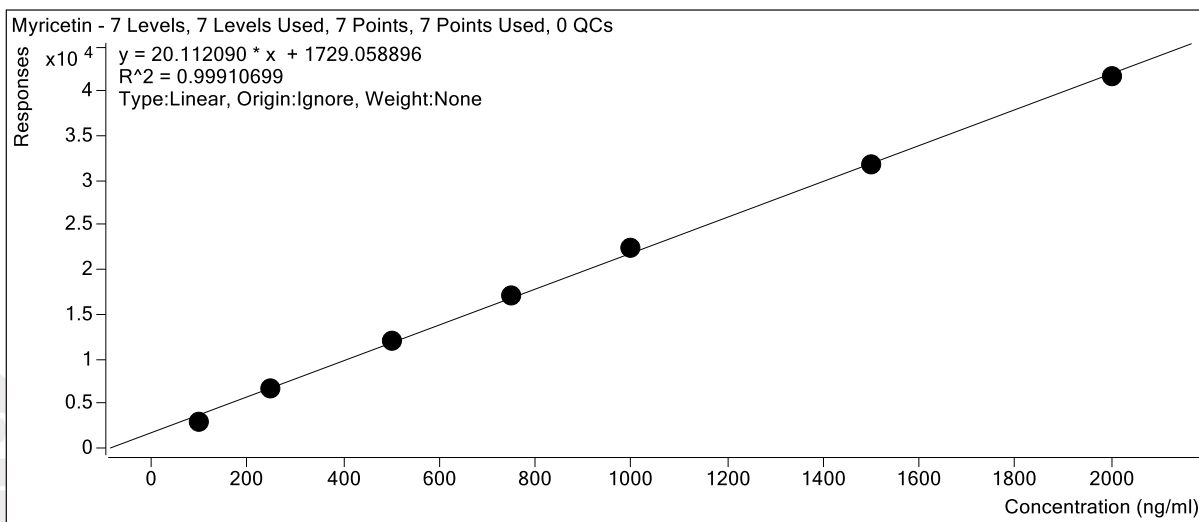


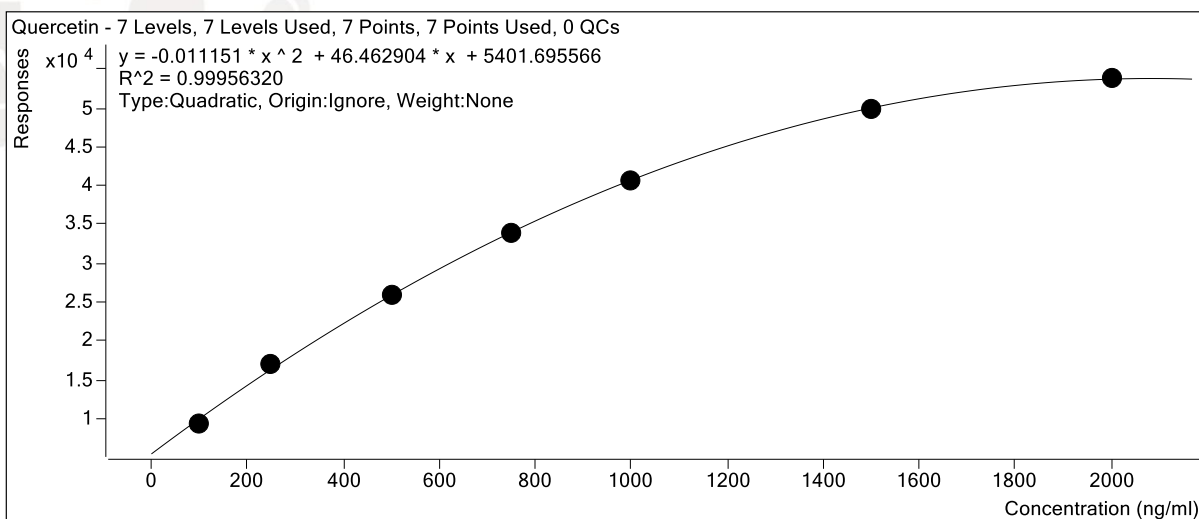
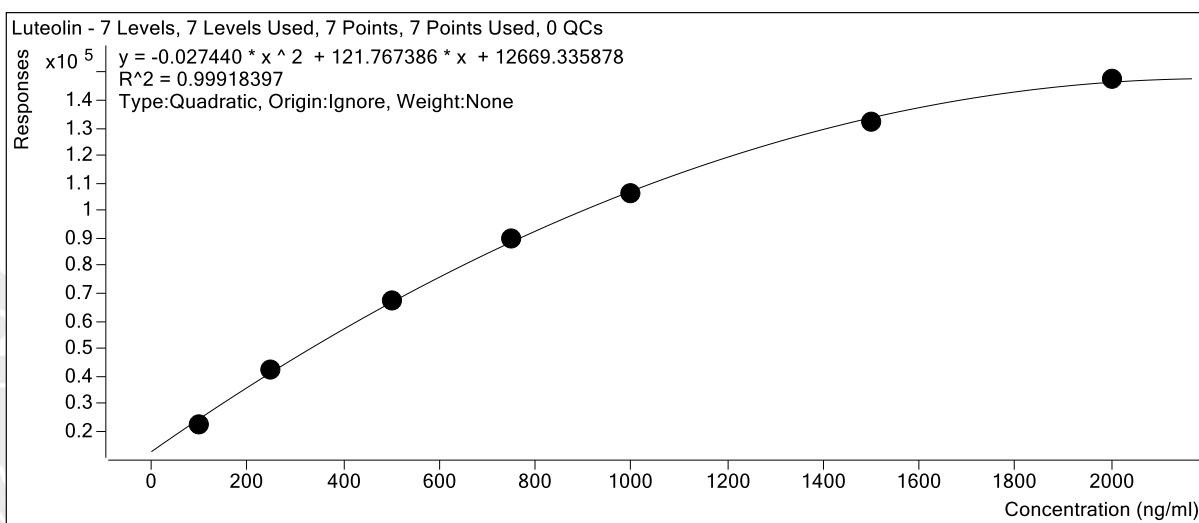


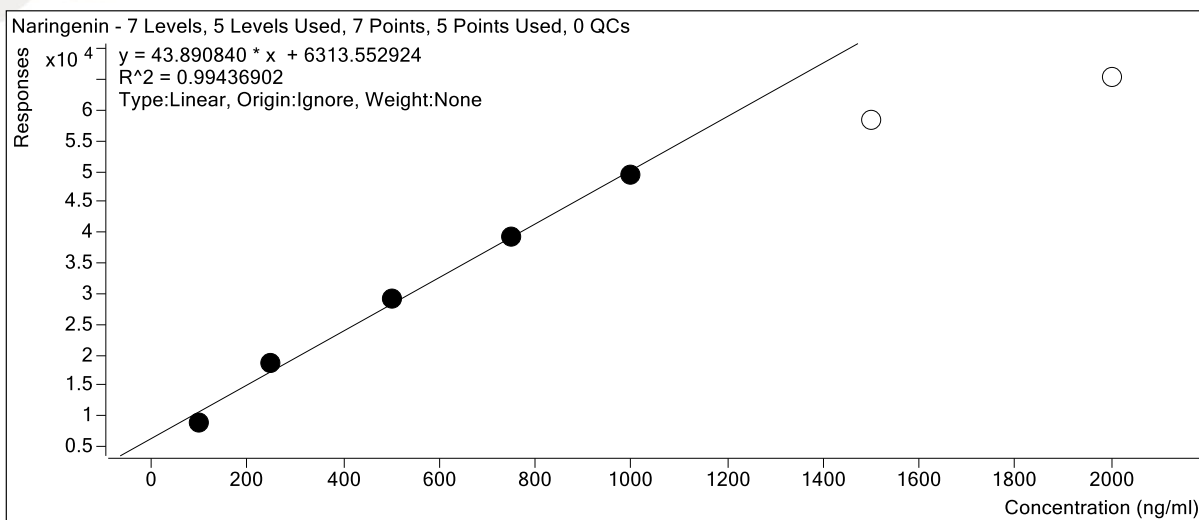
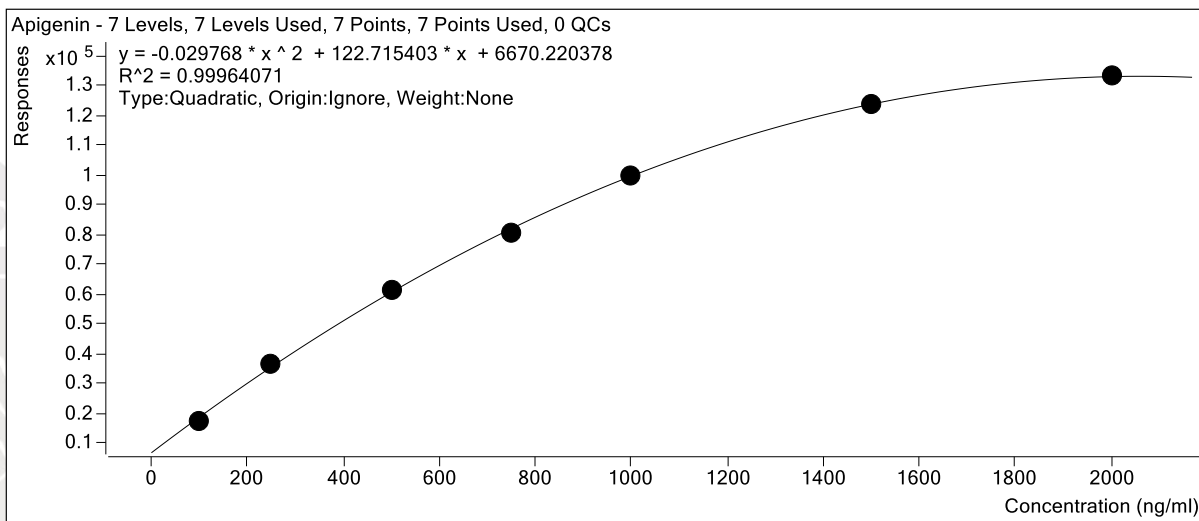


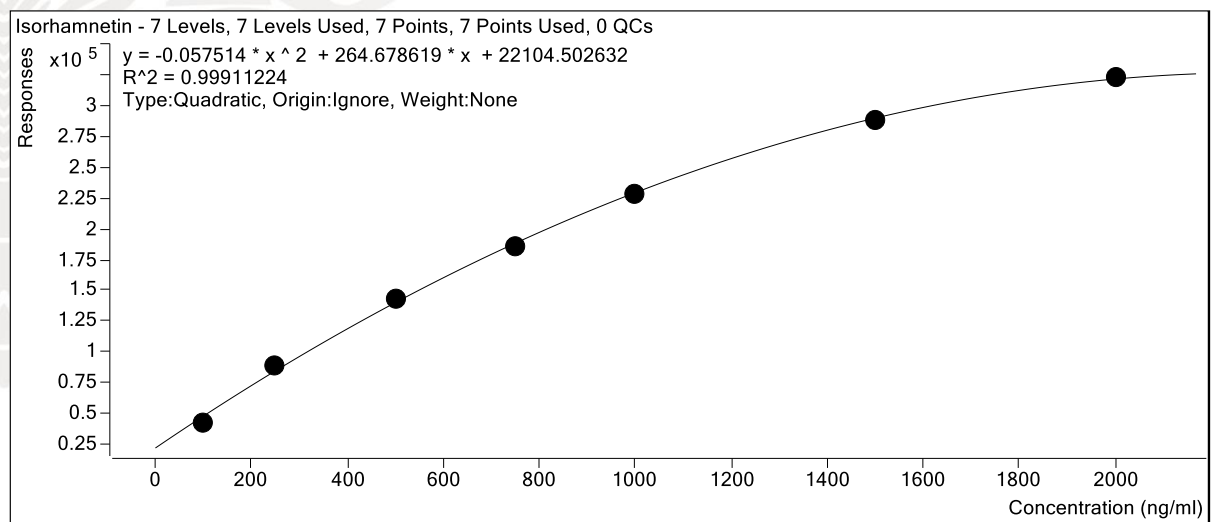
ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

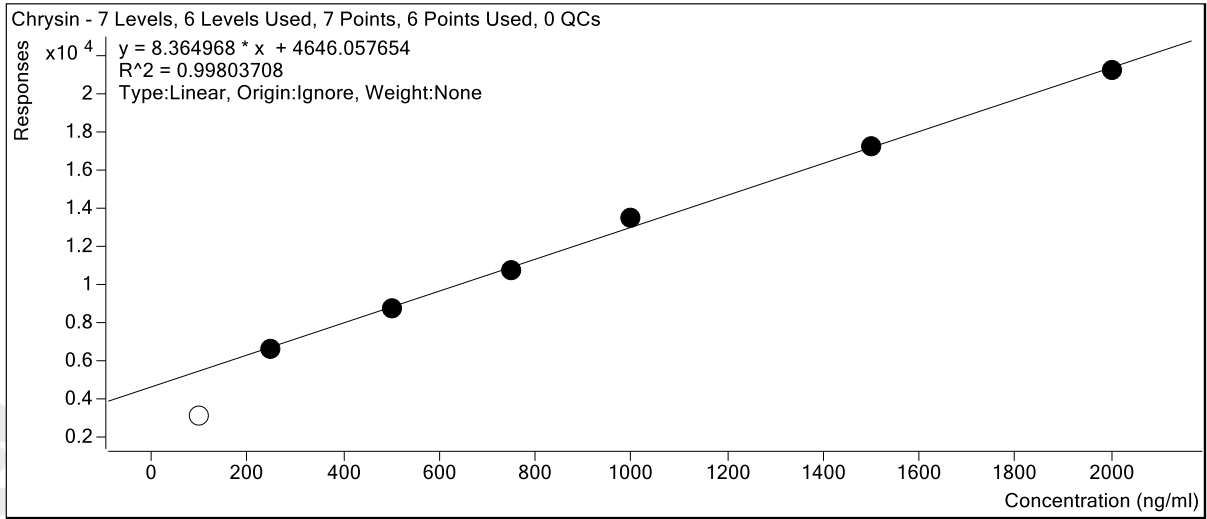












ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ