

***Plumbago europaea* L.'nin besinsel, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi**

***Nutritive value, antioxidant and antimicrobial activity of Plumbago europaea* L.**

Burak BİRCAN¹, Sevda KIRBAĞ²

¹Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü

²Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Özet

Bu çalışmada; *P. europaea*'nin besinsel içerikleri, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri araştırıldı. Şeker, flavonoid, vitamin ve mineral element düzeylerinin değişebildiği gözlemlendi. *In vitro* koşullarda, DPPH radikalini temizleme aktivitesinin 10 µg/µL'de %83.62, FeCl grubunun K grubuna göre yüksek ve metil esterlerinin ise korunmadığı belirlendi. *P. europaea*'nin antimikrobiyal aktivitesinin ise; maya ve dermofit funguslardan ziyade, bakteri gruplarında daha etkili olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan, besinsel içerik, *P. europaea*

Abstract

In this study, nutritive value, antioxidant and antimicrobial activity of *P. europaea* was determined. It was observed that sugar, flavonoid, vitamin and element levels varied. It was understood that under *in vitro* conditions the DPPH activities had a level of 83.62% at 10 µg/µL, the FeCl group was higher than the K group, and the methyl esters were not preserved as well. It was also determined that the antimicrobial activity of *P. europaea* is more efficient over bacterial groups than yeast and dermatophyte fungi.

Keywords: Antimicrobial activity, antioxidant activity, nutritive value, *P. europaea*

GİRİŞ

Dünyanın değişik ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de tıbbi açıdan önemli bulunan değişik yenen ve yabancı bitkiler yüzyıllardan beri halk arasında besinsel ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın 91 ülkenin kodeks ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlara dayanarak hazırladığı araştırmaya göre, tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının yaklaşık olarak 20.000 civarında olduğu, ancak 500 kadarının tarımsal üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçla kullanılan bitkilerin çok azı farmokopelerde kayıtlıdır. Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Hâlbuki Türkiye de tıbbi amaçla tüketilen bitki sayısı çok fazladır, hatta bazı yayınlarda bunun en az 500 civarında olduğu kaydedilmektedir (Baytop 1984).

P. europaea, Plumbaginaceae familyasına ait çok yıllık çiçekli bir bitki olup, halk arasında "kurşun otu, kuduzotu, dişotu, sıtmaotu ve döven otu" gibi isimlerle anılmaktadır. *Plumbago* cinsine ait değişik türlerin iltahap ve mikrobiyal hastalıkların tedavisinde

kullanıldığı, aynı zamanda taksit etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Arunachalam, Velmurugan, ve Raja 2010). *P. europaea* bitki yapraklarının; kan çıbanı tedavisi, diş ve romatizmal ağrıların giderilmesinde (Okoli, Akah, ve Ezugworie 2006), kök ve kök kabuklarının ise; basur, ishal, cüzzam gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Bulut ve Tuzlacı 2011; Uma, Soloman, ve Sharda 1999). Ayrıca, *P. europaea*'nin kaynatıp-süzmek suretiyle hamile kalmak için kullandıkları saptanmıştır (Akan, Korkut, ve Balos 2008).

Bu çalışmada; *P. europaea*'nin; mineral element, şeker bileşenleri, flavonoid ve fitosterol içerikleri ile antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki Ekstraktlarının Eldesi

Çalışmada kullanılan *P. europaea* L., Elazığ ilinden toplandı. Bitki örneği için 1/5 (g/mL) oranında %80'lik metanol ile ekstrakt hazırlandı.

Besinsel İçeriklerinin Saptanması

Şeker analizi

P. europaea'dan alınan 1:1 (g/mL) oranında kreuze içine alınarak distile su ile iyice homojenize edildip süzülerek pellet ile sıvı kısım ayrıldı. Toplam filtratın hacmi belirlenerek RI dedektörünün bağlı olduğu HPLC cihazı ile analiz edildi (Chromatography A 2004; Erden, Kirbağ, ve Yılmaz 2013).

Resveratrol ve flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Flavonoidlerin kromatografik analizi için 5 µm iç çapında PREVAİL C18 (15x4.6 mm) ters-faz kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %1 asetik asit içeren metanol/su/asetonitril (46/46/8, v/v/v) karışımı kullanıldı (Zu ve ark. 2006). Bu mobil faz 0.45 µm membran filtresi süzülerek ultrasonikasyon cihazında havası alındı. Kateşin ve naringin için 280 nm, rutin, mirisetin, morin ve kuarsetin için 254 nm, resveratrol için 306 nm ve kamferol için 265 nm dalga boyu kullanılarak RHPLC ayırımı takiben DAD tarafından bu flavonoidlerin ölçümü yapıldı.

ADEK vitaminleri ve fitosterol miktarının tespit edilmesi

5 mL HIP karışımı 25 mL'lik ağzı kapaklı tüpler içine alınarak üzerine 5 mL 0.5 M KOH çözeltisi ilave edildi. Vortekslenildikten sonra 85°C'de 25 dk bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutulup üzerine 5 mL saf su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 mL hekzan ile ekstrakte edildi. Hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu. 1 mL (50:50, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek Shimadzu marka HPLC cihazı ile analiz edildi. Retinol ve türevleri için dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E vitamini ve fitosterol için 202 nm, D ve K vitaminleri için 265 nm'de değerlendirildi (Lopez-Cervantes ve ark. 2006; Sanchez-Moreno ve ark. 1999).

Mineral-element analizi

Numune 105°C kuru hava sterilizatörü ile kurutuldu. Kuruyan numune havan kullanılarak öğütüldü. Örneğin

çözme işlemini gerçekleştirmek için HNO₃:H₂SO₄:H₂O₂ (1 g numune için 10:1:1, 12 mL) karışımı kullanılarak 100°C de 10-15 dk ısıtma maruz bırakıldı. Soğuyan numuneye 50 mL distile su eklendi. Filtre işlemi ile berrak bir çözelti elde edildi. Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Cd, Co, Ni ve Pb miktarları otomatik absorpsiyon spektrofotometre kullanılarak (Perkin-Elmer Marka 370 Model), K, Mg, Ca, ve Na elementleri ise otomatik emisyon spektrofotometre kullanılarak belirlendi (Eppendorf Geratebau) (Helrich 1990).

Antioksidant Etkilerinin Tespit Edilmesi

Serbest radikal (DPPH) giderme aktivitesi

Deney tüplerine sırasıyla 10, 25, 50, 100 µg/µL bitki ekstraktları ve DPPH (25 mg/L α,α-Diphenyl-picrylhydrazyl metanolde) çözeltisinden 3.9 mL ilave edildi. Karışımlar, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra absorpsansları 517 nm'de blanka karşı spektrofotometrede okundu (Brand-Williams, Cuvelier, ve Berset 1995; Hsu ve IM Coupar 2006).

Azalan absorpsans, geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% = \frac{\text{Kontrol}_{\text{ABS}} - \text{Sample}_{\text{ABS}}}{\text{Kontrol}_{\text{ABS}}} \times 100$$

In vitro ortamda antioksidan ve antiradikal aktivitenin belirlenmesi

Bitki ekstraktının antioksidan aktivitesi, Shimoi ve ark.'nın yöntemine göre yapıldı (Shimoi ve ark. 1994). Bu amaçla; pH'sı 7.4 olan 0.05 M TRIS-HCl / 0.15 M KCl ve %0.2 TWEEN 20 içeren tampon çözeltisi ile 1 mM FeCl₂ ve 3 µM hidrojen peroksit günlük olarak hazırlandı. Bu tampon çözelti içerisinde 2.30 mM Linolenik asit (LNA, 18:3 n-3), 10.44 mM Linoleik asit (LA, 18:2, n-6), 3.97 mM Oleik asit (18:1, n-9) çözeltileri DMSO'da çözünerek hazırlandı ve aşağıdaki deney grupları hazırlandı.

Kontrol grubu: 5 mL trisma-base tamponu, 0.4 mL yağ asidi karışımı

FeCl₂+H₂O₂ grubu: 5 mL trisma-base tamponu, 1 mL FeCl₂, 1 mL H₂O₂, 0.4 mL yağ asidi karışımı

Bitki: 5 mL trisma-base tamponu, 1 mL FeCl₂, 1 mL H₂O₂, 0.4 mL yağ asidi karışımı, 1 mL olmak üzere farklı miktarlarda bitki ekstraktı ilave edildi.

Bu gruplar 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve gruplardaki örnekler %4'lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi. Daha sonra örnek karışımlardan 1 mL alınarak lipid peroksidasyon düzeyi ölçüldü (Ronald ve ark. 2001; Erden ve Kırbağ 2013).

***In vitro* ortamda lipid peroksidasyon (Ipo) ölçümü**

Örneklerden 1 mL alındıktan sonra üzerine %0.6'lık TBA çözeltisi ile 2 mL distile su ilave edilip vortekslendi. Daha sonra 90°C'de 30 dk bırakıp reaksiyon sonucu oluşan pembe renk 3 mL n-bütanol ile ekstrakte edildi. Örnekler santrifüj edildi ve santrifüj sonunda elde edilen supernatant kısmın yoğunluğu HPLC cihazında floresans dedektörle ölçüldü (Ronald ve ark. 2001).

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstrelerin hazırlanması ve test mikroorganizmaların eldesi

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar; (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Epidermophyton spp.*) Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan karşılandı. Araştırmada bitkilerin kullanılan kısımlarından 10 g alınıp 200 mL metanol ilave edilip ekstraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktların çözücüleri rotavaporda uzaklaştırılarak ve etüvde kurutularak kuru ekstraktlar elde edildi. Kurutulan ekstraktlar metanolde çözdürüldü.

Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması ve Aşılama

Bakteri suşları; Nutrient Buyyon'a aşılansak 35±1°C'de 24 saat, maya suşları; Yeast Malt Ekstrakt Buyyon'da ve dermatofit funguslar Glukozlu

Sabouroud Buyyon' da 25±1°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi. Sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland (0.5) standart tüpüne göre yoğunluk ayarı yapıldıktan sonra buyyon tüplerine aktarıldı. Erlenmayerde steril edilen ve 45-50°C'ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar, Yeast Malt Ekstrakt Agar ve Sabouraud Dextrose Agar hazırlanıp bakteri, maya ve fungusların buyyondaki kültürü ile %1 oranında aşılansak (10⁶ bakteri/mL, 10⁴ maya/mL, 10⁴ fungus/mL) iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er mL konuldu (Collins ve Lyne 1987).

Oyuk agar metodu

Katılaşılan agar üzerine 6 mm çapında açılan oyuklara bir damla besiyerinden sonra 10 µL örnek aktarıldı. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C'de 1.5-2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılansak plaklar 37±1°C'de 24 saat, maya ve dermatofit aşılansak plaklar ise 25±1°C'de 3 gün süre ile inkübe edildi. Çalışma 3 paralel olarak yürütülerek ve sonuçlar ortalama değer olarak inhibisyon zonu (mm) şeklinde değerlendirildi (Anonymous 1999).

İstatistik Analizi

İstatistik analizi için, standar istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, 3 tekrarın ortalaması ± standart sapması olarak verilmektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

***P. europea*'nın Besinsel İçeriklerinin Tespiti**

***P. europea*'nın resveratrol ve flavonoid içeriği**

Tablo 1 'de görüldüğü gibi, *P. europea*'da rutin 23.65, mirisetin 3.65, morin 0.35, kuarsetin 0.17, kateşin 1232.5, naringin 97.66 µg/g olarak değiştiği, fakat kamferol ve resveratrol ise tespit edilmedi. Total flavonoid içeriği 1362.67 µg/g olarak değiştiği saptandı (Tablo 1). Yüksek miktarda; rutin, kateşin ve naringin

belirlendi (Tablo 1). Son yıllarda yapılan değişik çalışmalarda flavonoidler bakımından zengin bir beslenme ile kronik kalp hastalıkları ve kanser riskinin azaltılması arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Hung ve ark. 2004; Tripoli ve ark. 2007). Flavonoid içeriğinin, bitkiden bitkiye göre hatta aynı bitkinin farklı organlarında bile değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir (Justesen 2000). Flavonoidler bakımından zengin bir beslenmenin A ve C vitamininden bile daha güçlü antioksidan etkisi olduğu belirtilmiştir (Sokol-Łętowska, Oszmiański ve Wojdyło 2007). Değişik çalışmalarda ise, *P. zeylanica*'da total flavonoid içeriği 45.5 mg GAE/g (Nile ve Khobragade 2010) ve total fenolik içeriği 109 mg/g olarak belirlenmiştir (Zahin, Aqil, ve Ahmad 2009). *P. europea* yapraklarında ise yeni bir flavonol olan 7-O-methylmyricetin (europetin) maddesi tespit edilmiştir (Harborne 1967).

Şeker analizi

P. europea'da; arabinoz 29.55, glukoz 342.8, fruktoz 704.71, sakkaroz 233.37 ve maltoz 233.42 µg/g olarak değiştiği ve fruktoz miktarının diğer şeker bileşenlerine oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *P. europea*'nın şeker, mineral element, flavonoid, vitamin ve fitosterol içeriği

Flavonoid/ Gruplar	(µg/g)	Lipofilik vitaminler ve Fitosteroller	(µg/g)	Şeker İçeriği	(µg/g)	Mineral İçeriği	(mg/g)
Rutin	23.61±4.28	Vitamin K ₁	0.62±0.05	Arabinoz	29.55±2.62	Ca	3.23±0.4
Mirisetin	3.65±0.15	Retinol	0.24±0.03	Fruktoz	704.71±4.36	Zn	0.04±0.01
Morin	0.35±0.20	Vitamin D	0.673±0.07	Glukoz	342.8±1.58	Na	8.16±1.02
Kuarsetin	0.17±0.1	α Tokoferol	2.93±0.06	Sakkaroz	233.37±1.02	K	240.49±2.56
Resveratrol	-	Ergosterol	11.526±0.17	Maltoz	233.42±0.96	Fe	0.06±0.01
Kateşin	1232.5±6.72	Stigmasterol	-			Mn	0.06±0.02
Naringin	97.66±1.01	β-sitosterol	8.543±0.57			Mg	0.18±0.04
Kamferol	-						
Toplam	1362.67±7.02						

Her bir değer, 5 tekrarın ortalama ± standart sapmasıdır.

P. europea'nın Antioksidant Aktivitesinin Belirlenmesi

P. europea'nın DPPH radikalini giderme aktivitesi

P. europea'nın 10, 25, 50, 100 µg/µL olarak artan konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme aktivitesi belirlenmiş ve 10 µg/µL'de %83.62'lik en yüksek etkiyi göstermiştir (Şekil 1). Değişik

Değişik çalışmalarda ise (*P. zeylanica* ve *P. rosea* bitkilerinin kök kabuğundan) fruktoz ve glukoz miktarının değiştiği belirlenmiştir (Pawar ve ark. 2011).

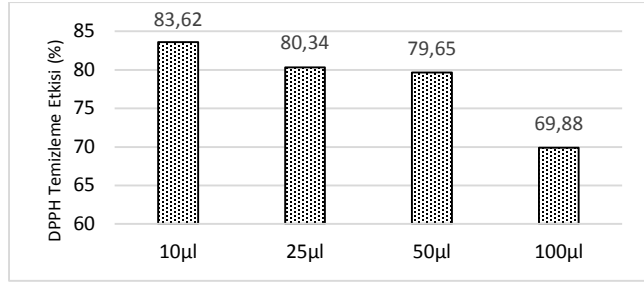
Vitaminler ve fitosterol içeriği

Tablo 1'de görüldüğü gibi, *P. europea*'da yüksek miktarda ergosterol (11.53 µg/g), β-sitosterol (8.54 µg/g) ve α-Tokoferol (2.93 µg/g) saptanmıştır. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) analizi ile *P. zeylanica*'da; alkaloidler, tanen, steroidler, flavonoidler, saponinler, antrakinonlar, ve karbonhidratların bulunduğu rapor edilmiştir (Ajayi ve ark. 2011). Elde edilen verilerin değişebilir olduğu, bunun temel nedeninde farklı türlerden kaynaklanmaktadır.

Element içeriği

Tablo 1'de görüldüğü gibi, *P. europea*'da 3.23 mg/g Ca, 0.04 mg/g Zn, 8.16 mg/g Na, 240.5 K mg/g, 0.06 mg/g Fe ve Mn ile 0.18 mg/g Mg belirlenmiştir. Yüksek miktarda Na ve Ca ihtiva ettiği görülmüştür. *P. zeylanica*'nın element içeriği araştırılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Wang ve ark. 2014).

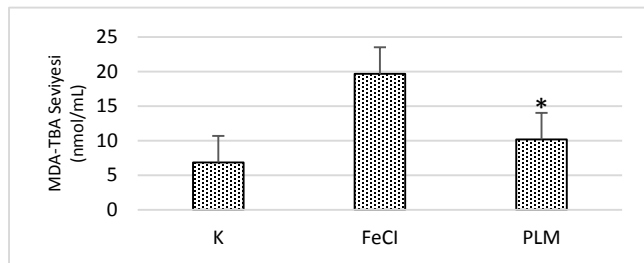
çalışmalarda ise, *P. europea*'da ABTS 13.92±0.05 mg/mL, DPPH ise 19.82±0.05 mg/mL olarak belirlenmiştir (Serrilli ve ark. 2010). *P. zeylanica*'nın ise kök ekstraktlarının DPPH radikalini temizleme aktivitesi 96 µL/mL olarak bildirilmiştir (Nile ve Khobragade 2010). Elde edilen sonuçların değişebilir olduğu, bunun temel nedeninin ise değişik türlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir.



Şekil 1. *P. europaea*'nin DPPH radikalini giderme aktivitesi (%).

P. europaea'nın In vitro Ortamdaki Antioksidan Etkileri

Şekil 2'de görüldüğü gibi, bitki ekstraktının *in vitro* ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri incelendiğinde FeCl grubunun K grubuna göre oldukça yüksek olduğu ve bu düzeyin FeCl grubuna göre önemli düzeyde azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). Çalışmada kullanılan *P. europaea*'nin *in vitro* ortamda insan yaşamını en fazla etkileyen dejeneratif metabolik hastalıklara neden olan lipid oksidasyonunu önlemede etkili olduğu sonucunu düşündürmektedir. Benzer çalışmalarda da *P. europaea*'nin toksin grubuna göre oldukça etkili düzeyde MDA-TBA seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (Manyakara 2009). Ayrıca; K, FeCl, PLM gruplarında sırasıyla 18:1 yağ asitleri 3.25, 3.09, 3 µmol/mL, 18:2 yağ asitleri ise 8.62, 8.07, 7.98 µmol/mL olarak belirlenmiştir. PLM'nin *in vitro* ortamda metil esterleri üzerine etkisi araştırıldığında ise *P. europaea*'nin metil esterlerinin korunmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bu durumun *Plumbago* türlerinde tespit edilen toksik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada *P. zeylanica*'nin sitotoksitesi araştırılmış sitotoksik etkileri olduğu tespit edilmiştir (Arunachalam ve ark. 2010).



Şekil 2. *P. europaea*'nin MDA-TBA üzerine etkisi (nmol/mL) (*: $p < 0.05$).

***P. europaea*'nin Antimikrobiyal Aktivitesi**

P. europaea'nin, değişik test grupları üzerindeki etkilerinin, control grubuna kıyasla etkili olduğu, bu etkinin maya ve dermofit funguslardan ziyade, bakteri grupları üzerinde daha belirgin olduğu saptandı (Tablo 2). En yüksek oranda etkiyi, *S. aureus* üzerinde göstermiştir. Benzer çalışmalarda ise, *P. zeylanica*'nın 10 mg/mL etanol ekstraktının *S. aureus*'da 15 mm, *E. coli*'de ise 12 mm olarak tespit edilmiştir (Mittal ve Sharma 2010). *P. zeylanica*'nin kök ekstraktı ve plumbagin maddesinin *E. coli*, *Salmonella typhi* ve *S. aureus*' e karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Jeyachandran ve ark. 2009). Benzer bir çalışma da ise *P. zeylanica*'nin çok iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği (Jetty ve ark. 2010), ayrıca, *P. scandens*'in *M. tuberculosis* ve *M. tuberculosis* MDR suşlarına karşı güçlü bir aktivite gösterdiği, MIC değerlerinin, 0.65 ile 1.3 mg/mL arasında değiştiği bildirilmiştir (Moncada Ascencio ve ark. 2011). Elde edilen değişik sonuçların temel nedeninin ise, bitki yapısındaki flavonoid, vitamin ve sterol gibi fitokimyasallardan (Tablo 1) kaynaklanabilir.

Tablo 1. *P. europaea*'nin antimikrobiyal aktivitesi (mm).

Gruplar	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. spp.</i>
Metanol	8	-	-	-
<i>P. europaea</i>	23	15	11	-

Sonuç olarak; bitkiler üzerinde yapılan bu çalışmanın doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin kullanımına yönelik araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Daha etkin ve daha düşük yan etkiye sahip doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin tespit edilmesi, etkilerinin ortaya konulması ve yaşam kalitesi açısından önemli beklentiler arasında yer almaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma FÜBAP 2118 nolu proje ile desteklenmiştir. HPLC ve gaz kromatografisi çalışmalarında desteklerini sağlayan Prof. Dr. Ökkeş Yılmaz'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Ajayi G O, Olagunju J A, Ademuyiwa O ve Martins O C (2011) Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis and Phytochemical Screening of Ethanolic Root Extract of *Plumbago zeylanica*, Linn. J Med Plants Res 5:1756–61
- Akan H, Korkut M M ve Balos M M (2008) Arat Dağı ve Çevresinde (Birecik, Şanlıurfa) Etnobotanik Bir Araştırma. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 20:67–81
- Anonymous (1999) NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, The 9th International Supplement, M100-S9, Villanova, P A.
- Arunachalam K D, Velmurugan P ve Raja R B (2010) Anti-Inflammatory and Cytotoxic Effects of Extract from *Plumbago zeylanica*. Afri. J. Microbiol. Res 4:1239–45
- Baytop T (1984) Türkiyede Bitkiler Ile Tedavi (geçmişte ve Bugün). İstanbul Üniv.Yay.,No:3255, Eczacılık Fak., No:40, İstanbul
- Brand-Williams W, Cuvelier M E E ve Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. LWT - Food Science and Technology 28(1):25–30
- Bulut G ve Tuzlacı E (2011) Folk Medicinal Plants of Bayramiç (Çanakkale-Turkey). Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University 40:87–100
- Chromatography A (2004) A grace company catalog 600. Alltech Associates Inc, U.S
- Collins C M ve Lyne P M (1987) Microbiological Methods Butter Morths & Co (Publishers) Ltd. London. 450pp
- Erden Y ve Kirbağ S (2013) Chemical and Biological Activities of Some Scorzonera Species: An In Vitro Study. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 85(1):319-326
- Erden Y, Kirbağ S ve Yılmaz Ö (2013) Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Some Scorzonera Species. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 83(2):271-276
- Harborne J B (1967) Comparative Biochemistry of the Flavonoids-IV: Correlations between Chemistry, Pollen Morphology and Systematics in the Family Plumbaginaceae. Phytochemistry 6(10):1415–28
- Helrich K (1990) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists Arlington
- Hsu B, Coupar IM ve Ng K (2006) Antioxidant Activity of Hot Water Extract from the Fruit of the Doum Palm, Hyphaene Thebaica. Food Chemistry, 98(2):317-328
- Hung H C, Joshipura K J, Jiang R, Hu F B, Hunter D, Smith-Warner S A, ve Willett W C (2004) Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. Journal of the National Cancer Institute, 96(21):1577-1584
- Lopez-Cervantes J, Sanchez-Machado D I, Rios-Vazquez N J (2006) High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. J Chromatogr A 1105(1–2):135–139
- Jetty A, Subhakar C, Rajagopal D, Jetty M, Subramanyam M, ve Marthanda Murthy M (2010) Antimicrobial activities of neo- and 1-epineo-isoshinanolones from *Plumbago zeylanica* roots. Pharmaceutical biology, 48(9):1007-1011
- Jeyachandran R, Mahesh A, Cindrella L, Sudhakar S, ve Pazhanichamy K (2009) Antibacterial Activity of Plumbagin and Root Extracts of *Plumbago Zeylanica* L. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 51(1):17–22
- Justesen U (2000) Negative Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Low-Energy Collision Activation Mass Spectrometry for the Characterisation of Flavonoids in Extracts of Fresh Herbs. Journal of chromatography. A 902(2):369–79
- Manyakara B (2009) Antioxidant Properties of *Plumbago Auriculata* Lam. Doktora Tezi, North-West University.
- Vineet M ve Sharma SK An *In Vitro* Anti Microbial Activity of Callus and Root Extracts of *Plumbago zeylanica* Linn. in Various Test Microorganism. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 5(2):01-04
- Moncada Ascencio N, Farcio Villarreal M, Rojas Idrogo C, Trevisan Ferreira D, Horna Davila O, Pereira J ve Delgado Paredes G E (2011) Biological activity of *Plumbago scandens* L. against multidrug-resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 10(3):233-245
- Nile Shivraj H ve Khobragade C N (2010) Antioxidant Activity and Flavonoid Derivatives of *Plumbago zeylanica*. J Nat Prod 3(2010):130–33
- Ntambi J M (1999) Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase by Polyunsaturated Fatty Acids and Cholesterol. Journal of lipid research 40(9):1549–58
- Okoli C O, Akah P A, ve Ezugworie U (2006) Anti-Inflammatory Activity of Extracts of Root Bark of *Securidaca Longipedunculata* Fres (Polygalaceae). Afr. J. Trad. CAM 2(3):54-63
- Pawar R K, Sharma S, Singh K C, ve Sharma R K R (2011) Physico-Chemical Standardisation and Development of HPTLC Method for the Determination of Plumbagin in Kalmegh Navayas Loha-an Ayurvedic Formulation. Int J Curr Pharm Res 3(1):43–48
- Ronald, B P (2001) Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products. Current Protocols in Food Analytical Chemistry Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products. Current Protocols in Food Analytical Chemistry 2(4):1–8

- Sanchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Calixto F (1999) Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Int* 32(6):407–412
- Serrilli A M, Sanfilippo V, Ballero M, Sanna C, Poli F, Scartezzini P, ve Bianco A (2010) Polar and Antioxidant Fraction of *Plumbago Europaea L.*, a Spontaneous Plant of Sardinia. *Natural product research* 24(7):633–639
- Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, ve Kinae N (1994) Radioprotective Effect of Antioxidative Flavonoids in Gamma-Ray Irradiated Mice. *Carcinogenesis* 15(11):2669–2672
- Sokół-Łętowska A, Oszmiański J, and Wojdyło A (2007) Antioxidant Activity of the Phenolic Compounds of Hawthorn, Pine and Skullcap. *Food Chemistry* 103(3):853–59
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, ve Giammanco M (2007) Citrus Flavonoids: Molecular Structure, Biological Activity and Nutritional Properties: A Review. *Food Chemistry* 104(2):466–479
- Uma D P, Soloman F E, ve Sharda A C (1999) Indian Medicinal Plants and Their Roots. *Pharmaceut Biol* 37:231–36.
- Wang J, Ding L, Xu Y, Zhao X, Sun M, Liu Y, ... ve Lu L (2014) Determination of Inorganic Element Concentrations in the Roots of *Plumbago zeylanica L.* *Analytical Letters* 47(5):855–70
- Zahin M, Farrukh A, ve Ahmad I (2009) The in Vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Four Indian Medicinal Plants. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences* 1(1):88–95
- Zu Y, Chunying L, Yujie F, ve Chunjian Z (2006) Simultaneous Determination of Catechin, Rutin, Quercetin Kaempferol and Isorhamnetin in the Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) Leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41(3):714–19