Çukurova Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi Dergisi
Çukurova University
Journal of the Faculty of Engineering
ISSN: 2757-9255 CİLT/VOLUME: 41 SAYI/ISSUE: 3 EYLÜL/SEPTEMBER 2026

Biberiye ve Siyah Üzüm Çekirdeği Etanolik Ekstraktlarının Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarlarının ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ecem ÜNSAL [1,a], **Ayşegül İNAM** [1,b], **Furkan Ozan ÇÖVEN** [1,c], **Tülay ÖNCÜ ÖNER** [1,d]

[1]*Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Manisa, Türkiye*

[a]***ORCID**: 0009-0007-4646-1004; [b]**ORCID**: 0000-0002-9411-1232; [c]**ORCID**: 0000-0001-7696-3418; [d]**ORCID**: 0000-0001-6180-5409*

Makale Bilgileri

Geliş : 15.12.2025
Kabul : 06.10.2026
DOI: 10.21605/cukurovaumfd.1841784

Sorumlu Yazar

Tülay ÖNCÜ ÖNER
tulay.oncu@cbu.edu.tr

Anahtar Kelimeler

Biberiye
Siyah üzüm çekirdeği
Sinerjik etki
Antibakteriyel
Sitotoksisite

***Atıf şekli:** ÜNSAL, E., İNAM, A., ÇÖVEN, F.O., ÖNCÜ ÖNER, T., (2026). Biberiye ve Siyah Üzüm Çekirdeği Etanolik Ekstraktlarının Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Miktarlarının ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi, 41(3), 791-806.*

ÖZ

Bu çalışmada, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde içerikleri belirlenmiş; antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiş ve T24 ile HUVEC hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Ayrıca, sitotoksik ve antibakteriyel aktivitelerin değerlendirilmesinde ekstraktların kombinasyonlarının olası sinerjik etkileri de araştırılmıştır. En yüksek toplam fenolik madde miktarı biberiye ekstraktında 5,69 ± 0,03 mg GAE/mL, en yüksek toplam flavonoid madde miktarı ise yine biberiye ekstraktında 3,09 ± 0,12 mg CE/mL olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite ise siyah üzüm çekirdeği ekstraktında %93,90 ± 2,32 olarak elde edilmiştir. Ekstraktların farklı oranlarda kombinasyonu sonucunda antibakteriyel aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Bu ekstraktlarda *Staphylococcus aureus*'a karşı en yüksek antibakteriyel aktivite biberiye:siyah üzüm çekirdeği (3:1)'de, *Escherichia coli*'ye karşı ise biberiye:siyah üzüm çekirdeği (1:3) oranında elde edilmiştir. Sitotoksisite analizinde, biberiye ekstraktının 72. saatteki IC_{50} değerleri HUVEC hücrelerinde 309,96 ± 4,56 µg/mL ve T24 hücrelerinde 290,00 ± 17,49 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Siyah üzüm çekirdeği ekstraktının IC_{50} değerleri ise HUVEC hücrelerinde 915,23 ± 17,90 µg/mL ve T24 hücrelerinde 827,30 ± 48,85 µg/mL olarak bulunmuştur.

Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Biological Activity of Rosemary and Black Grape Seed Ethanolic Extracts

Article Info

Received : 15.12.2025
Accepted : 06.10.2026
DOI: 10.21605/cukurovaumfd.1841784

Corresponding Author

Tülay ÖNCÜ ÖNER
tulay.oncu@cbu.edu.tr

Keywords

Rosemary
Black grape seed
Synergistic effects
Antibacterial
Cytotoxicity

***How to cite:** ÜNSAL, E., İNAM, A., ÇÖVEN, F.O., ÖNCÜ ÖNER, T., (2026). Determination of Total Phenolic and Flavonoid Contents and Biological Activity of Rosemary and Black Grape Seed Ethanolic Extracts. Cukurova University, Journal of the Faculty of Engineering, 41(3), 791-806.*

ABSTRACT

In this study, the total phenolic content and total flavonoid content of ethanolic extracts of rosemary and black grape seeds were determined, their antioxidant and antibacterial activities were evaluated, and their cytotoxic effects on T24 and HUVEC cell lines were investigated. In addition, the potential synergistic effects of different extract combinations were evaluated in terms of their cytotoxic and antibacterial activities. The highest total phenolic content was determined in the rosemary extract, at 5.69 ± 0.03 mg GAE/mL, while the highest total flavonoid content was also obtained for the rosemary extract, at 3.09 ± 0.12 mg CE/mL. The highest antioxidant activity was observed for the black grape seed extract, with an inhibition rate of 93.90 ± 2.32%. An increase in antibacterial activity was observed following the combination of the extracts at different ratios. The highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* was obtained with the rosemary:black grape seed combination at a ratio of 3:1, whereas the highest activity against *Escherichia coli* was observed at a ratio of 1:3. In the cytotoxicity assay, the IC_{50} values of the rosemary extract at 72 h were calculated as 309.96 ± 4.56 µg/mL in HUVEC cells and 290.00 ± 17.49 µg/mL in T24 cells. For the black grape seed extract, the IC_{50} values were determined as 915.23 ± 17.90 µg/mL in HUVEC cells and 827.30 ± 48.85 µg/mL in T24 cells.

1. GİRİŞ

Bitkisel kaynaklı ürünler, antik çağlardan günümüze kadar birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Modern farmasötiklere kıyasla daha düşük toksisite ve sınırlı yan etki göstermeleri, bu ürünlerin özellikle halk hekimliğinde ve tamamlayıcı tıpta tercih edilmesine yol açmıştır. Bitkisel ilaçlar tek başına veya standart ilaçlarla birlikte, farklı hastalıkların tedavisi için çeşitli tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır [1,2]. Son yıllarda doğal ve ekolojik ürünlere olan ilginin artması, aromatik ve tıbbi bitkilerin biyolojik aktivitelerinin daha kapsamlı bir şekilde araştırılmasına zemin hazırlamıştır [3]. Bunun en önemli nedenlerinden biri, kronik hastalıkların patogenezinde oksidatif stres ve serbest radikallerin rolünün açıkça ortaya konmuş olmasıdır. Serbest radikallerin dengesizliği, lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit ve protein oksidasyonuna yol açarak kanser, kardiyovasküler iletim bozuklukları, diyabet ve nörodejeneratif bozuklukları tetiklemektedir. Sentetik antioksidanların (örneğin Bütillenmiş Hidroksianisol: BHA, Bütillenmiş Hidroksitoluen: BHT) uzun süreli kullanımının toksik ve karsinojenik etkileri artırabileceğine dair bulgular, araştırmacıları doğal antioksidan kaynaklarına yönlendirmiştir [3,4]. Bu kapsamda, fenolik bileşikler, flavonoidler, tokoferoller ve resveratrol gibi sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunan bitkisel ekstraktlar önem kazanmaktadır. Bitkisel kaynaklı ekstraktların biyolojik aktivitelerinin ortaya konması hem gıdalarda fonksiyonel ürünlerin kullanılması hem de sağlık alanında alternatif tedavi seçeneklerinin sağlanması açısından önemlidir [4]. Özellikle bitkilerin fenolik ve flavonoidler gibi farklı fitokimyasallar içermesi bu kaynakların hem geleneksel hem de modern yollarla çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yol açmış olup; son yıllarda bitki kaynaklı ticari ürünlere olan talep artmıştır [5].

Rosmarinus officinalis L. (*Salvia rosmarinus* Spenn.) tıbbi ve aromatik bitkiler arasında önemli bir yere sahiptir. Yaygın olarak biberiye ismiyle kullanılan *Salvia rosmarinus*, iğne benzeri yaprakları olan *Lamiaceae* familyasının hoş kokulu bir üyesidir. Biberiye, içerdiği karnosik asit, ursolik asit, rosmarinik asit ve flavonoidler sayesinde güçlü bir doğal antioksidan, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal ajandır. Geleneksel kullanımının yanı sıra gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde de değerlendirilmektedir [6]. Bu bileşiklerin aynı zamanda antikanser etkileri gösterdiği, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptoz mekanizmalarını aktive ettiği farklı çalışmalarda ortaya konmuştur [7,8]. Türkiye'de kalp damar rahatsızlıklarından sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada yer alan kanserin tedavisine yönelik metabolitlerin tespiti, bu noktada oldukça önemli hale gelmiştir [9]. Farklı biberiye ekstraktlarının antibakteriyel ve nöroprotektif özellikler gösterdiği de rapor edilmiştir. Özellikle gıda endüstrisinde doğal koruyucu olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır [3]. Biberiyenin terapötik uygulamasına ilişkin araştırmalar, inflamatuar bozuklukların yanı sıra özellikle yara, cilt kanseri ve mikozları tedavi etmek için de kullanılabileceğini ortaya koymuştur [6]. Ayrıca biberiye, Akdeniz diyetinde besin olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır [10]. Aromatik bir bitki olan biberiyenin sahip olduğu antiviral, antifungal, antibakteriyel, antikanser, antidepresan, antitrombotik ve antinosiseptif özellikleri sağlık alanında popüler hale gelmesini sağlamıştır. Bu bitki, cilt ve solunum rahatsızlıklarının yanı sıra dolaşım, nörolojik, mide-bağırsak, genitoüriner, karaciğer ve üreme sistemi hastalıklarının tedavisi gibi bir dizi tıbbi kullanımla ilişkilendirilmektedir [11]. Ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak ekstraktlar arasında farklılık gösterebilen polifenoller, flavonoidler ve diterpenler gibi çeşitli bileşikleri içermektedir [12]. Biberiyenin içerdiği flavonoidler genellikle yapraklarda, çiçeklerde ve köklerde bulunmaktadır ve bu bileşikler eriocitrin, luteolin 3'-O-β-D-glukuronid, hesperidin, diosmin, izoscutellarein 7-O-glukozit, hispidulin 7-O-glukozit ve genkwanin olarak belirlenmiştir [13]. Fenolik bileşikler arasında kafeik, ferulik, p-kumarik, gallik, kinik ve şirinjik asitler bulunmaktadır [14]. Özellikle diterpen karnosol ve karnosik asit gibi bileşikler bitkinin antioksidan potansiyelinin %90'ına kadar katkıda bulunmaktadır [12]. Biberiyenin anti-inflamatuar aktivitesi ise, sinerjik olarak etki eden karnosol ve karnosik, ursolik, rosmarinik, oleanolik ve mikromerik gibi bileşiklerle ilişkilendirilmiştir [15]. Literatürde, biberiye ekstraktlarının hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğu, kanser hücre hatlarında antiproliferatif ve sitotoksik özellikler gösterdiği bildirilmektedir [16,17].

Siyah üzüm olarak bilinen *Vitis vinifera*, dünyanın birçok yerinde yetiştirilmektedir ve farklı tıbbi kullanımlara sahiptir. Antioksidan, anti-inflamatuar, antibakteriyel aktiviteler ve yara iyileştirici etkileri kanıtlanan biyolojik aktiviteleri arasındadır [18]. Siyah üzüm çekirdeği ekstraktı ise resveratrol, kateşin, epikateşin ve proantosiyanidinler açısından zengindir. Bu bileşikler, üzüm çekirdeğini güçlü bir antioksidan ve antikanser ajan haline getirmektedir. Fenolik bileşikler bakımından zengin olan üzüm, yaşlanma

geciktirici etkilere sahip olduğu bildirilen ve Alzheimer hastalığına karşı potansiyel koruyucu etki gösterebilecek aktif bileşenler içermektedir [19]. Farklı kullanım amaçlarına yönelik farklı üzüm türleri yetiştirilmektedir. İçeriğinde siyanidin, malvidin ve peonidin içeren antosiyaninler; kersetin, kateşin ve epikateşin içeren flavonoller; polifenoller; resveratrol içeren stilbenler; karbonhidratlar; kalsiyum, magnezyum, potasyum ve demir içeren tuzlar; ve A, D, C ve E vitaminleri; ayrıca doymuş veya doymamış yağlar bulunmaktadır [18]. Besin değeri yüksek olan bu bitkinin, yaprakları, sapları ve meyveleri gibi parçalarının ve tohumlarının sayısız farmakolojik etkisi kanıtlanmıştır [20]. Üzüm sapı ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Meyve ve çekirdeğinde bulunan resveratrol ve proantosiyanidin sayesinde farklı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteler tespit edilmiştir [21]. Siyah üzüm çekirdeği de fenolik bileşikler, flavonoidler, resveratrol ve tokoferoller açısından zengin bir kaynaktır. Antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri yanında sitotoksik etkileri de birçok çalışmada gösterilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktlarının kanser hücre hatları üzerinde seçici toksisite oluşturduğu, aynı zamanda bakterilere ve mantarlara karşı da inhibitör etki gösterdiği bilinmektedir [22,23]. Yapılan çalışma, üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin kolon kanseri hücrelerinde PI3K/Akt yolunu devre dışı bırakarak apoptozu indüklediğini göstermiştir [22]. Benzer şekilde başka bir araştırma, üzüm kabuğu ve çekirdek ekstraktlarının epidermoid karsinom hücrelerinde apoptotik etki oluşturduğunu rapor etmiştir [24]. Üzüm çekirdeği ekstraktının antimikrobiyal potansiyeli bulunmaktadır; özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı yüksek etki gösterdiği bilinmektedir [19]. Bu bilgiler ışığında, bitkisel ekstraktların biyolojik aktivitelerinin araştırılması hem sağlık hem de endüstriyel uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle fenolik ve flavonoid bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal potansiyeli, doğal ürünlere dayalı yeni tedavi ve koruyucu yaklaşımların geliştirilmesinde yol gösterici olmaktadır.

Tüm bu veriler, farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktların fenolik içerikleri, antioksidan etkileri, sitotoksisite ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesinin hem biyomedikal hem de farmasötik uygulamalara yönelik yeni potansiyel biyoaktif ajanların geliştirilmesi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının belirlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin (antioksidan, sitotoksik ve antibakteriyel) değerlendirilmesidir. Bu kapsamda ekstraktların hem bireysel hem de kombine olarak etkilerinin test edilmesi planlanmış, özellikle sinerjik etki potansiyelinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu ekstraktların farklı kanser hücre hatları ve bakteri türleri üzerindeki etkileri sistematik bir şekilde incelenmiştir. Literatürde biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin tek başına biyolojik aktiviteleri üzerine çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen [25,26], birlikte kullanımının potansiyel sinerjik etkilerini değerlendiren çalışmalar sınırlıdır. Dolayısıyla söz konusu ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının belirlenmesi ve antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi hem literatürdeki boşlukların doldurulmasına hem de biyolojik ajanların yeni uygulama alanlarının tanımlanmasına katkı sağlamıştır.

2. MATERYAL YÖNTEM

2.1. Ekstraksiyon İşlemi

Biberiye ve siyah üzüm çekirdekleri Arpaş Arifoğlu Pazarlama Dağıtım ve Ticaret A.Ş. (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Siyah üzüm çekirdekleri hazır toz formunda bulunurken, biberiye bitkisi öğütücüde öğütülerek toz hale getirilerek kullanılmıştır. Her iki bitkinin ekstraksiyonu yapılan ön çalışmalara bağlı olarak farklı polaritedeki bileşiklerin ekstrakte edilmesi amacıyla etanol:su (70:30) çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, 10 gram toz örneğin üzerine 100 mL çözelti eklenmiş, karışım homojen hale getirildikten sonra ultrasonik destekli ekstraksiyon 1 saat boyunca uygulanmıştır. Bu işlem için oda sıcaklığında sonikasyon sağlayan su banyosu kullanılmıştır. Sıcaklık kontrolü ise termometre ile sağlanmış, gerektiğinde kavitasyonel sıcaklık artışına soğuk su desteği yapılmıştır. Ekstraksiyonun ardından, çöktürme işlemi 50 mL hacmindeki falkon tüplerde 20 °C'de 4000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edilerek yapılmıştır. Elde edilen süpernatant, önce 40 °C'de evaporasyonla etanolden arındırılmış, daha sonra -56 °C kondenser sıcaklığında; 1,1 mbar basınç altında liyofilizasyon (Christ 1-2 LDplus) yapılarak sudan tamamen uzaklaştırılmıştır. Kurutulmuş ekstraktlar, analizler gerçekleştirilinceye kadar -20 °C'de, ağzı kapaklı 250 mL şilifli balonlarda yaklaşık 1 ay süreyle muhafaza edilmiştir. Son aşamada, kurutulmuş ekstraktlar testlerde kullanılmak üzere 1:10 (ağırlık/hacim) oranında etanol:su (70:30) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

2.2. Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antioksidan aktivite, Seyrekoğlu ve Temiz (2020) çalışmasında açıklanan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemi baz alınarak modifiye edilmiş bir protokolle belirlenmiştir. Ekstrakt örneklerinden 50 µL alınarak cam tüplere aktarılmış ve hacim, metanol eklenerek 200 µL'ye tamamlanmıştır. Ardından, her bir tüpe 3,8 mL 0,1 mM metanol ile hazırlanmış DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar vorteks yardımıyla homojenize edilmiş ve literatürde belirtildiği üzere tüpler inkübasyon süresi olarak 60 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda absorbans değerleri spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kontrol grubunda ise 200 µL etanol:su (70:30) çözeltisi, aynı işlem basamakları izlenerek değerlendirilmiştir [27]. Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki Eşitlik (1) kullanılarak % inhibisyon olarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ inhibisyon} = (Abs_{\text{pozitif kontrol}} - Abs_{\text{örnek}}) / Abs_{\text{pozitif kontrol}} \times 100 \quad (1)$$

2.3. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemi ile 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrakt örneklerinden 20 µL alınarak kuyucuklara aktarılmış, ardından üzerine 100 µL 0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve karışım 2,5 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa %7'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 80 µL ilave edilerek pipetleme ile homojenizasyon sağlanmıştır. Hazırlanan karışımlar, oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda literatürde belirtildiği üzere inkübasyon süresi olarak 60 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda absorbans ölçümleri spektrofotometrede 775 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Gallik asit standardı için hazırlanan çözeltiler de aynı prosedüre göre işleme tabi tutulmuş ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Sonuçlar, gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak mg GAE/mL biriminden ifade edilmiştir [28].

2.4. Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Toplam flavonoid miktarı, Molan ve Mahdy (2014) tarafından rapor edilen alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak belirlenmiştir. Mikroplakanın her bir kuyucuğuna sırasıyla 25 µL ekstrakt, 100 µL distile su ve %5 $NaNO_2$ çözeltisinden 7 µL eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, karışıma %10 $AlCl_3$ çözeltisinden 7 µL ilave edilmiş ve karışım 5 dakika daha bekletilmiştir. Sonrasında reaksiyonu tamamlamak üzere 50 µL 1 M NaOH ve 60 µL distile su eklenmiştir. Absorbans ölçümleri, mikroplaka okuyucusunda 490 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş olup sonuçlar kateşin eşdeğeri (CE) olarak mg CE/mL biriminden ifade edilmiştir [29].

2.5. Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, ekstraktların sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] testi uygulanmıştır. Analiz kapsamında, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının T24 insan mesane kanseri hücre hattı ile sağlıklı kontrol olarak kullanılan HUVEC (insan göbek kordonu ven endotel) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Tüm hücreler, %10 FBS (fetal bovine serum), %1 L-glutamin, %1 sodyum piruvat, %1 penisilin/streptomisin ve %1 esansiyel olmayan aminoasit içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler T75 flasklara ekildikten sonra 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve %95 nem koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler yaklaşık %80 konfluent seviyesine ulaştığında, tripsin-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmış ve Neubauer lamı ile trypan blue boyama yöntemi kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 96 kuyucuklu mikroplakalara her kuyucuğa 100 µL hacimde 10^4 hücre ekilmiştir. Plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlarla muamele edilmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktları için 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol gruplarında ise yalnızca çözücü etkisini değerlendirmek amacıyla etanol:su (70:30) kullanılmıştır. Ekstrakt uygulamasının ardından hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca aynı inkübasyon koşullarında bekletilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda her kuyucuğa 10 µL 5 mg/mL MTT/PBS (Fosfat tamponlu salin) çözeltisi eklenmiş ve plakalar 3,5 saat boyunca inkübatörde tutulmuştur. Bu süre içinde canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal enzimlerin indirgeme aktivitesi sonucu formazan kristalleri oluşmuştur. İnkübasyon tamamlandığında kültür ortamı

uzaklaştırılmış ve oluşan kristallerin çözünmesi için her kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Ardından absorbans değerleri mikroplaka okuyucu cihazda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür [30]. Sitotoksisite düzeyleri aşağıdaki Eşitlik (2) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = (Abs_{\text{test kuyucuğu}} / Abs_{\text{kontrol kuyucuğu}}) \times 100 \quad (2)$$

Kontrole kıyasla %50 oranında sitotoksik etki oluşturan konsantrasyon, sitotoksik doz (IC_{50}) olarak tanımlanmıştır. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının bireysel IC_{50} değerleri belirlenmiş; ayrıca bu iki ekstraktın farklı konsantrasyonları karıştırılarak deneyler tekrarlanmış ve böylelikle sitotoksik aktivite üzerinde olası sinerjik etkileri değerlendirilmiştir.

2.6. Ekstraktların Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri tayin edilmiş ve agar plakalarda disk difüzyon testi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram-negatif *Escherichia coli* bakteri türleri kullanılmıştır. Her iki bakteri türü, Nutrient Broth besiyerinde 37 °C'de, çalkalamalı inkübatörde 24 saat süreyle kültüre edilmiştir. Elde edilen kültürlerin bulanıklığı, 600 nm dalga boyunda absorbans değeri 0,6 olacak şekilde seyreltilerek standartlaştırılmıştır. MIC belirlenmesi için ekstraktlar stok çözeltiden (100 µL) başlayarak seri seyreltme yöntemi ile hazırlanmış ve 96 kuyucuklu mikroplakalara 5×10^5 CFU/mL yoğunlukta bakteri süspansiyonu (100 µL) eklenmiştir. Plakalar 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 600 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak MIC değerleri hesaplanmıştır [31,32].

Disk difüzyon yönteminde ise 24 saatlik inkübasyonun ardından bakteri kültürlerinin türbiditesi yine 600 nm'de absorbans 0,6 değerine ayarlanmıştır. Hesaplamalar doğrultusunda 1×10^6 CFU/mL olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları, Mueller Hinton Agar (MHA) plakalarına yayma plaka yöntemiyle inoküle edilmiştir. Steril 6 mm çapındaki Oxoid diskler, ekstraktlardan 30 µL emdirilerek agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonlarının çapları (mm) ölçülmüştür. Ayrıca biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 ve 3:1 oranlarında karışımları hazırlanarak olası sinerjik etkileri değerlendirilmiştir [31,32].

2.7. İstatistiksel Analiz

Sitotoksisite ve antibakteriyel aktivite testlerinde verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism, (Sürüm 8.4.2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her konsantrasyon üç bağımsız tekrar halinde yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiş ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin normal dağılımı Shapiro–Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda One-way ANOVA ve Tukey post-hoc testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler için Mann–Whitney veya Kruskal–Wallis testi uygulanmıştır [30].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Tespit Edilmesi

Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemine göre belirlenmiştir. Ekstraktların serbest radikalleri yok etme aktivitesi %inhibisyon olarak ifade edilmiştir (Çizelge 1). Bu sonuçlara göre en yüksek antioksidan aktivite siyah üzüm çekirdeğinin etanolik ekstraktında elde edilmiştir. İnhibisyon değeri siyah üzüm çekirdeği ekstraktında %93,90 ± 2,32, biberiye ekstraktında %92,84 ± 2,53 olarak hesaplanmıştır. Bunun yanında standart olarak kullanılan Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA)'de bu konsantrasyondaki antioksidan aktivite değeri %97,09 olarak tespit edilmiştir. Siyah üzüm çekirdeği ve biberiye ekstraktlarında BHA'ya yakın aktivite değerleri bulunmuştur.

Çizelge 1. Ekstraktların antioksidan aktivite sonuçları

Ekstrakt	%inhibisyon
Biberiye	92,84 ± 2,53
Siyah üzüm çekirdeği	93,90 ± 2,32

3.2. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Miktarının Tespit Edilmesi

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı analizi Folin-Ciocalteu metoduna göre uygulanmıştır. Gallik asit eşdeğerliğinde (GAE) en yüksek toplam fenolik madde miktarı biberiyede elde edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı biberiye etanolik ekstraktında 5,69 ± 0,03 mg GAE/mL, siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında 5,25 ± 0,02 mg GAE/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı sonuçları

Ekstrakt	Toplam fenolik madde miktarı
Biberiye	5,69 ± 0,03 mg GAE/mL
Siyah üzüm çekirdeği	5,25 ± 0,02 mg GAE/mL

3.3. Ekstraktların Toplam Flavonoid Madde Miktarının Tespit Edilmesi

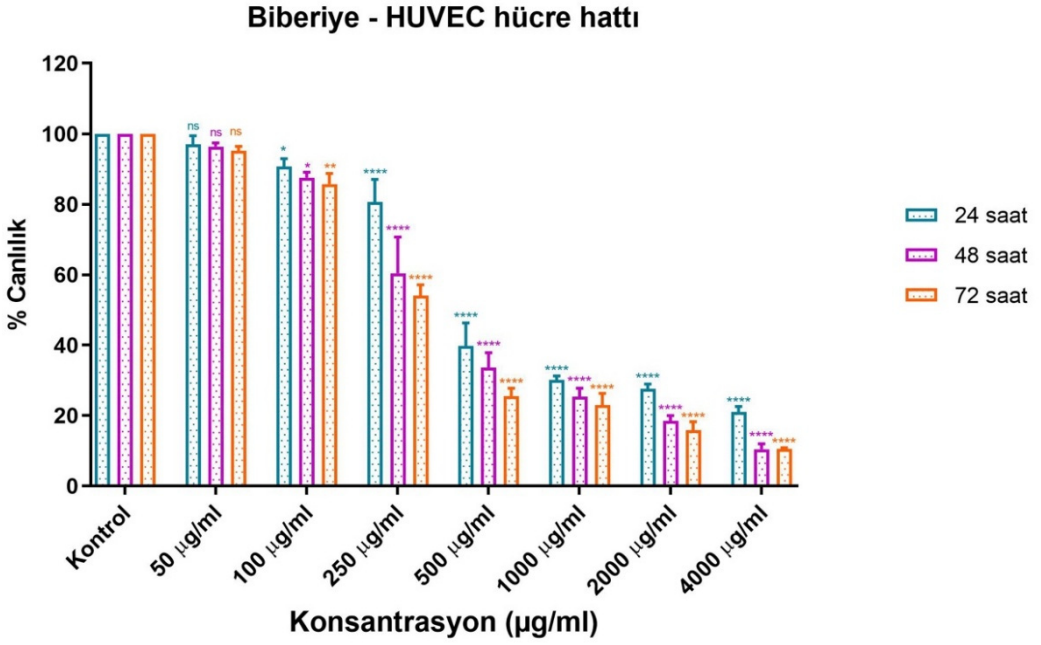
Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı analizi alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre uygulanmıştır. En yüksek flavonoid madde miktarı biberiye etanolik ekstraktındadır. Toplam flavonoid madde miktarı biberiye etanolik ekstraktında 3,09 ± 0,12 mg CE/mL, siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında 1,71 ± 0,06 mg CE/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı sonuçları

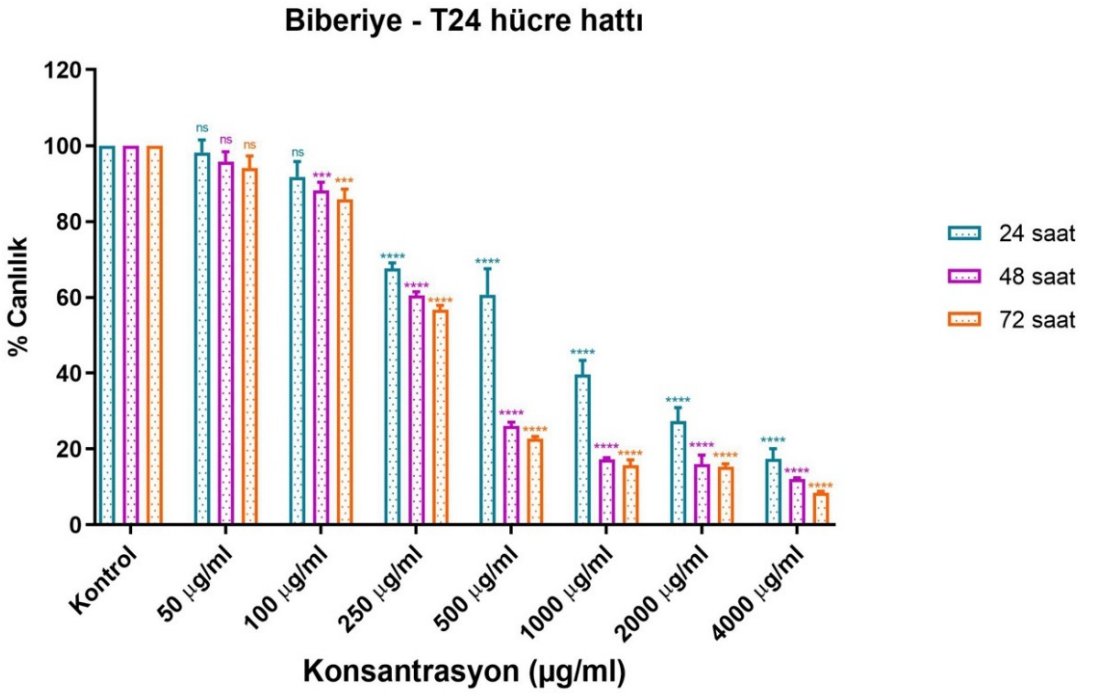
Ekstrakt	Toplam flavonoid madde miktarı
Biberiye	3,09 ± 0,12 mg CE/mL
Siyah üzüm çekirdeği	1,71 ± 0,06 mg CE/mL

3.4. Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Tespit Edilmesi

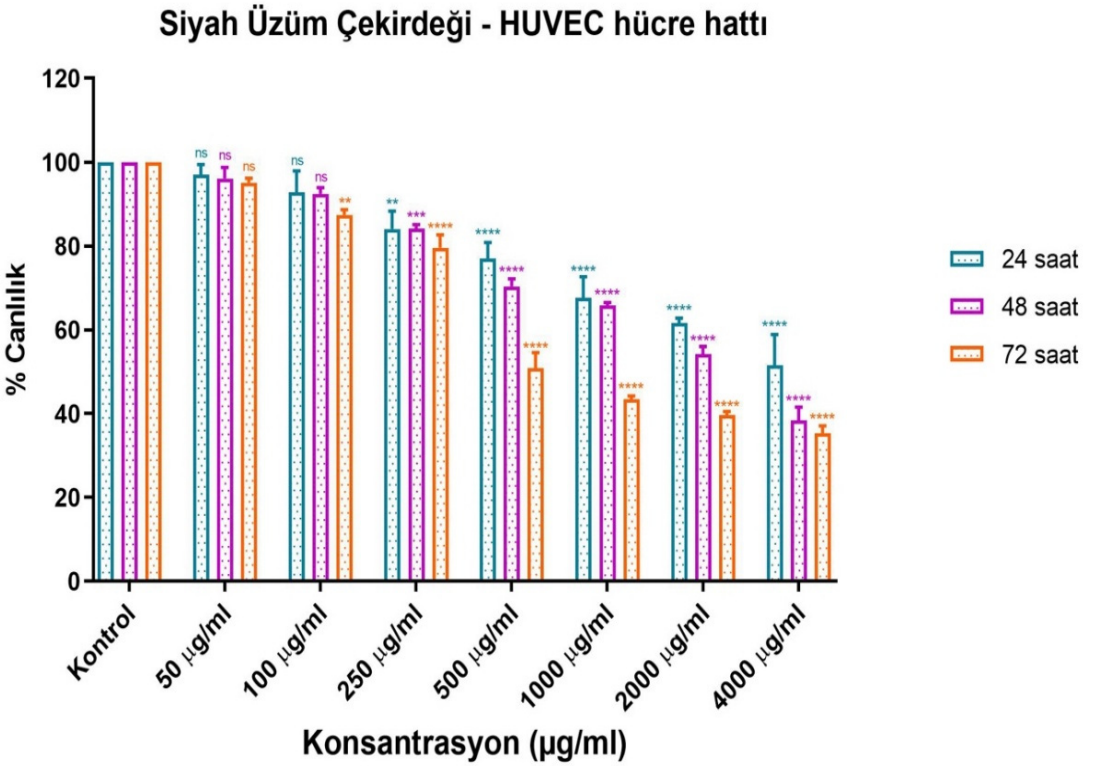
Öncelikle biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının bireysel sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiştir. Farklı dozlarla muamele edilen hücrelerde üç farklı zaman diliminde yüzde canlılıklar hesaplanmıştır. 24., 48., ve 72. saatte alınan absorbans sonuçları kontrol kuyucuklarına kıyaslanmış ve ekstraktların hücre canlılığını azaltma yüzdeleri belirlenmiştir (Şekil 1-4).



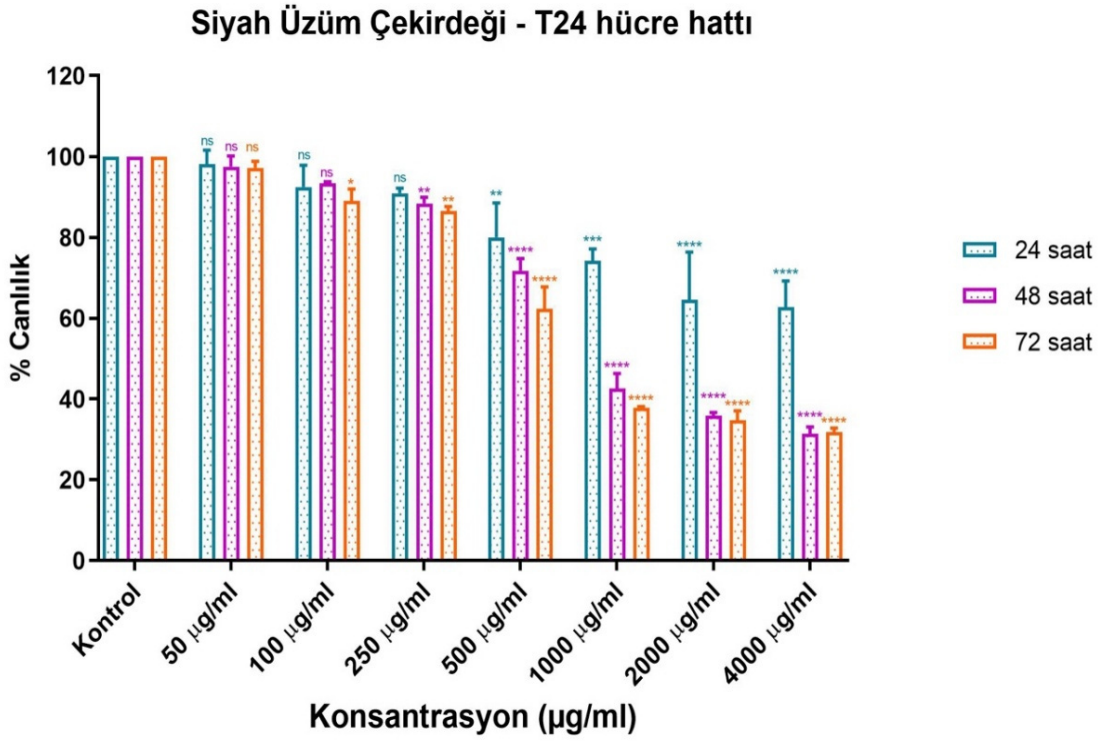
Şekil 1. Biberiye etanolik ekstraktının HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3)) (ns: istatistiksel olarak anlamlı değil; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001)



Şekil 2. Biberiye etanolik ekstraktının T24 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri. (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3)) (ns: istatistiksel olarak anlamlı değil; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001)



Şekil 3. Siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktının HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri. (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3)) (ns: istatistiksel olarak anlamlı değil; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001).



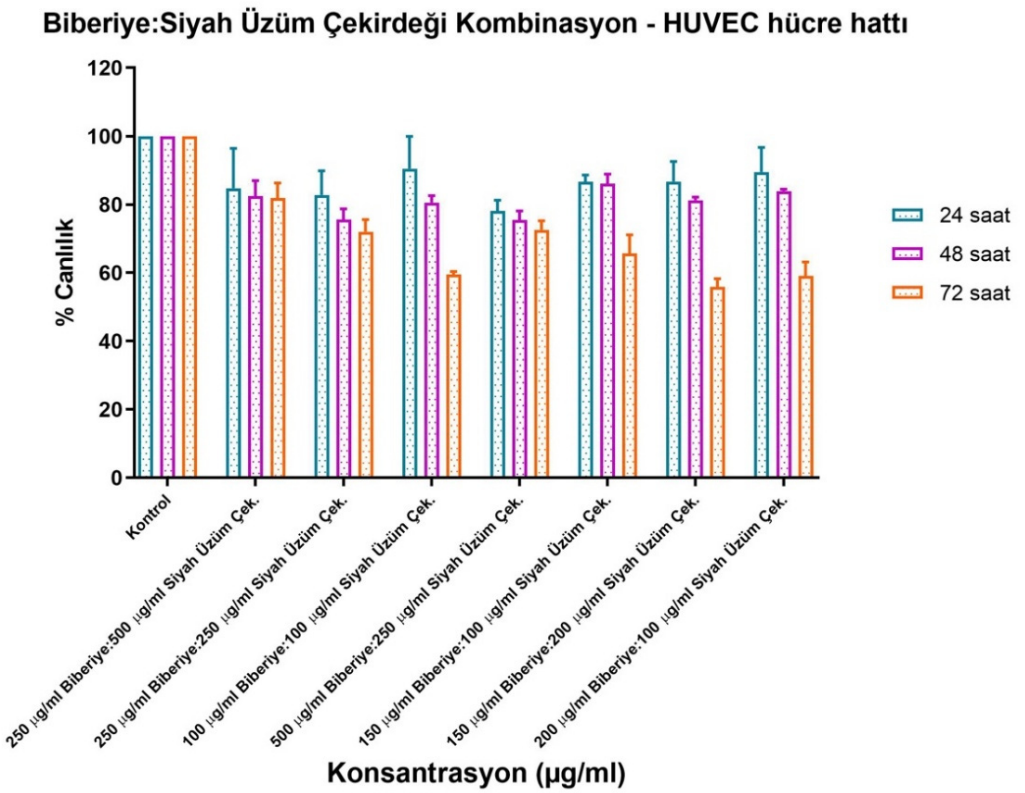
Şekil 4. Siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktının T24 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri. (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3)) (ns: istatistiksel olarak anlamlı değil; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001)

Hücrelerin yüzde canlılık değerlerine göre GraphPad Prism 8.4.2. yazılımı (San Diego, CA, ABD) kullanılarak ekstraktların IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4). Çalışmada biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının IC_{50} değeri HUVEC ve T24 hücrelerine karşı 24., 48. ve 72. saat sonunda belirlenmiştir.

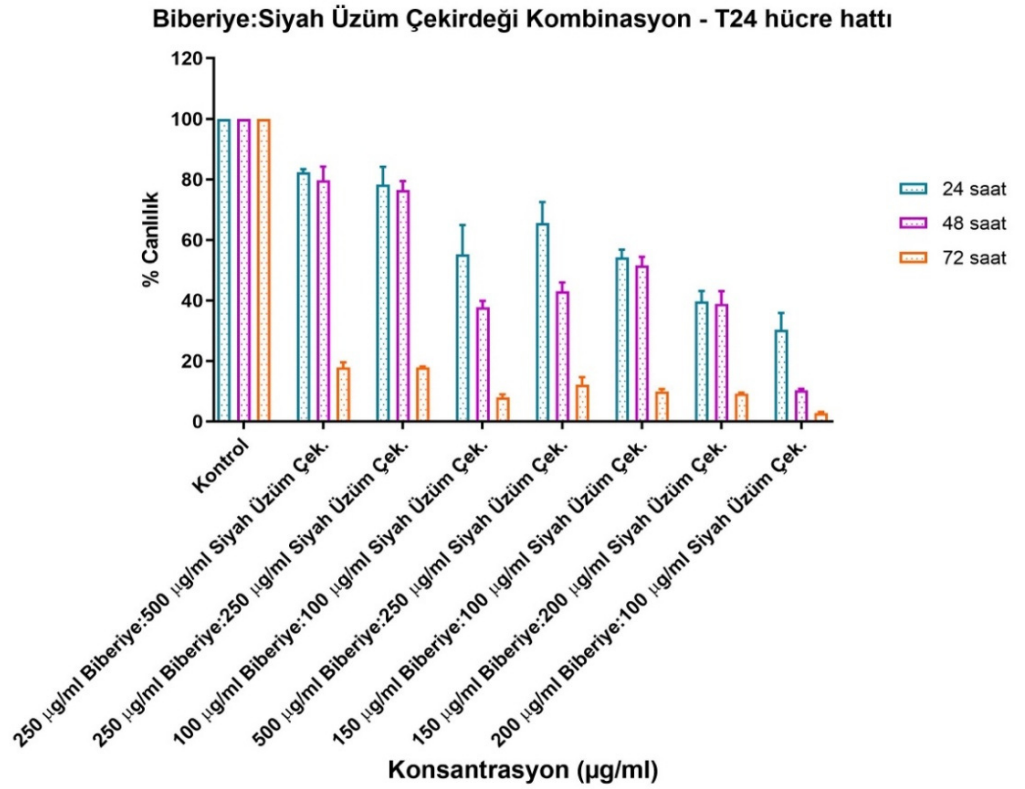
Çizelge 4. Ekstraktların IC_{50} değerleri (µg/mL) (± değerleri standart sapmayı (SD) ifade etmektedir(n=3))

Ekstrakt	Hücre Hattı	24h	48h	72h
Biberiye	HUVEC	482,03 ± 23,18	387,60 ± 26,98	309,96 ± 4,56
	T24	712,30 ± 55,22	327,16 ± 13,96	290,00 ± 17,49
Siyah Üzüm Çekirdeği	HUVEC	4244,33 ± 282,63	2193,33 ± 134,81	915,23 ± 17,90
	T24	4542,33 ± 106,16	931,66 ± 41,10	827,30 ± 48,85

Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktları HUVEC hücrelerine göre T24 hücrelerinde daha fazla sitotoksik aktivite sergilemiştir. Siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında en etkili sonuç T24 hücresine karşı 72 saat sonunda 827,30 ± 48,85 µg/mL değeri ile bulunmuştur. Biberiye etanolik ekstraktında da benzer bir şekilde T24 hücresine karşı 72 saat sonunda IC_{50} değeri 290,00 ± 17,49 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm örneklerde saate ve doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir. Tek başına sitotoksik aktivitelerinin değerlendirilmelerinin yanında, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının farklı oranlarda karışımları hem HUVEC hem de T24 hücrelerine karşı 24., 48. ve 72. saat sonunda sitotoksik potansiyelleri incelenmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının farklı kombinasyonları T24 hücrelerine karşı 72 saat sonunda hücre canlılığını %50'nin altına düşürmüştür. Kombinasyonlar arasında en etkili olanlar 150 µg/mL biberiye:200 µg/mL siyah üzüm çekirdeği ve 200 µg/mL biberiye:100 µg/mL siyah üzüm çekirdeği oranlarında hazırlananlar olmuştur. Bu kombinasyonlarda tüm saat aralıklarında %50'nin altında hücre canlılığı tespit edilmiştir. Buna karşı, hiçbir kombinasyonda HUVEC hücrelerine karşı neredeyse bir etki gözlenmemiştir (Şekil 5-6).



Şekil 5. Biberiye-siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktı karışımlarının HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri. (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3))



Şekil 6. Biberiye-siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktı karışımlarının T24 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonrası yüzde canlılık değerleri. (Hata çubukları standart sapmayı (SD) göstermektedir (n=3))

3.5. Ekstraktların Antibakteriyel Aktivitelerinin Tespit Edilmesi

Ekstraktların *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri öncelikle disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. Sonuçlar mm cinsinden hesaplanmıştır. Ekstraktların farklı kombinasyon oranlarıyla elde edilen karışımlarına da aynı şekilde disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Tüm sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir. Antibakteriyel aktivite sonuçlarına göre biberiye:siyah üzüm çekirdeği 1:1 oranındaki kombinasyonda inhibisyon zon sonucu her iki bakteri için de ekstraktların kendilerine göre daha yüksek olarak ölçülmüştür. *S. aureus* bakterisinde biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin kendisi 6,37 ± 0,22 mm ve 6,72 ± 0,18 mm iken *E. coli* bakterisinde 6,42 ± 0,17 mm ve 6,68 ± 0,12 mm olarak elde edilmiştir. 1:1 kombinasyonda ise bu bakterilere karşı sırasıyla 7,59 ± 0,10 mm ve 6,71 ± 0,22 mm zon çapları ölçülmüştür. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin 1:3 oranındaki kombinasyon sonucu da 7,22 ± 0,28 mm ve 7,46 ± 0,25 mm olarak her iki ekstraktın kendisine göre daha yüksek değerler elde edilmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin 3:1 oranındaki değerleri de 7,87 ± 0,21 mm ve 6,91 ± 0,23 mm olarak kaydedilmiştir. Buna göre iki ekstraktın bu oranlarda bir arada kullanılması antibakteriyel aktivitede sinerjik etki oluşturmuştur. Negatif kontrol olarak uygulanan %70 etanol solventinde ise herhangi bir aktivite saptanmamıştır.

Çizelge 5. %70 etanolik ekstraktların ve kombinasyonlarının disk difüzyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite sonuçları

İnhibisyon Zonları (mm)	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
Biberiye	6,37 ± 0,22	6,42 ± 0,17
Siyah üzüm çekirdeği	6,72 ± 0,18	6,68 ± 0,12
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:1)	7,59 ± 0,10	6,71 ± 0,22
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (2:1)	6,36 ± 0,21	6,83 ± 0,20
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:2)	7,39 ± 0,12	6,39 ± 0,14
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:3)	7,22 ± 0,28	7,46 ± 0,25
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (3:1)	7,87 ± 0,21	6,91 ± 0,23

Ekstraktların *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitelerinde uygulanan diğer yöntem ise minimum inhibisyon konsantrasyonu belirleme yöntemidir. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Ekstraktların kendilerinin dışında farklı kombinasyon oranlarıyla elde edilen karışımlara da aynı şekilde MIC yöntemi uygulanmıştır. Tüm sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir. Antibakteriyel analizlerde MIC sonuçları da disk difüzyon sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin kombinasyonlarının sinerjik etki yarattığı söylenebilir. Negatif kontrol olarak uygulanan %70 etanol solventinde ise herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Sonuçların var/yok şeklinde nitel olarak değerlendirilmesi ve tüm deney tekrarlarında aynı kuyucuklarda aynı bulgunun gözlenmesi nedeniyle, bu sonuçlar için standart sapma değerleri hesaplanmamıştır.

Çizelge 6. %70 etanolik ekstraktların ve kombinasyonlarının MIC yöntemine göre antibakteriyel aktivite sonuçları

MIC (mg/mL)	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
Biberiye	6,25	6,25
Siyah üzüm çekirdeği	6,25	6,25
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:1)	3,125	3,125
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (2:1)	6,25	6,25
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:2)	6,25	6,25
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (1:3)	6,25	3,125
Biberiye:Siyah üzüm çekirdeği (3:1)	3,125	6,25

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları, antioksidan aktiviteleri, sitotoksik ve antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik

testi kullanılarak ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı, DPPH yöntemi kullanılarak ekstraktların antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir. MTT yöntemi kullanılarak biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının T24 insan mesane kanseri ve HUVEC insan göbek kordonu ven endotel hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin tayini yapılmıştır. Ayrıca disk difüzyon yöntemi ve minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) yöntemiyle ekstraktların *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) ve *Escherichia coli* (Gram-negatif) bakterileri üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının birlikte kullanımının sitotoksik ve antibakteriyel aktiviteye etkisi belirlenmiştir. Fenolik ve flavonoid bileşikler bakımından zenginlik, bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinin temel belirleyicisidir. Çalışmamızda en yüksek antioksidan aktivite değeri siyah üzüm çekirdeği ekstraktında %93,90 olarak, biberiye ekstraktında ise %92,84 olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı biberiye etanolik ekstraktında 5,69 ± 0,03 mg GAE/mL, siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında 5,25 ± 0,02 mg GAE/mL olarak bulunmuştur. Toplam flavonoid madde miktarı ise biberiye etanolik ekstraktında 3,09 ± 0,12 mg CE/mL, siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında 1,71 ± 0,06 mg CE/mL olarak elde edilmiştir. Üzüm çekirdeğinin etanol:su (70:30) çözeltisiyle ekstraksiyonu yapılan bir çalışmada sırasıyla 256,15 ± 17,40 mg GAE/gram kuru ağırlık ve 14,08 ± 0,64 mg CE/gram kuru ağırlık olarak toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları elde edilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktında gerçekleştirilen LC/MS analizi prosiyanidin zenginliğini ortaya koymuştur [33]. Biberiye ekstraktlarının sitotoksik etkileri de literatürde geniş ölçüde rapor edilmiştir. Özellikle karnosol ve karnosik asit gibi diterpenlerin antikanser aktivitesi öne çıkmaktadır. Cattaneo ve arkadaşları (2015) biberiye ekstraktının A375 melanoma kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini çalışmışlardır [7]. Brindisi ve arkadaşları (2020)'nın iki farklı meme kanseri hücre hattı, MCF-7 (ERα +) ve MDA-MB-231 (triple negatif), kullandığı çalışmada 10, 20, 40 ve 60 µg/mL konsantrasyonlarıyla MTT testi yapılmıştır. Tüm ekstraktların, her iki meme kanseri hücresinde, IC_{50} değerini 6,83 µg/mL ile 15,67 µg/mL arasında değiştirdiği ve konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır [10]. Yesil-Celiktas ve arkadaşları (2010), biberiye ekstraktlarının yanı sıra ekstraktın başlıca fenolik bileşenleri olan karnosik asit ve rosmarinik asidin farklı insan kanser hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, biberiye ekstraktlarının ve bu bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği ve bu etkinin kullanılan ekstraktın bileşimine ve hücre hattına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir [34]. Kakouri ve arkadaşları (2022) ise glioblastoma (A172) ve rabdomyosarkom (TE671) hücrelerinde zaman ve doza bağlı sitotoksisite oluşturduğunu göstermiştir. En düşük IC_{50} değerleri 72 saat sonra TE671 hücre hattı için 0,25 ± 1,09 mg/mL ve A172 hücre hattı için ise 0,58 ± 0,98 mg/mL olarak elde edilmiştir [8].

Siyah üzüm çekirdeği ekstraktlarının biyolojik aktivitesi, içerdiği polifenoller ve resveratrol gibi bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Engelbrecht ve arkadaşları (2007), üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerinin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini rapor etmiştir [22]. Grace Nirmala ve arkadaşları (2018), üzüm kabuğu ve çekirdek ekstraktlarının epidermoid karsinom hücrelerinde apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur [24]. Bir çalışmada *Vitis vinifera* L. atıklarının, MCF-7 göğüs adenokarsinomu ve HeLa servikal karsinomu hücrelerini öldürebilecek sitotoksik özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir [35]. Başka bir çalışmada ise Caco-2 kolon kanseri hücrelerinde ve normal kolon epitel hücrelerinde (NCM 460 hücreleri) hücre canlılığı araştırılmıştır. Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktının 10-100 µg/mL arasındaki konsantrasyonları kullanılmıştır. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının, kanser hücre hattında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Farklı bir çalışmada üzüm posası ve çekirdeği ekstraktlarının fibroblastlar ile Caco-2, HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerindeki antitümör etkileri incelenmiştir. Aynı kaynaklardan saflaştırılmış ekstraktlar hazırlanmış ve üzüm çekirdeğinden elde edilen saflaştırılmış ekstraktın en yüksek etkiyi Caco-2 hücreleri üzerinde gösterdiği bildirilmiştir. HT-29 hücrelerinin, bu saflaştırılmış ekstraktlara karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir [36]. Üzüm çekirdeği sulu ekstresi 100 µg/mL'de, muamelenin ilk 24 saatinde 3T6 hücreleri üzerinde %3,88 oranında toksisiteye neden olurken, 48 saate kadar uzatılmış etkisi bu toksisiteyi %0,5'in altına düşürmüştür. 24 ve 48 saatlik muamelede HeLa ve BCPAP hücreleri için sırasıyla %18,39 ila %23,79 ve %10,30 ila %20,37 arasında bir hücre ölümü elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu ekstraktın sağlıklı hücreler üzerindeki yararlı etkisiyle birlikte anti-proliferatif bir ajan olarak daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması önerilmiştir [33].

Bu çalışmada ise biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının kanser ve normal hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri üzerinden değerlendirilmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktları HUVEC hücrelerine göre T24 hücrelerinde daha fazla sitotoksik aktivite sergilemiştir. Siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında en etkili sonuç T24

hücresine karşı 72 saat sonunda 827,30 ± 48,85 µg/mL değeri ile bulunmuştur. Biberiye etanolik ekstraktında da benzer bir şekilde T24 hücresine karşı 72 saat sonunda IC_{50} değeri 290,00 ± 17,49 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar, zamanın artmasıyla birlikte ekstraktların hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkilerinin belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Biberiye ekstraktı, T24 mesane kanseri hücrelerinde zamanla azalan IC_{50} değerleriyle güçlü bir antiproliferatif etki ortaya koymuştur. Aynı örnek HUVEC normal endotel hücrelerinde daha yüksek IC_{50} değerleri sunarak kanser hücresine karşı seçici toksisite profili sergilemiştir. Bu yönü ile kanser hücrelerini hedefleyen çalışmalarda kullanılabilecek doğal bir ajan olma potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Siyah üzüm çekirdeği ekstraktının her iki hücre hattında da başlangıçta çok yüksek IC_{50} değerleri verdiği gözlenmiş, ancak ilerleyen zaman noktalarında etkinliğinde kademeli bir artış saptanmıştır. Buna rağmen elde edilen değerler, bu ekstraktın doğrudan sitotoksik etki potansiyelinin daha düşük olduğunu ve antioksidan özelliklerinin baskın olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, ekstraktların tamamı zaman bağımlı sitotoksik aktivite sergilemiştir. Ancak etkinlik ve hücre tipi seçiciliği dikkat çekmektedir. Biberiye kanser hücrelerinde daha belirgin antiproliferatif etki göstererek gelecekteki preklinik çalışmalar için güçlü bir aday olma potansiyelindedir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktlarının birlikte uygulanması ile elde edilen sitotoksisite sonuçları incelendiğinde, kombinasyon uygulamasının HUVEC hücre canlılığı üzerinde zaman ve konsantrasyon bağımlı bir azalma oluşturduğu belirlenmiştir. Genel olarak 24 saatlik uygulamalarda canlılık oranları %80'in üzerinde seyrederken, 48 ve özellikle 72 saatlik inkübasyon sürelerinde belirgin bir düşüş görülmüştür. Bu durum, kombinasyonun hücre proliferasyonunu geciktirici ve zamana bağlı bir sitotoksik etki geliştirdiğini göstermektedir. Konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, özellikle 100 µg/mL biberiye:100 µg/mL siyah üzüm çekirdeği ve 150 µg/mL biberiye:200 µg/mL siyah üzüm çekirdeği kombinasyonlarının 72 saat sonunda hücre canlılığını yaklaşık %60 seviyelerine düşürdüğü görülmektedir. Bu düşüş, kombinasyonun belirli oranlarda sinerjik toksik etki oluşturabileceğine işaret etmektedir. Diğer kombinasyonlarda ise canlılık oranlarının genellikle %70-85 arasında kaldığı ve etkinliğin daha sınırlı olduğu görülmüştür. Ancak yüksek konsantrasyonlarda canlılık oranlarının tamamen düşmemesi, kombinasyonun daha çok hücre büyümesini baskılayıcı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. T24 mesane kanseri hücre hattında gerçekleştirilen MTT analizleri, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktlarının kombinasyon halinde uygulanmasının, doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını göstermiştir. Özellikle 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde gözlenen düşüşler, kombinasyonun sitotoksik etkinliğinin zaman bağımlı olduğunu ortaya koymaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda (250 µg/mL biberiye:500 µg/mL siyah üzüm çekirdeği ve 250 µg/mL biberiye:250 µg/mL siyah üzüm çekirdeği) 24 saatlik sürede canlılık %80 civarında seyrederken, 72 saatte ise %10–20'ye kadar düşmektedir. Bu sonuç, kombinasyonun güçlü bir antiproliferatif etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda da (örneğin 150 µg/mL biberiye:100 µg/mL siyah üzüm çekirdeği ve 200 µg/mL biberiye:100 µg/mL siyah üzüm çekirdeği), 72. saat sonunda canlılık oranlarının %5–10 seviyelerine kadar gerilediği görülmüştür. Bu durum, kombinasyonun düşük dozlarda bile kanser hücrelerine karşı etkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bireysel ekstrakt uygulamalarında gözlemlenen sınırlı sitotoksik etkiye kıyasla kombinasyonun hücre canlılığını daha belirgin şekilde düşürmesi, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktları arasında potansiyel sinerjik bir etkileşim olabileceğine işaret etmektedir.

Biberiye ekstraktlarının antibakteriyel etkisi rosmaridifenol, karnosol, epirosmanol, rosmanol, izorosmanol, karnosik asit ve rosmarinik asit gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır [37]. Literatürde biberiye esansiyel yağının *S. aureus* (MIC: 3,9 µL/mL) ve *P. aeruginosa* (MIC: 7,8 µL/mL) gibi klinik öneme sahip bakterilere karşı güçlü inhibisyonu rapor edilmiştir [38]. Yapılan çalışmalarda biberiyenin *Candida albicans, S. aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus mutans* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmalarına ve biyofilm oluşumuna karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Biberiye en güçlü aktiviteyi sırasıyla 0,78 mg/mL ve 3,13 mg/mL MIC ve minimum mikrobisidal konsantrasyon (MMC) ile *C. albicans*'a karşı göstermiştir. Ayrıca *P. aeruginosa*'da 6,25 mg/mL'lik değerleri elde edilmiştir. *S. aureus, S. mutans* ve *E. faecalis* büyümeleri >25 mg/mL'de engellenmiş ancak mikrobisidal bir konsantrasyona ulaşılamamıştır. Çalışma ayrıca biberiyenin *C. albicans, P. aeruginosa, S. aureus* ve *S. mutans*'ın biyofilm oluşumuna karşı başarılı olduğunu da göstermiştir. Poli-mikrobiyal filmlerde *C. albicans*, diğer dört bakteri ile 48 saat boyunca kültürlenmiş ve 5 dakika boyunca biberiye ile işlenmiştir. Biberiye ile mikrobiyal büyümedeki en önemli azalma *C. albicans* ile *E. faecalis* ve *C. albicans* ile *P. aeruginosa*'da meydana gelmiştir [12]. Diğer bir çalışmada biberiyenin etanol ekstraktının MIC değerleri 0,39-3,13 mg/mL aralığında tespit edilmiştir. MBC (minimum bakterisidal konsantrasyon) değerleri ise MIC'lere eşit veya iki katı değerinde elde edilmiştir [39]. Farklı çalışmalarda biberiyenin metanol ve etanol ekstraktlarının etkinliği *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, B. cereus (Bacillus cereus), E. faecalis, C.*

albicans, V. fluvialis (Vibrio fluvialis) ve *V. damsela (Vibrio damsela)* dahil sekiz farklı türe karşı test edilmiştir. Karnosik asit varlığından dolayı metanol ekstraktı, bakteriyel büyümeye karşı daha yüksek oranda inhibisyon etkisi sağlamıştır [40-42]. Biberiye ekstraktının hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilere karşı yüksek inhibisyon oluşturması bu verileri destekler niteliktedir. Üzüm ekstraktları ile yapılan bir araştırmada *S. aureus, Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı güçlü antibakteriyel özellikler tespit edilmiştir [23]. Diğer bir çalışmada siyah üzüm çekirdeği ekstraktının antibakteriyel etkisi MIC testiyle farklı mikroorganizmalara karşı denenmiştir. *Klebsiella pneuminae*'ye karşı hiçbir etki tespit edilememiş, fakat patojenik türler *P. aeruginosa, E. coli, Bacillus* sp.*, S. aureus, E. faecalis* ve *C. albicans*'a karşı değişken inhibitör etkiler gözlemlenmiştir. Ayrıca bu ekstraktın Gram-pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu ve patojenik *C. albicans*'a karşı da etkili olduğu saptanmıştır [19]. Başka bir çalışmada, siyah üzüm çekirdeğinin metanolik ekstraktının *S. aureus* ve *S. haemolyticus*'a karşı antibiyofilm aktivitesi test edilmiş ve biyofilm oluşumunun metanolik ekstraktlar tarafından engellendiği gösterilmiştir [43].

Bu çalışmada biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktları hem Gram-pozitif bakteri olan *S. aureus* hem de Gram-negatif bakteri olan *E. coli* üzerinde belirli düzeyde antibakteriyel aktivite göstermiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, inhibisyon zonlarının oldukça sınırlı olduğu görülmekle birlikte, bazı kombinasyonlar bireysel uygulamalara göre daha yüksek etki yaratmıştır. *S. aureus* üzerinde en yüksek inhibisyonu, biberiye:siyah üzüm çekirdeği 3:1 kombinasyonu (7,87 ± 0,21 mm) göstermiştir. Bunu sırasıyla 1:1 (7,59 ± 0,10 mm) ve 1:2 (7,39 ± 0,12 mm) kombinasyonları takip etmektedir. Bu durum, biberiye ekstraktının antibakteriyel etkisinin siyah üzüm çekirdeği ile birlikte uygulanmasıyla sinerjik olarak artabileceğini göstermektedir. Tekli uygulamalara bakıldığında siyah üzüm çekirdeği ekstraktının (6,72 ± 0,18 mm), biberiye ekstraktına (6,37 ± 0,22 mm) göre daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. *E. coli*'ye karşı ise genel olarak daha düşük inhibisyon zonları kaydedilmiştir. Bunun Gram-negatif bakterilerin sahip olduğu dış membran yapısından kaynaklanan doğal direnç ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu bakımdan en güçlü etkinin biberiye:siyah üzüm çekirdeği 1:3 kombinasyonu (7,46 ± 0,25 mm) ile ortaya çıkması, yüksek üzüm çekirdeği ekstrakt oranının özellikle Gram-negatif bakterilere karşı daha avantajlı olduğunu işaret etmektedir. Bu bulgular, kombinasyonların etkisinin kullanılan ekstrakt oranına bağlı olarak değiştiğini ve her iki bakteri türü için ideal formülasyonun farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak; biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktlarının özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı daha güçlü bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre bazı kombinasyonların sinerjik etki oluşturduğu söylenebilir.

Ayrıca çalışmada biberiye, siyah üzüm çekirdeği ekstraktları tekil ve kombinasyon uygulamalarının *S. aureus* ve *E.coli* üzerindeki antibakteriyel etkileri MIC yöntemi ile de değerlendirilmiştir. Genel olarak hem bireysel bitki ekstraktlarının hem de kombinasyonlarının bakteriyel büyüme inhibisyonunda farklı düzeylerde etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktlarının tekli uygulamalarında, her iki bakteriye karşı MIC değeri 6,25 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu değerler, ekstraktların hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde benzer düzeyde etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bununla birlikte iki ekstraktın 1:1 oranındaki kombinasyonu ile MIC değerinin *S. aureus* ve *E. coli* için 3,125 mg/mL'ye düştüğü görülmüştür. Bu durum, iki ekstraktın eşit oranda birlikte kullanımının belirgin bir sinerjik etki sağladığını ortaya koymaktadır. Biberiye oranının baskın olduğu 3:1 kombinasyonunda, *S. aureus* üzerinde 3,125 mg/mL MIC değeri gözlenmiş olup, Gram-pozitif bakteriye karşı sinerjik etkinin korunduğu düşünülmektedir. Siyah üzüm çekirdeği oranının baskın olduğu 1:3 kombinasyonunda ise *E. coli* üzerinde MIC değerinin 3,125 mg/mL'ye düştüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde sinerji oluşumunun farklı ekstrakt oranlarına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Diğer kombinasyon oranlarında ise tekli uygulamalardaki etkinliğin korunduğu fakat ek bir sinerjik artış gözlenmediği belirlenmiştir. Çalışmamızın özgün yönü, bu iki farklı ekstraktın hem bireysel hem de birlikte kullanımının biyolojik aktivitelerinin incelenmiş olmasıdır. Özellikle sinerjik etki potansiyeli, literatürde sınırlı sayıda çalışılmış bir konu olup bu araştırma bu açıdan yeni katkılar sunmaktadır. Kanser ve diğer kronik hastalıkların toplum sağlığı üzerindeki yükünün artması, hastalıkların önlenmesine yönelik doğal kaynakların araştırılmasına olan ilgiyi artırmaktadır. Bu kapsamda, temel besleyici özelliklerinin yanı sıra antioksidan ve antibakteriyel gibi biyolojik aktiviteler gösterebilen doğal bileşenler, fonksiyonel gıda ve gıda takviyesi geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptir [44,45]. Fonksiyonel gıdaların tüketiciye besin sağlamanın ötesinde ek sağlık yararları sunabilmesi, bu ürünlere yönelik bilimsel araştırmaların daha fazla önem kazanmasına ve tüketici ilgisinin artmasına katkıda bulunacaktır.

5. SONUÇLAR

Son zamanlarda tüketicilerin doğal ve ekolojik ürünleri tercih etmesi nedeniyle tıbbi ve aromatik bitkilere ve bu bitkilerden elde edilen ekstraktlara olan ilgi artmaktadır. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği, içerikleri nedeniyle farklı çalışmalara konu olmaktadır. Bu çalışmada biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin etanolik ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı tespit edilmiş; biyolojik aktivitelerinden antioksidan, sitotoksik ve antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca sitotoksik ve antibakteriyel aktivite testlerinde bitkilerin etanolik ekstraktlarının hem bireysel olarak hem de kombinasyon şeklinde gösterdikleri aktiviteler test edilmiştir. Mevcut literatür bilgimiz doğrultusunda, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının T24 insan mesane kanseri hücre hattı ve HUVEC insan göbek kordonu ven endotel hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitelerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Toplam fenolik madde miktarı 5,69 ± 0,03 mg GAE/mL değeriyle biberiye etanolik ekstraktında; toplam flavonoid madde miktarı 3,09 ± 0,12 mg CE/mL değeriyle biberiye etanolik ekstraktında; antioksidan aktivite ise %93,90 ± 2,32 inhibisyon değeriyle siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktında, en yüksek miktarlar olarak tespit edilmiştir. Biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının farklı oranlarda karıştırılıp uygulanması sonucunda antibakteriyel aktivitede artış gözlenmiştir. Bu iki ekstraktın *Staphylococcus aureus*'a karşı en yüksek antibakteriyel aktivite biberiye:siyah üzüm çekirdeği (3:1) kombinasyonunda, *Escherichia coli*'ye karşı en yüksek antibakteriyel aktivite ise biberiye:siyah üzüm çekirdeği (1:3) kombinasyonunda elde edilmiştir. Sitotoksik aktivite sonuçlarına göre biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının HUVEC insan göbek kordonu ven endotelyal hücre hattı ve T24 insan mesane kanseri hücre hattında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, tekli ekstrakt uygulamalarında gözlemlenen sınırlı sitotoksik etkiye kıyasla kombinasyonun hücre canlılığını daha belirgin şekilde düşürmesi, biberiye ve siyah üzüm çekirdeği ekstraktları arasında potansiyel sinerjik bir etkileşim olabileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak bazı bitkisel bileşenlerin birlikte kullanımı, tek başına kullanımına kıyasla daha yüksek biyolojik aktivite gösterebilmektedir. Özellikle biberiye ve siyah üzüm çekirdeğinin birlikte kullanıldığında sinerjik etki oluşturabildiği gözlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda biberiye ve siyah üzüm çekirdeği etanolik ekstraktlarının HPLC, LC-MS/MS gibi yöntemlerle bileşen analizleri yapılarak bu bileşenlerin ayrı ayrı ve kombinasyon etkilerine bakılabilir. Farklı hücre hatları ve farklı bakteri türleri kullanılarak biyolojik etkinlik taraması yapılabilir. Ayrıca sitotoksik aktivite sonrası apoptoz tayini yapılarak hücre ölüm mekanizmaları araştırılabilir.

6. TEŞEKKÜR

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 2024-079).

7. KAYNAKLAR

1. Caili, F.U., Huan, S. & Quanhong, L.I. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Foods for Human Nutrition*, *61*, 70-77.
2. Kelleci, K., Ihlamur, M., Özkan, M. ve Abamor, E.Ş. (2024). *Momordica charantina* ekstraktının amfotericin b ve miltefosin ilaç kombinasyonları ile leishmania parazitleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, *39*(1), 1-7.
3. Malayoğlu, H.B. (2010). Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) antioksidan etkisi. *Hayvansal Üretim*, *51*(2), 59-67.
4. Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects—A Review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820-897.
5. Beşen, B.S., Karahan, L.E., Parlakyiğit, P., Kırılmış, C. ve Erdoğan, S. (2022). Bazı bitki kaynaklarının farklı çözgenlerde hazırlanan ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, *37*(2), 543-554.
6. De Macedo, L.M., Santos, É.M.D., Militão, L., Tundisi, L.L., Ataide, J.A., Souto, E.B. & Mazzola, P.G. (2020). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: A Review. *Plants*, *9*(5), 651.
7. Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G., Ferracane, R., Grosso, A., Aducci, P., Schininà, M.E. & Marra, M. (2015). Anti- proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PloS One*, *10*(7), e0132439.

8. Kakouri, E., Nikola, O., Kanakis, C., Hatziagapiou, K., Lambrou, G.I., Trigas, P., Kanaka-Gantenbein C. & Tarantilis, P. A. (2022). Cytotoxic effect of *Rosmarinus officinalis* extract on glioblastoma and rhabdomyosarcoma cell lines. *Molecules*, *27*(19), 6348.

9. Aydın, E.A. (2014). Meme kanseri tespitinde mikrodalgaların önemi ve kanserli/sağlıklı meme dokularının yapay zeka algoritmaları ile tanımlanabilmesi. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, *29*(2), 27-38.

10. Brindisi, M., Bouzidi, C., Frattaruolo, L., Loizzo, M.R., Tundis, R., Dugay, A., Deguin, B., Cappello, A.R. & Cappello, M.S. (2020). Chemical profile, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer effects of Italian *Salvia rosmarinus* Spenn. methanol leaves extracts. *Antioxidants*, *9*(9), 826.

11. Begum, A., Sandhya, S., Ali, S.S.A., Vinod, K.R., Reddy, S. & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *12*(1), 61-74.

12. Veenstra, J.P. & Johnson, J.J. (2021). Rosemary (*Salvia rosmarinus*): Healthpromoting benefits and food preservative properties. *International Journal of Nutrition*, *6*(4), 1.

13. Del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Marín, M.P., Del Río, J.A., Ortuño, A. & Ibarra, I. (2004). Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(16), 4987-4992.

14. Pizani, R.S., Viganó, J., De Souza Mesquita, L.M., Contieri, L.S., Sanches, V.L., Chaves, J.O., Souza, M.C., Da Silva, L.C. & Rostagno, M.A. (2022). Beyond aroma: A review on advanced extraction processes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and sage (*Salvia officinalis*) to produce phenolic acids and diterpenes. *Trends in Food Science & Technology*, *127*, 245-262.

15. Reuter, J., Jocher, A., Hornstein, S., Mönting, J. & Schempp, C. (2007). Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema *in vivo*. *Planta Medica*, *73*(11), 1190-1191.

16. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C.S. & Vojnov, A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, *40*(2), 223-231.

17. Ghasemzadeh Rahbardar, M. & Hosseinzadeh, H. (2025). Toxicity and safety of rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a comprehensive review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *398*(1), 9-23.

18. Niknami, E., Sajjadi, S., Talebi, A. & Minaiyan, M. (2020). Protective effect *of Vitis vinifera* (black grape) seed extract and oil on acetic acid-induced colitis in rats. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, *11*, 102.

19. Al-Taie, K.L.S. (2014). Antimicrobial effect of black grape seed extract. *Iraqi Journal of Science*, *55*(2A), 382-385.

20. Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F., Aradhya, M.K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J., Ware, D., Bustamante, C.D. & Buckler, E.S. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(9), 3530-3535.

21. Jo, J.Y., De Mejia, E.G. & Lila, M.A. (2006). Cytotoxicity of bioactive polymeric fractions from grape cell culture on human hepatocellular carcinoma, murine leukemia and non-cancerous PK15 kidney cells. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(10), 1758-1767.

22. Engelbrecht, A., Mattheyse, M., Ellis, B., Loos, B., Thomas, M., Smith, R., Peters, S., Smith, C. & Myburgh, K. (2007). Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3- kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Letters*, *258*(1), 144-153.

23. Abdel-Hamid, N., Abdel-Khalek, H., Mattar, Z., Abou-Taleb, K. & Ramadan, E. (2017). Screening of some Egyptian plant extracts for biological activity against some pathogenic bacteria. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, *25*(2), 377-386.

24. Grace Nirmala, J., Evangeline Celsia, S., Swaminathan, A., Narendhirakannan, R.T. & Chatterjee, S. (2018). Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. *Cytotechnology*, *70*, 537- 554.

25. Nassiri-Asl, M. & Hosseinzadeh, H. (2009). Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *23*(9), 1197-1204.

26. Albalawi, A., Alhasani, R.H.A., Biswas, L., Reilly, J. & Shu, X. (2017). Protective effect of carnosic acid against acrylamide-induced toxicity in RPE cells. *Food and Chemical Toxicology*, *108*, 543-553.

27. Seyrekoğlu, F. & Temiz, H. (2020). Effect of extraction conditions on the phenolic content and DPPH radical scavenging activity of *Hypericum perforatum* L. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *8*(1), 226-229.

28. Eroglu, E. & Girgin, S.N. (2021). A unique phenolic extraction method from olive oil macerate of *Hypericum perforatum* using DMSO: Assessment of *in vitro* anticancer activity, LC-MS/MS profile, total phenolic content and antioxidant capacity. *South African Journal of Botany*, *139*, 6-11.
29. Molan, A.L. & Mahdy, A.S. (2014). Iraqi medicinal plants: Total flavonoid contents, free-radical scavenging and bacterial beta-glucuronidase inhibition activities. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, *13*(5), 72-7.
30. Lim, F.P.K., Bongosia, L.F.G., Yao, N.B.N. & Santiago, L.A. (2014). Cytotoxic activity of the phenolic extract of virgin coconut oil on human hepatocarcinoma cells (HepG2). *International Food Research Journal*, *21*(2), 729-733.
31. Maltaş, E., Uysal, A., Yıldız, S. & Durak, Y. (2010). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. *Fresenius Environmental Bulletin*, *19*, 3094-9.
32. Abdel-Mohsen, A.M., Jancar, J., Massoud, D., Fohlerova, Z., Elhahdy, H., Soptz, Z. & Hebeish, A. (2016). Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 510, 86-99.
33. Ghouila, Z., Laurent, S., Boutry, S., Vander Elst, L., Nateche, F., Muller, R.N. & Baaliouamer, A. (2017). Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols from *Ahmeur Bouamer* grape seed extracts. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, *9*(1), 392-420.
34. Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, *65*(2), 158-163.
35. Peixoto, C.M., Dias, M.I., Alves, M.J., Calhelha, R.C., Barros, L., Pinho, S.P. & Ferreira, I.C. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, *253*, 132-138.
36. Pérez-Ortiz, J.M., Alguacil, LF., Salas, E., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S. & González-Martín, C. (2019). Antiproliferative and cytotoxic effects of grape pomace and grape seed extracts on colorectal cancer cell lines. *Food Science & Nutrition*, *7*(9), 2948-2957.
37. Nieto, G., Ros, G. & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, *5*(3), 98.
38. Harfouch, R.M., Darwish, M., Al-Asadi, W., Mohammad, A.F., Gharib, N.M. & Haroun, M. (2019). Antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Anthemis nobilis* widespread in the Syrian coast. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *12*(7), 3410.
39. Jarrar, N., Abu-Hijleh, A. & Adwan, K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *3*(2), 121-123.
40. Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M. & Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, *37*(2), 124-130.
41. Bernardes, W.A., Lucarini, R., Tozatti, M.G., Souza, M.G., Andrade Silva, M.L., da Silva Filho, A.A., Gomes Martins, C.H., Miller Crotti, A.E., Pauletti, P.M., Groppo, M. & Cunha, W.R. (2010). Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry & Biodiversity*, *7*(7), 1835-1840.
42. Vázquez, N.M., Fiorilli, G., Guido, P.A.C. & Moreno, S. (2016). Carnosic acid acts synergistically with gentamicin in killing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Phytomedicine*, *23*(12), 1337-1343.
43. Al-Mousawi, A.H., Al-Kaabi, S.J., Albaghdadi, A.J., Almulla, A.F., Raheem, A. & Algon, A.A.A. (2020). Effect of black grape seed extract (*Vitis vinifera*) on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus*. *Current Microbiology*, *77*(2), 238-245.
44. Yılmaz, B. ve Gürsel, A. (2023). Cilt kanseri tanısında tıbbi görüntüleri kıldan temizlemek için kullanılan iki yeni filtre. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, *38*(4), 1139-1149.
45. Özçelik, S. & Gör, R. (2024). The use of the Hıngedan (*Ferula pseudalliacea*) in the production of functional gluten-free biscuits. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, *39*(1), 145-156.