

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Althaea officinalis* L. BİTKİSİNİN KALLUS KÜLTÜRLERİNE UV
UYGULAMASI SONRASINDA ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

Mesut TURAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR**

BİNGÖL 2021

ÖNSÖZ

Gerek laboratuvar çalışmalarım, gerekse tez yazımı esnasında bilgisinden, tecrübesinden ve bilgeliğinden faydalandığım ve çalışmanın her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Çalışmanın antikanser aktivite ile ilgili kısımlarında desteğini esirgemeyen Dr. Arş. Gör. Gökhan DERVİŞOĞLU'na, arkadaşlarıma ve öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak sürekli yanımda olan aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Mesut TURAN
Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
1.2. Hücre Kültürü.....	4
1.3. Doku Kültürü.....	4
4. Bitki Hücre ve Doku Kültürünün Temelleri.....	5
4.1. Kallus Kültürü	6
1.5. Fenolik Bileşikler	7
1.6. Antimikrobiyal Aktivite	8
1.7. Disk Difüzyon Testi	9
1.8. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi	9
1.9. Bitkilerin Antikanser Aktivitesi	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12

3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Bitki Materyali	18
3.2. Sterilizasyon	18
3.3. Tohumların Çimlendirilmesi	19
3.4. Kallus Kùltürlerinin Oluşturulması	19
3.5. Kallus Kùltürlerine UV-C Uygulanması	20
3.6. Kalluslardan Metanol ve Etil Asetat Ekstraktların Elde Edilmesi	20
3.7. Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	20
3.8. Ekstraktların Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi	21
3.9. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Sterilizasyon ve Tohum Çimlenmesi ile İlgili Sonuçlar	23
4.2. Kallus Gelişim Oranı ve Kallus Ağırlığı İle İlgili Sonuçlar	25
4.4. Antikanser Aktivite Sonuçları	34
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

MS	: Murashige Skoog's
μ M	: Mikro molar
Ba	: 6-benzil Adenin
IBA	: İndol-3-bütirik asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
NAA	: α -Naftalen asetik asit
BAP	: Benzil amino pürin
°C	: Santigrat derece
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
MIC	: Minimal inhibisyon konstrasyonu
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
PC12	: Parkinson hastalığı hücre hattı
A549	: İnsan akciğer kanseri hücre hattı
HeLa	: Rahim ağzı kanseri hücre hattı
SK-Hep1	: İnsan hepatik adenokarsinom hücre hattı
MCF-7	: Michigan cancer Foundation-7
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
k562	: İnsan lösemi hücre hatları
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NaOH	: Sodyum hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
N	: Normalite
pH	: potansiyel hidrojen
μ mol	: mikromol

m	: metre
UV-C	: Ultraviyole C
cm	: santimetre
LB	: Brother sıvı besiyeri
μ l	: mikrolitre
mm	: milimetre
SH-SY5Y	:insan nöroblastoma kanser hücreleri
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
CO ₂	: Karbondioksit
WST-1	: Hücre proliferasyon reaktifi
μ g	: mikrogram
L	: litre
DMSO	: Dimetil sülfoksit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. Çimlenme ortamında gelişen <i>Althaea officinalis</i> L. bitkileri.....	24
Şekil 4.2.1. Yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar.....	26
Şekil 4.2.2. Yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar.....	28
Şekil 4.2.3. UV-C uygulanmasından 48 saat sonra kalluslardan görünün.....	30
Şekil 4.4.1. Yaprak kalluslarına ait etil asetat ekstarktının SH-SY5Y insan Nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi.....	33
Şekil 4.4.2. Yaprak sapı kalluslarına ait etil asetat ekstraktının SH-SY5Y insan Nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi.....	34
Şekil 4.4.3. Yaprak kalluslarına ait metanol ekstraktının SH-SY5Y insan Nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi.....	35
Şekil 4.4.4. Yaprak sapı kalluslarına ait metanol ekstraktının SH-SY5Y insan Nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi.....	36

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.4.1. Kallus gelişimini sağlamak için MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ve konsantrasyonları... ..	18
Tablo 3.7.1. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar.....	20
Tablo 4.1.1. <i>Althaea officinalis</i> L. tohumlarının yüzey sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon süresinin tespit edilmesi.....	22
Tablo 4.1.2. <i>Althaea officinalis</i> L. tohumlarının çimlenmesi için en uygun besi yeri ve katılaştırıcı maddenin belirlenmesi.....	23
Tablo 4.2.1. Yaprak sapı eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları.....	25
Tablo 4.2.2. Yaprak eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları.....	27
Tablo 4.2.3. Kök eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları.....	29
Tablo 4.3.1. Yaprak ve yaprak sapı kalluslarının metanol ve etil asetat Ekstraktlarının antimikrobiyel aktivite sonuçları.....	31

***Althaea officinalis* L. BİTKİSİNİN KALLUS KÜLTÜRLERİNE UV UYGULAMASI SONRASINDA ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Malvaceae familyası içerisinde yer alan *Althaea officinalis* L. alternatif tıpta yaygın olarak kullanılan bir bitkidir. Bu çalışmanın amacı *A. officinalis* bitkisini *in vitro* ortamda geliştirip, bitkinin farklı kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullanıp, uygun bir kallus rejenerasyon protokolü oluşturduktan sonra, elde edilen kalluslara UV-C uygulamasının ardından, kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal ve antikanser aktivitelerinin araştırılmasıdır. Tohumlarda en etkili sterilizasyonun, %100 oranında, 30 dakika süre ile ticari çamaşır suyunda bekletmek olduğu tespit edilmiştir. Tohumlarda çimlenme gücünün olduğu görülmüş, bu nedenle farklı besin ortamları ve farklı katılaştırıcı maddeler kullanılarak uygun bir çimlenme protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çimlenme ortamları olarak MS + plant agar, MS + gelrite, Gamborg-B5 + plant agar ve Gamborg-B5 + gelrite kullanılmıştır. En etkili çimlenmenin %28 oranında MS + gelrite kullanılarak hazırlanan besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. Steril ortamda çimlendirilen *Althaea officinalis* L. bitkilerinin yaprak, yaprak sapı ve kök kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar farklı dozlarda 2,4-D (1, 2 mg/l) ve BAP (0,25, 0,50, 0,75 mg/l) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. En etkili kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı, yaprak sapı eksplantlarında, %100 oranında ve 516,24±0,48 mg ağırlığında, 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Kallus gelişimi açısından en verimsiz eksplantın kök olduğu gözlenmiştir. Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kalluslar UV-C uygulamasına maruz bırakılmıştır. Metanol ve etil asetat ekstraktlarının 1 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanarak, 7 farklı gram pozitif (*Bacillus subtilis* ATCC 6337, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IM 622, *Bacillus cereus* EMC 19, *Staphylococcus aureus* 6538 P, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348), 9 farklı gram negatif (*Salmonella typhimurium* NRRLE 4413, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Klebsiella pneumoniae* EMCS, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* FMC II, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50070, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* ATCC 13311) bakteri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi, disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kullanılan her üç ekstrakt konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı belirlenmiştir. Ekstraktlarının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Yaprak ve yaprak sapı kalluslarına ait etil asetat ekstraktlarının 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/ml dozlarının antikanser aktivitesinin olduğu, Yaprak ve yaprak sapı kalluslarına ait metanol ekstraktlarının ise kullanılan bütün dozlarda (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 µg/ml) antikanser aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Althaea officinalis* L., kallus, ekstraksiyon, antimikrobiyal aktivite, antikanser aktivite.

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER ACTIVITIES OF *Althaea officinalis* L. EXTRACTS OBTAINED AFTER UV APPLICATION TO CALLUS CULTURES

ABSTRACT

Althaea officinalis L., a plant of the Malvaceae family, is widely used in alternative medicine. The aim of this study is to cultivate the *A. officinalis* plant *in vitro*, create an appropriate callus regeneration protocol and to investigate the antimicrobial and anticancer activities of methanol and ethyl acetate extracts of calli after UV-C application, using different parts of the plant as an explant source. It is very important to ensure the surface sterilization of the plant material in *in vitro* studies. For the surface sterilization of the seeds commercial bleach is used for 10, 15, 20, 25, 30 minutes. We found that the most effective sterilization is obtained soaking the seeds in 100% commercial bleach for 30 minutes. We observed that the sterilized seeds have difficulties of germination, so we aimed to develop a suitable germination protocol by using different nutrient media and different solidifying agents. MS + plant agar, MS + gelrite, Gamborg-B5 + plant agar and Gamborg-B5 + gelrite were used as germination media. The most effective germination was seen in the nutrient medium prepared using 28% MS + gelrite. Leaf, petiole and root parts of *Althaea officinalis* plants germinated in sterile environment were used as explant sources. Explants were cultured in MS medium containing different concentrations of 2,4-D (1.2 mg/l) and BAP (0,25, 0,50, 0,75 mg/l). The most effective callus growth rate and callus weight is observed in petiole explants MS nutrient medium containing 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP at a rate of 100% with the weight $516,24 \pm 0,48$ mg. The most inefficient explant in terms of callus development was the root. Calli obtained from leaf and petiole explants were exposed to UV-C treatment for 15 minutes from a distance of 15 cm. After the UV-C application, the calli were kept in the climate cabinet for 48 hours under suitable conditions. Extractions of calli were carried out using methanol and ethyl acetate solutions. 1 mg/ml, 5 mg/ml and 10 mg/ml solutions of methanol and ethyl acetate extracts were prepared and their antimicrobial activity on bacteria was investigated using the disc diffusion method for 7 different gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC 6337, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Bacillus subtilis* IM 622, *Bacillus cereus* EMC 19, *Staphylococcus aureus* 6538 P, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348) and 9 different gram-negative (*Salmonella typhimurium* NRRLE 4413, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Klebsiella pneumoniae* EMCS, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* FMC II, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50070, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica* ATCC 13311) bacteria. None of the three extract concentrations used had any antimicrobial activities. The anticancer activities of the extracts on SH-SY5Y human neuroblastoma cells were studied using the WST-1 viability kit. The 1000, 500, 250, 125, 62,5 μ g/ml concentrations of ethyl acetate extracts of leaf and petiole calli have anticancer activity. The methanol extracts of leaf and petiole calli have anticancer activity at all concentrations (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 μ g/ml).

Keywords: *Althaea officinalis* L., callus, extraction, antimicrobial activity, anticancer act.

1. GİRİŞ

Bilimsel adı *Althaea officinalis* L. olan hatmi çiçeği; beyaz, sarı, pembe ve mor renklerde çiçeklere sahip olan gökkuşağı gibi farklı renklerle kendini belli ettiren bir bitkidir. Uzun ömürlü ve otsu bir bitki olan *A. officinalis* yoğun olarak Akdeniz, Kuzey Afrika, Fransa, İngiltere, Balkanlar, Güneydoğu, Orta Asya ve Rusya da bulunan geniş bir dağılıma sahiptir. Deniz kenarlarında, tuzlu bataklıklarda, nemli çayırarda ve gelgit kıyılarında yetişebilmektedir (Altan 2001). Ayrıca dağlık bölgede *A. officinalis*'in doğal rejenerasyonu ve geleneksel yayılımı sınırlandırılmıştır. Tohumlar yoluyla çoğalma, aynı zamanda, zayıf çimlenme ve fidenin doğal koşullarda ölümü nedeniyle yeterli sayıda dikim stoku üretiminde çok etkili değildir. Şimdiye kadar, bu türün yenilenmesi için verimli bir kültür sistemi hakkında ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, kitlesel çoğaltıma ve ikincil metabolit üretimi için verimli bir bitki rejenerasyon protokolünün geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Şifalı bitkiler içerisinde yer alan hatmi (*Althaea officinalis* L.) halk tıbbında önemli bir yere sahiptir (Bodeker, et al. 2002).

Halk arasında gül hatmi, deve gülü, silindir çiçeği olarak da bilinmektedir. Hatmi bitkisinin gövde kısmı dik ve tüylü bir yapıda olup, hava değişimlerine karşı oldukça dayanıklıdır. Hatmi çiçeğinden faydalanmak için çayı yapılabileceği gibi lapa şeklinde vücudun dış kısmına da uygulanabilir. Hatmi çayı sıcak bir şekilde içilebileceği gibi soğuk olarak da tüketilebilir. Ancak her iki durumda da çay taze olarak hazırlanmalıdır. Eczanelerde bulunabilen bu ürünün doktor tavsiyesi ile alınması önerilmektedir (Elmastas vd. 2004; Deshpande et al. 2010).

Hatmi bitkisiden doğru bir şekilde faydalanabilmek için uygun şekilde tüketilmesi gerekir. Kaynamış suyu bir fincana doldurduktan sonra bir tutam hatmi ilave edilir. İyi bir karıştırmanın ardından fincanın ağzı kapatılarak 3 dakika kadar demlenmeye bırakılır. Bu sürenin sonunda çayın vakit kaybetmeden sıcak bir şekilde tüketilmesi tavsiye edilir (Deshpande et al. 2010). Hatmi grip, öksürük gibi rahatsızlıklarda enfeksiyonlara karşı

ağrıları giderici, diüretik etkili, göğüs yumuşatıcı ve koruyucu, inatçı öksürüklerin geçmesinde bağışıklık sistemini güçlendirici, kilo verdirici, cilt yaralarını yumuşatıcı, koruyucu ve yara iyileştirici, öksürük nedeni ile solunum yolu tahribatlarını giderici olarak kullanılmaktadır. Dünyada birçok ülkede halk arasında bitkinin kök, yaprak ve çiçekleri farklı tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Elmastas vd. 2004). Yurtdışında ve ülkemizde *A. officinalis*'in değişik preparatları mevcuttur.

Yurtdışında hatmi bitkisinin tek ya da karışım halindeki preparatları bulunsa da, ülkemizde sadece karışım halindeki preparatları mevcuttur. Yurtdışında ticari olarak satılan preparatları üst solunum yolu hastalıkları ve dermatolojik hastalıklarda kullanılırken, ülkemizdeki preparatlar ise gastrointestinal sistem ve üriner sistem hastalıklarına karşı kullanılmaktadır (Faisal et al. 2007). Ülkemizde ki aktarlarda “hatmi” adı altında bitkinin farklı kısımları paketlenmiş veya açık bir şekilde satılmaktadır. Tüm dünyada ve ülkemizde de çok büyük bir öneme sahip olan bitkiler her alanda çok aktif bir şekilde kullanılmaya başlanılmıştır. Bu gelenek çok eski zamanlardan günümüze kadar gelmektedir. Eski çağlardan beri tıbbi ve aromatik bitkiler tedavi amaçlı olarak kullanılıyorlardı ancak bitkilerin içeriği hakkında geniş bir bilgi birikimi mevcut değildi. Sadece bitkilerin faydalı olduğu belirtiliyor, bitki içeriği hakkında her hangi bir bilgiye değinilmiyordu. Bitkiler kimya, biyoloji, eczane, tıp ve biyoteknoloji alanlarında çok büyük bir öneme ve kullanım alanına sahiptir. Araştırılan bitkiden maksimum verim alabilmek için öncelikle onun iyi araştırılması, ardından ona yakın türlerin araştırılması gerekir (Al-Snavi 2013). *Malvaceae* familyasında yer alan hatmi çiçeği (*A. officinalis*) genellikle ılıman yerlerde yayılış göstermektedir. Dünyada Avrupa, Asya ve Amerika da dağılım gösteren hatmi çiçeğinin 20'ye yakın türü mevcuttur. Bunlardan *A. officinalis* ülkemizde ve doğal ortamlarda en çok bulunanı ve tıbbi olarak da en çok kullanılanıdır. Bitkinin kök, gövde ve yaprağı tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Hatmi çiçeğinin kökleri tıpta sakinleştirici ve öksürük dindirici olarak geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda hatmi çiçeğinin antibakteriyel etkisinin olduğu da tespit edilmiştir (Akgül vd 2018).

Müsilaj içeriği sayesinde ağız ve boğaz mukozasının tahrişinde, bunlarla ilişkili olan kuru öksürük, hafif gastrit, deri yanıkları ve böcek ısırığı tedavilerinde ve aynı zamanda iltihaplama, ülser, apseler, yanıklar, kabızlık gibi rahatsızlıklarda kullanılarak geleneksel tıpta geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu tıbbi amaçlarının yanı sıra gıda sektöründe de

kullanılmaya başlanmıştır (Khan et al.2019). *A. officinalis* bitkisinin kök kısmından yararlanarak içeriğinde yer alan bileşenlerden faydalanılıp, Türk lokumuna yeni bir deneyim ve daha farklı bir lezzet kazandırılmaya çalışılmıştır. *A. officinalis*'in kök kısımlarından faydalanılmış lokuma uygunluğu ve lokumun kalite özelliği üzerine etkileri incelenmiştir. Bitkiler önemli bir ilaç kaynağıdır ve insan sağlığı açısından önemli bir rol oynamaktadır. Son birkaç yılda, tıbbi bitkilerin sağlık sistemine yönelik çalışma ve kullanımına olan ilgi yeniden artmıştır (Ali Şah vd. 2011). İlaç endüstrileri tarafından giderek artan talebi karşılamak için sınırlı ölçekli tarım arazilerinde ve yetersiz ikmal girişimleriyle birlikte, büyük ölçekli ve sınırsız sömürü nedeniyle, tıbbi açıdan önemli bitki türlerinin stokları tehlikeydedir (Babaoğlu, vd. 2001).

1.1. *Althaea officinalis*'in Genel Faydaları

Halk arasında şifalı bitkiler olarak adlandırılan ve gelişen teknolojiye rağmen, geleneksel tıpta kullanılan bitkiler hayatımızın vazgeçilmezlerinden olmaya devam etmektedir. Her geçen gün yeni özelliklerinden yararlandığımız bitkilerden sadece biri olan *A. officinalis*'in diğer ismiyle hatmi çiçeğinin sadece yararlarından bazıları şunlardır; Barsak mikrobiyomunun oluşumunu ve güçlenmesini sağlar, saç uzamasına yardım eder, saç doğal ve güzel bir görünüm sağlar. Görüşü kuvvetlendirir. Yağları eriterek vücut ağırlığının düzenlenmesine yardımcı olur, egzersiz esnasında performansı artırır, susuzluk hissini giderir (Baytop, 1984; Diplock, 1998). Antibiyotik ve antivirütik özelliklerinden dolayı vücutta oluşmuş olan iltihabı kurutur. Cinsel performansı artırır. Menapoz esnasında görülen septomların düzene girmesinde etkilidir. Deride oluşmuş yaraları iyileştirir. Ciltte meydana gelen kırısklıkları, çilleri ve kahverengi lekeleri ortadan kaldırır. Cildi nemlendirir. Hemoroid tedavisinde kullanılır. Sakinleştirici etkiye sahip olmakla birlikte, yorgunluk ve bitkinlik hissini ortadan kaldırır. Kan değerlerinin normalleşmesinde etkilidir. Öksürüğü ve bronşiti tedavi eder, balgam söktürücüdür. Adele ve baş ağrılarını giderir. Sinir sistemini düzenleyerek uykusuzluğu önler (Diplock, 1998). Sertleşmiş karaciğerin yumuşamasını ve kendini yenilemesini sağlar, kan şekerini düzenleyerek, kan şekeri düzeyinin sabitlenmesine yardımcı olur. Sindirim sistemi ve mide rahatsızlıklarının tedavisine yardımcı olur. Yüksek tansiyonun düşürülmesinde etkili olduğu gibi huzursuzluğu da giderir. Böbrek faaliyetlerini geliştirir. Kanserin önlenmesi ve tedavi edilmesinde kullanılır. Hücre duvarının yeniden oluşumunu sağlar. Ürik asit ve

kolesterolün suda çözünmesini sağlayarak vücuttan atılmasına yardımcı olur. Salgı bezlerini uyarak hormon salımını teşvik eder.

Vücutta ki atıkların ve zehirli maddelerin suda çözünür hale gelerek vücut dışına atılmasına yardımcı olur, kan dolaşımını hızlandırır. Metabolizmayı uyarıcı etkisi vardır. Kalp atışını düzenler. Kanın temizlenmesini sağlar. Deriye dışardan uygulandığında antimikrobiyal aktivite özelliği sayesinde koruyucu etki sağlar (Baytop, 1984).

1.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü hücrelerin belirli bir kontrol dahilinde uygun koşullar altında yetiştirilmesidir. Hücre kültürü yöntemi dikkat gerektirdiği kadar ortamın steril olmasını gerektiren bir yöntemdir. Bu nedenle kabine alınan bütün malzemelerin alkol ile iyice steril edildikten sonra kabin içine alınmalı ve kullanılan aletlerin tek kullanımlık olmasına dikkat edilmelidir. Hücre kültürü ökaryotik hücrelerin ve hayvan hücrelerinin culture alınması için kullanılır. Hücre kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar günümüzde çok popüler araştırma konularında biri olup, araştırmaların çok önemli bir kısmını kapsamaktadır. Hücre kültüründe belirli bir hücreden çoğaltılan hücreler kullanılarak farklı işlemler yapılabilir, canlı ortamda yapılması zor olan denemeler oluşturabilir ve buradan yola çıkılarak sonuçlar elde edilebilir. Hayvan hücre kültürü yöntemleri 19. yy ortalarından itibaren laboratuvarlarda uygulanmaya başlanmıştır (Han et al. 1991).

1.3. Doku Kültürü

Steril ortam sağlandıktan sonra küçük doku ve organ parçalarının uygun besin ortamlarında yetiştirilmesine doku kültürü denir. Son zamanlarda, doku kültürü teknolojisi, başarılı mikro çoğaltma ve bitki türlerinin iyileştirilmesi için bitki bilimlerinde rakipsiz bir tanınma elde etmiştir. Bu tanınma da ticari uygulamalara yol açmıştır. Tıbbi bitkilerin mikro üretimi birtakım bitkilerde bildirilmiştir. Doku kültürünün gelişimi 1838 yıllarına dayanır, ülkemizde ise bu gelişim ise 1970 yıllarında başlamıştır. Daha sonra 1973 yılında ilk olarak bitki doku kültürü laboratuvarı Ankara üniversitesinde açılmış ve doku kültürü ile ilgili çalışmalar başlamıştır (Rahavan, 1980). Bitki doku kültürünün amacı genetik çeşitlilik sağlamak ve yeni çeşit oluşturmaktır. Bitki doku kültürü ile bitki çoğaltımı kolay ve

hızlıdır. Bu özelliğinden yararlanarak farklı bitki çeşitlerini daha hızlı ve çabuk elde etmek, ayrıca kaybolan türlerin korunmasını sağlamak içinde bu yöntemden yararlanılır.

Doku kültürü işleminde özellikle kullanılan besi yerinin bakteriler ile içli dışlı olması ve kimyasal maddelerin zararı büyük tehlike olarak görülmektedir. Bundan dolayı bu malzemelerin hazırlanması ve seçiminde titiz olunması gerekmekte ayrıca kullanılacak eşyaların besi yeri ile teması olacağından steril ve temiz olmalarına dikkat edilmelidir. Gelişmiş ülkelerde doku kültüründen üretim, ticari fayda olarak kullanılmaktadır. Bunlardan öncelikle generatif ve vegetatif üretim yöntemleri zor ve bulunmayan bitkilerin üretilmesi ve temiz parazitlerden arınmış bitkileri elde edilmesidir. Doku kültürünün uygulanmadan önce belirli aşamalar yapılması gerekir. Ön hazırlık burada besin ortamlarının ve sterilizasyon işlemlerinin gerçekleştiği yöntemdir. Burada otoklav, etüv, hasas terazi, cam malzemeler, buzdolabı ve kimyasal malzemeler yer almaktadır. Diğer aşaması olan kesim odasında steril kabinlerin yer aldığı ve bitkilerin steril yapay besin ortamların alındığı bölgedir (Bigot 1987).

İklim odasında ise bitkilerin yapay besin ortamlarına alındıktan sonra gelişiminin sağlanması için, bitkiden bitkiye farklılık göstermekle beraber farklı çevre koşullarına ihtiyaç duyarlar. Günümüzde hızla çoğalan nüfusla birlikte tarımsal ürünlere olan ihtiyaçta doğal olarak çok fazlalaşmıştır. Bundan dolayı tarımsal üretimde de yenilikler ortaya çıkmıştır. Son yıllarda tarımsal biyoteknoloji deki hızlı gelişmeler sayesinde bir viraja girilmiş yüksek ve kaliteli ürünler ortaya çıkarılmıştır. Burada amaç az maliyet çok ürün ile maksimum seviyede ve hızlı bir şekilde ürün elde etmektir (Rahavan, 1980)

4. Bitki Hücre ve Doku Kültürünün Temelleri

Bitki doku kültürü, bitkinin mikroorganizmalardan arındırılmış doku ve organlarını kullanarak, kontrollü şartlar altında kültüre alınmasıdır. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan besin ortamlarının o bitkinin beslenip, gelişip ve büyümesi için gerekli tüm maddeleri sağlanması gerekir. Temel olarak büyük ve küçük elementleri, vitaminler, diğer organik bileşikler, bitkinin büyüme düzenleyicileri, karbon kaynağı ve bazı jelleştirici maddelerden oluşur (Faisal, et al. 2003). Laboratuvar ortamında kullandığımız eksplantların yüzeyinin sterilizasyonu yani mikroplardan temizleme ve arındırma işlemi kültür çalışmalarında çok önemli bir yere sahiptir. Çünkü mikroorganizmalar doku kültürü

ortamlarında eksplantlardan çok daha hızlı bir şekilde büyür ve kültürün başlatılmasını çok ciddi bir şekilde etkileyebilirler (Gudej, 1991).

Bunu önlemek için gümüş nitrat, cıva klorür, etanol, bromlu su, hidrojen peroksit antibiyotikler ve fungusitler gibi birçok sterilant, steril eksplantlar elde etmek için kullanılmaktadır. Bu kullanılan maddelerin canlılık üzerinde yan etkisinin olmamasına dikkat edilmesi gerekir. Kültür besin ortamına ilave edilen birleşenler sadece besin maddesi olmadığı bunun yanında büyüme ve farklılaşma sürecinde çok önemli bir yere sahip olabileceği dikkate alınmalıdır (Giugliano,2000). Yapılan çalışmalarda kullanılan bitki türüne ve çoğaltımın amacına bağlı olarak bitkinin kök, gövde ve yaprak kısımlarından yani hemen hemen bütün kısımlarını başlangıç meteryalı olarak kullanılabilir. Çok fazla bir şekilde kullanılan eksplant tipleri arasında sürgün uçları, izole yaprak parçaları, boğum, hipokotil veya kök segmentleri bulunmaktadır (Han, et al. 1991). *In vitro* kültür için eksplant seçimi, uygun bir kültür besin ortamı ve çevre koşullarının seçimi, kallus izolasyonu ve bakımı açısından bu üç madde önemli bir yere sahiptir. Doku kültürü çalışmalarında kallus gelişimini sağlamak için kök, gövde, yaprak veya tohum gibi bitki kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılabilir ancak doku kültürü çalışmalarında ilk adım kullanılan eksplantın yüzey sterilizasyonunu gerçekleştirmektir (Hoareau, et al. 1999).

1.4. Kallus Kültürü

Kök, gövde ve yaprak gibi organlardan alınan küçük parçaların kallus oluşturmak için besin ortamlarına konulmasıyla yapılan bir yöntemdir. Diğer bir deyişle organize olmamış parankima hücrelerinin oluşturduğu kitlesel bir yapıdır. Bitkilerin açılan yaralarının onarılması için o kısımdaki hücrelerin farklılaşarak, yara dokusu oluşturması ile oluşur. Ayrıca kışın ağaçların veya başka bitkilerin fazla su alıp çürümesini önleyen karbonhidratlı maddedir. Kallus oluşan yara dokusunu kapatarak, mikroorganizma ve parazitlerin bitkiye girişini engellediği gibi bitkinin su kaybedip kurumasını da önler *In vitro* koşullarda ise kallusların oluşturulması eksplantlar üzerinde oluşan yaralardan besin ortamına katılan bitki büyüme düzenleyicilerinin eksplant içerisine girmesi sonucu oluşurlar. Kallus oluşumu için bitkinin tohum, gövde, yaprak veya depo organları yada meyveleri dezenfekte

edildikten sonra kullanılabilir. Laboratuvar ortamında kallus gelişimi sağlandıktan sonra gelişen kalluslar kullanılarak yeni bitkiler elde edilebilir (Yağcı vd. 2008).

In vitro şartlarda kallus oluşumu için kallus geliştirme ortamının hazırlanması gerekir, hazırlanan bu besi ortamında inorganik amonyum, nitrat, makroelementlerden, fosfor, sodyum, magnezyum, kükürt, kalsiyum, mikroelementlerden ise: demir, çinko, mangenez, bor, bakır, kobalt ve iyot bulunmalıdır. Organik bileşiklerden ise: şekerler, vitaminler, hormonlar, amino asitler, organik asitler ve uygun dozlarda bitki büyüme düzenleyicilerinin ilave edilmesi gerekmektedir Çevre şartlarından sıcaklığın, ışık yoğunluğunun, ışıklandırma süresinin, ışık kalitesinin, nem ve karbondioksitin uygun bir şekilde ayarlanması gerekmektedir. Son yıllarda kallus kültürleri sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bunun nedeni kallus gelişimi için gerekli şartların sekonder metabolitlerin üretimi için yeterli olması ve kallusun farklı bir içeriğe sahip olmasıdır (Pierik, 1987).

1.5. Fenolik Bileşikler

Doğal antioksidanların en önemli grubunu fenolik bileşikler oluşturur. Genellikle bitkilerin kendilerini koruma amacıyla tehdidin şiddetine göre değişmekle birlikte, bitkide varlığını devamlı olarak gördüğümüz, primer metabolitlerden sentezledikleri ikincil metabolitler bulunmaktadır. Bitkiler yapılarındaki fenolik bileşikler ve bunların türevleri sayesinde kendilerine özgü koku, renk ve tat barındırırlar. Böylece tarih boyunca organizmaların tükettikleri bitkisel kaynakların renk oluşumunda ve bu rengin cezbediciliğinde, koku olarak kokunun çekiciliğinde ve tat olarak kendine has bir lezzetin oluşumu ile organizma açısından tüm bileşenleri ile çekici olmuştur. Tıpkı arılarda olduğu gibi nektar özütleri renk, koku gibi özellikler açısından insanlarda da aynı özellikler cezbedici olurken bu ürünlerin tüketimi vücuda faydaları nedeni ile etnobotanik olarak kullanılmaya başlanmış ve günümüzde de halk arasında belli hastalıklara belli bitkilerin kullanılması duysal özellikler vasıtasıyla olmuştur (Eren 2011). Ancak son yıllarda bu cezbediciliği sağlayan fenolik bileşiklerin çok etkin birer bileşik grubu olduğu ve hem önleyici hem de tedavi edici özellikleri gün yüzüne çıkartılmıştır. Bu sebepten ötürü bunlar daha kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Son zamanlarda gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin araştırılması kanser üzerindeki etkisi anlaşılıp bu yönden olumlu avantajlar sağladığı anlaşılrsa da bunun

tersi olan çalışmalarda görülmektedir. Ama çalışmaların pozitif yönde olması bu dezavantajların göz ardı edilmesini sağlamıştır (Pehlivan ve Güleriyüz 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşikler yoğun bir şekilde araştırılmış ve bunların insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu saptanmıştır. Özellikle kanserin görülme sıklığını azalttığı yönünde epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Bazı çalışmalar her ne kadar flavonoidlerin kanserojen olduğunu savunsa da birçok çalışma bunların antimutajenik ve antikarsinojenik olduklarını ortaya çıkarmıştır. Flavonoidler antikarsinojenik, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (URL-3 2013).

1.6. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları öldüren veya üremesini engelleyen ve ayrıca mikroorganizmalardan elde edilen ve memeli organizmasına zararı olmayan doğal veya sentezlenmiş maddelerdir. Kimyasal yapıları belli olan ve sentetik olarak elde edilen maddelere kemoterapötik denilmekte doğal olanları ise antibiyotik olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde antimikrobiyal maddelerin sentetik veya yarı sentetik yöntemlerle elde edilmesi mümkün olduğundan, tedavide kullanılan kemoterapötik ve antimikrobiyal maddeler için genel olarak antibiyotik adı verilmiştir. Konağa zarar vermeden mikroorganizmaların çoğalmasının engellenmesi ve seçici toksik etki antimikrobiyal bir maddede bulunması gerekli en önemli özelliktir. Mikroorganizmalar, organizmalarda hastalık yapmalarının yanında gıda zehirlenmelerine, gıdalarda bozulmalara ve toksin oluşumuna neden olabilirler. Bu sebepten ötürü gıdaların korunması ve gıdalardan kaynaklanan hastalıkların engellenmesinde antimikrobiyal maddeler kullanılır (Kırbağ vd. 2006). Antimikrobiyal olarak kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı bakteriler kendilerini koruyacak mekanizma oluşturmaktadırlar. Antibiyotiklerin kontrolsüz ve fazla tüketildiği gelişmekte olan ülkelerde dirençli suşların oluşmasına neden olmaktadır. Antibakteriyal ilaçların etki ettiği belirli bölgeler vardır. Antimikrobiyal maddelerin etki mekanizması da temel olarak bu bölgelere yöneliktir. İnsanlık tarihi boyunca birçok enfeksiyon hastalığı bitkilerle tedavi edilmiştir, Bitkilerdeki antimikrobiyal bileşenler, kullanılan mevcut antimikrobiyallerden farklı mekanizmalarla bakteriyel

gelişimi inhibe etmekte bu sayede de dirençli mikrobiyal suşların tedavi edilmesinde önemli klinik belirtiler elde edilmektedir (Benli vd. 2005).

1.7. Disk Difüzyon Testi

Laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptamasında en fazla kullanılan yöntemlerden biridir. Maliyet olarak ucuz ve uygulanması basit olan bu yöntem zamanla daha çok geliştirilmiştir. Bu test yönteminde kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın ona odaklayıp difüze olması mantığına dayanmaktadır. Bu nedenle; belli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmanın yoğun bir şekilde entegre edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Bu inkübasyon sağlandıktan sonra ilacın inhibitör yoğunluklarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez (Sezgin vd. 2019). Burada mikroorganizma, uygulanan ilaca ne kadar duyarlı ise diskin etrafında oluşmasını beklediğimiz zon çapları da o kadar geniş olur. Sonrada bu oluşan zonlarının çapı mm şeklinde ölçülüp, standart olan tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve kullanılan ajanlara karşı duyarlılık durumu tespit edilir (Hortaç vd. 2016).

1.8. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Dünya üzerinde tıbbi amaçlı olarak yaklaşık 20.000 bitki türünün kullanıldığı Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmiştir. Ülkemiz florası gerek içerdiği tür sayısı, gerekse endemik bitkiler açısından önemli bir gen merkezidir. Avrupa kıtası 12 bin bitki türü içermesine karşın, ülkemiz 11700 civarında bitki türü bulunmakta olup bunun 3600 kadarı endemiktir. Ülkemiz de tıbbi amaçlı olarak kullanılan bitkilerin sayısı tahmini olarak 500 ile 1000 civarındadır (Baytop, 1984).

Ülkemizde yetişen tıbbi ve aromatik bitkilerden 200 kadarının ihrac potansiyelinin olduğu da bilinmektedir. Günümüzde mikroorganizmalar tedavi amaçlı olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte ve artık tedaviye yanıt vermemektedir. Bu nedenle yeni kuşak antibiyotiklerin üretilmesi ve üretilen bu yeni kuşak antibiyotiklerin maliyetinin düşük olması gerekmektedir. Bu nedenle yeni antimikrobiyal maddelerin keşfedilmesi ve yapılarının araştırılması gerekmektedir. Tıbbi ve aromatik amaçlı

kullanılan bitkiler, üretilmesi planlanan yeni nesil antibiyotikler için çok değerli birer kaynaktır. Bu nedenle ülkemizde yetişen tıbbi ve aromatik bitkiler, yeni nesil antibiyotikler için eşsiz bir kaynak olarak gözükmetedir (Twaij, et al. 2018).

1.9. Bitkilerin Antikanser Aktivitesi

Bitkisel ürün, bir bitkinin tamamının veya kök, yaprak, çiçek, tohum gibi bitki kısımlarından oluşan formu olarak tanımlanır. Bitkisel ürünler çok eski zamanlardan beri hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre dünya nüfusunun %70-80'i bitkisel ürünleri, kanser, hipertansiyon, diyabet ve immun sistem hastalıkları gibi birçok kronik hastalığın tedavisinde, fiziksel ve bilişsel performans artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Kalkan 2017).

Bitkisel ürünlerin sık kullanılmasına rağmen, bitkisel ürün kullanımı hekimler tarafından sorgulanmakta ve hastaların büyük bir kısmı doktoruna kullandığı, bitkisel ürün hakkında yeterince bilgi vermemektedir. Bitkiler eskiden olduğu gibi günümüzde de şifa kaynağı olarak kullanılmaktadır. Birden fazla faydası olan bitkilerin başta tıp olmak üzere biyolojide, kimyada, ilaç endüstrisinde, eczacılıkta ve gıda sektöründe yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Eski dönemlerde bu bitkilerden faydalanan insanlar sadece ilkel yöntemler ile bu bitkilerden yararlanmaktaydı. (Merrily et al.2002) Çünkü o zamanlarda bitkilerdeki etken maddeleri saptaya bilecek, bunların izolasyonlarını gerçekleştirecek ya da geliştirip daha iyi bir noktaya taşıyacak bir teknoloji yoktu. Ancak günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte, bitkilerde ki biyolojik aktif bileşikler çok rahat bir şekilde saptanabilmekte, saflaştırılabilmekte ve geliştirilip sentetik formları oluşturulup yaygın bir şekilde kullanılabilmektedir. Bazı bitkilerden kanser tedavisinde yararlanılmaktadır. Zerdeçal bu bitkilerden sadece biridir. Anti kanserojen etkisi yüzünden ve kuvvetli bir antioksidan özelliğe sahip olması nedeni ile zerdeçal tüketilmesi önerilmektedir. Zerdeçalın içermiş olduğu kurkumin maddesi anti kanserojen aktivite üzerinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Tulunay vd 2015). Ancak kanseri ve kanserli hücrelerin gelişimini önleme bakımından son derece etkili olan bu madde zerdaçalın içinde çok az miktarda bulunmakta ve bağırsaklarda emilimi son derece düşük bir oranda olmaktadır. C vitamini açısından zengin olan limon kanser tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Güçlü bir antioksidan olan limon gripten kansere kadar birçok hastalığa karşı koruyucu ve

vücudun enfeksiyonlara karşı olan direnci artıran bir bitkidir. Ayrıca çörekotu, meyan kökü, yeşil çay ve brokoli bitkileride başta kanser olmak üzere birden fazla hastalığa karşı tedavi edici ve iyileştirici özelliklere sahip, kuvvetli antioksidan özellikleri olan birkaç bitkidir (Küçüköner vd 2013).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Doku kültürü bitkilerden alınan küçük doku parçalarının ve organların mikroplardan arındırılıp, büyüüp gelişmesi için gerekli şartlarda yetiştirilmesine denir. Yani kısacası bitkiden alınan bir parçanın besi ortamında kallus geliştirmesi veya yeni bir bitkiyi oluşturmaktır. Doku kültürünü tercih etmenin birden fazla nedeni vardır; bunları şöyle sıralayabiliriz. Hızlı bir şekilde çoğalma, mikroplardan arındırma, uzun süre muhafaza vb. Doku kültürü ile üretme çeşitleri; Kallus kültürü, hücre süspansiyon kültürü, embriyo kültürü, zarsız hücre kültürü ve tomurcuk, yaprak, kök ucu, anter vb. şeklindedir. Doku kültürü yönteminin avantajları yanında dezavantajları da vardır. Az materyal kullanıldığı zaman gen fakirliğine yol açar bunu engellemek için birden fazla bitkiden yararlanılır, diğer bir dezavantajı ise çok pahalı bir yöntem olmasıdır. Geçmişten günümüze kadar gelen ve gün geçtikçe kullanımı artarak devam eden bitkilerden her alanda artık yararlanılmaya başlanılmıştır.

Munir et al. (2012) *Althaea rosea*'nın kallogenезisi ve organogenezisi üzerine yaptıkları bir çalışmada, oksin ve sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin değişik kombinasyonlarını ve konsantrasyonlarını kullanmışlardır. En fazla kallus oluşumuna oksinlerin yalnız başına kullanıldığı ortamlarda gözlemişlerdir. Sitokininler içerisinde en etkili sonucu BAP içeren ortamlarda elde etmişlerdir.

Naz ve Anis (2012)'in *A. officinalis*'de eksojen hormon konsantrasyonu ve adenin sülfatın karşılıklı etkileşimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, üç farklı kallus oluşum fazı araştırılmış ve farklı yaprak segmentlerinden elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Çalışma sonucunda sıvı Murashige Skoog's (MS) besin ortamında, ortama 15 µM konsantrasyonda 2,4 diklorofenoksi asetik asit (2,4-D)'in eklenmesi ile etkili bir kallus gelişim protokolü geliştirilmiştir.

Naz vd. (2015)'ın *A. officinalis* 'de etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü geliştirme ile ilgili yaptıkları bir diğer çalışmada, bitkinin nod kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. 6-benzil adenin (BA), Kinetin (Kn) ve 2-izopenteniladenin (2-iP) ile birlikte indol-3-bütirik asit (IBA), indol-3-asetik asit (IAA) ve α -naftalenasetik asit (NAA) kombinasyonlarının MS besin ortamına ilave edilmesi ile etkili bir sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Şifalı bir bitki olan *Althaea rosea* halk arasında gülhatmi olarak da bilinmektedir. *A. rosea*'nın sürgün uçlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada (Tyup et al. 2016) BAP, NAA, IBA ve IAA gibi farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirilmiş MS besin ortamında, dolaylı çoğaltma yolu ile etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. En etkili sürgün geliştirme ortamının BAP ve NAA kombinasyonlarının kullanıldığı MS besin ortamının olduğu kaydedilmiştir.

Mujib et al. (2017)'ın *A. officinalis*'in *in vitro* üretimi üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, kök, nod ve yaprak eksplantlarını kullanmışlardır. Ortama 2,4-D'nin ilave edilmesi ile kullanılan eksplantlardan kallus elde edilmiştir. En etkili kallus gelişimi %62'lik bir oran ile nod eksplantlarından, %39'luk bir oran ile yaprak eksplantlarından ve %27'lik bir oran ile kök eksplantlarından elde edilmiştir. Ancak ortama sadece 2,4-D değil aynı zamanda 0,5, 1 ve 2 mg/l oranında benzil amino pürin (BAP) ilave etmişlerdir.

Lin et al. (1999) yaptıkları bir çalışmada *A. officinalis* ve *A. hirsute* bitki ekstraktlarını kullanarak bu bitki ekstraktlarının anti bakteriyel aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda her iki bitki ekstraktının antibakteriyel etki göstermediğini tespit etmişlerdir. *A. officinalis* ve *Althaea cannabina*'nın metanol özütlerinin antibakteriyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada her iki bitki ekstraktının inhibisyon meydana getirdiği gözlenmiştir. 52 farklı bakteri türü ile yapılan bu çalışmada kullanılan 17 bakteride çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada çözücü olarak kullanılan metanolün su ile karıştırılmasının sonuçlar üzerinde olumlu etkiler oluşturduğu saptanmıştır (Ahmad et al 1998).

Aboaba et al., (2006) halk arasında besin olarak tüketilen bitki ekstraktları ile ilgili yaptıkları çalışmada; Bitkilerin metanol ekstraktlarını kullanmış ve bakterilerdeki minimum inhibisyon değerlerini saptamaya çalışmışlardır.

Bitki ekstraktlarının 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 ve 1,56 mg/ml konsantrasyonları kullanılarak 1 ml bakteriyel süspansiyonlarına (1,5x10⁶) uygulanmıştır. Kontrol tüplerine de aynı miktarda steril damıtılmış su ilave ederek negatif kontrol olarak kullanmışlardır. Tüm tüpler 37 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteriler üzerine etkili en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Çalışma sonucunda kullanılan mikroorganizmalar üzerine bitki ekstraktlarının etkili olduğu belirtilmiştir.

Kim et al. (1995) suşların hassasiyetini belirleme ile ilgili yaptıkları bir diğer çalışmada 6 mm çaplı filtre kağıt diskleri üzerine 300 mg steril test materyali koymuşlardır. Çalışma sonucunda kullanılan suşların inhibe edildiği gözlenmiştir. Djipa et al. (2000) yaptıkları çalışmada antibakteriyel aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiş ve 24 saat sonunda diskin etrafındaki zon çapları belirlenmiştir.

Twaij and Alwan (2018) doku kültürü ortamında ürettikleri bitkilerin alkol ve su ekstraktlarını kullanarak *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium oxysporam* üzerine patojenik etkilerini araştırdıkları bir çalışmada; alkolik ekstraktların anlamlı bir şekilde inhibisyon meydana getirdiği, kontrol grubunda yer alan normal bitkiler ile karşılaştırıldıklarında bu inhibisyonun oldukça anlamlı olduğunu tespit etmişlerdir. 60 mg / 100 ml ve 80 mg / 100 ml çözücü kullanımında %100 oranında inhibisyonun meydana geldiğini belirtmişlerdir. Sıcak su ekstraktının 60 mg / 100 ml çözücüsü kullanıldığında %84,5 oranında, 80 mg / 100 ml çözücü kullanıldığında %90 oranında *Rhizoctonia solani* de inhibisyonun meydana geldiği gözlenirken, 60-80 mg/100 ml ve 80 mg / 100 ml çözücü kullanımında *Fusarium oxysporam* da sırası ile %86,1 ve %89,7 oranlarında inhibisyonun meydana geldiğini saptamışlardır.

Bonjar (2004) tıbbi amaçlı olarak kullanılan bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerini araştırdığı bir çalışmada, *A. officinalis* çiçeklerinden elde ettikleri ekstraktların çalışmada kullandıkları patojen mikroorganizmalardan bazılarının üzerinde etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterirken, bazıları üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin olmadığını vurgulamıştır.

Guatem et al. (2015) *Althaea officinalis*'in tohum ekstraktları ve uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, beş farklı bakteri ve bir fungus kullanmışlardır. Uçucu yağlarının *Streptococcus pyogenes* ve *Haemophilus influenzae* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Metanol ekstraktları için MIC değerini 3,12 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Uçucu yağların aynı şekilde anti fungal aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Qaralleh et al (2020) *Althaea officinalis*'in etanol, heksan, etil asetat ve su ekstraktlarının, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* bakterileri üzerine antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerini kullanarak saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda kullandıkları ekstraktların zayıf bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Özellikle mikrodilüsyon yönteminin antimikrobiyal aktivite tayininde daha etkili bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

Rezai et al (2015) *A. officinalis* L.'nin hidroalkolik ekstraktlarının siprofloksasin, gentamisin ve penisilin antibiyotikleri ile karşılaştırmalı olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenik bakterilerin yanı sıra klinik suşlar üzerinde ki antimikrobiyal aktivitelerini ve yara iyileştirme potansiyellerini araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında disk difüzyon ve MIC yöntemlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda ekstraktın gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmamasına rağmen, gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğunu vurgulamışlardır. Ekstraktla tedavi edilen yaralarda, kontrollere kıyasla yara iyileşme yüzdesi önemli ölçüde artmıştır. Araştırma sonuçlarına dayanarak *Althaea officinalis* L. bitki özünün gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisi için harika bir aday olabileceğini ileri sürmüşlerdir Arab et al. (2017) H₂O₂ ile oksidatif stres indüklenmiş PC12 hücrelerinde *Althaea officinalis* yapraklarının metanol ve su ekstraktlarının nöroprotektif etkilerini ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Metanol ve su ekstraktlarının güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olmadığını belirlemişlerdir. Ancak H₂O₂ ile oksidatif stresin indüklendiği PC12 hücrelerinde her iki ekstraktın hücreyi oksidatif strese karşı koruduğunu tespit etmişlerdir Zhang et al. (2016) *Althaea officinalis*'in kök ekstraktlarını kullanarak A549 hücreleri üzerinde ki anti kanser aktivitelerini araştırmışlardır.

Araştırma sonucunda 25 mg/ml dozda ki kök ekstraktının oldukça etkili bir anti kanser aktivite gösterdiğini saptamışlardır Changizi Ashtiyani et al. (2015) *A. officinalis* köklerinin hidroalkolik ekstraktlarının 200, 400, 800 mg/ml dozlarının streptozotocin kullanılarak diyabet oluşturulmuş ratlarda kan glukoz düzeyini düşürdüğünü belirtmişlerdir. May and Willuhn (1985)' nun bitkinin çiçek, yaprak ve kök kısımlarının su ekstraktlarını kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ekstraktların %10'luk konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerinde inaktivasyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir. *A.officinalis*'in kökleri müsilaj, flavonoidler ve glikozitleri içermektedir. Ayrıca yapraklar kumarin ve skopoletin içerir. Değerli ikincil metabolitlere sahip olması nedeniyle potansiyel terapötik etkisi bulunmaktadır. *A. officinalis* ile ilgili yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, öksürük, boğaz tahrişi, mide iltihabı, anti-tümör, antiviral gibi önemli farmakolojik aktiviteler gösterdiğini ortaya koymuştur (Ali Shah et al., 2011).

Park et al. (2010) *Abelmoschus esculentus* ve *Althaea officinalis*, bitkilerinin tamamını, çiçeklerini ve köklerini kullanarak her iki bitkinin antioksidan, anti inflamatuvar ve antikanser aktiviteleri üzerine yaptıkları bir çalışmada *Althaea officinalis*'in *Abelmoschus esculentus*'a kıyasla anti inflamatuvar ve antioksidan aktivitesinin daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki bitki tamamının, çiçeklerinin ve köklerinin ekstraktlarının HeLa ve SK-Hep1 hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitelerine bakılmış ve antikanser aktivitelerinin olduğu gözlenmiştir. *Althaea officinalis*'in *Abelmoschus esculentus*' a kıyasla daha güçlü bir antikanser aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bitkinin tamamını kullanarak elde ettikleri ekstraktların antikanser aktivitesinin çiçek ve kök kısımlarına göre daha güçlü olduğunu belirtmişleridir.

Alshaya et al. (2019) Irak'ta yaygın olarak yetişen bir bitki olan *Althaea ludwigii* L.'nin toprak üstü kısımlarını kullanarak metanol ekstraktlarını elde etmişler ve elde ettikleri metanol ekstraktının Michigan Cancer Foundation-7'ye (MCF-7) karşı antikanser aktivitesini araştırmışlardır. Ayrıca yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerini tespit etmişlerdir. Bitki ekstraktının MCF-7'ye karşı oldukça etkili bir anti kanser aktivite gösterdiğini kaydetmişleridir. Biyoaktif bileşen bakımından bitki ekstraktının rutin bakımından oldukça zengin olduğunu, güçlü bir antikanser aktivitesi bulunan rutinin böylesi bir etkinin oluşmasında rol oynamış olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Ding et al. (2008) yaptıkları çalışmada *Althaea officinalis*'de bol miktarda bulunan skopoletin (7-hidroksi-6-metoksi kumarin) tümoral lenfosit etkisini yok ederek antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. 7 gün boyunca günlük olarak uygulanan skopoletin (1.00 mg/kg) serum tiroid hormonları ve kan glukoz düzeylerinin yanı sıra hepatik glukoz-6-fosfat aktivitesini düşürdüğü, bu nedenle hipertiroidizm, lipid peroksidasyonu ve hiperglisemide kullanılabileceği (Al-Snafi, 2013) belirtilmiştir.

Fatemeh et al. (2013) *Althaea kurdica*'nın çiçek ekstraktlarının insan lösemi hücre hatları (k562) ve insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırma amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmada, 24 saatlik muameleden sonra özütün, sırasıyla 7,5 mg ve 5 mg dozlarının k562 hücre hatlarına ve insan lenfositlerine karşı güçlü bir sitotoksik aktivite sergilediğini göstermişler ve kullanılan bu dozların kanser tedavisi için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. *A. officinalis* çiçeğinin sulu ekstraktının lipemi, mide ve bağırsak hastalıklarındaki potansiyel rolünün araştırıldığı bir çalışmada (Hage-Sleiman ve ark. 2011), çiçeğin sulu ekstraktının lipemide önemli faydaları görülmüştür. İnflamasyon, mide ülseri ve trombosit agregasyonu üzerine görünür bir yan etkisinin olmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan *A. officinalis* L. bitkisine ait tohumlar, daha önceden tespit edilmiş olan lokasyonlardan toplanmıştır. Bitkinin tür tanımı “The Flora of Turkey and East Aegean Islands” (Davis 1984)’e göre, yapılmıştır. Tohum bağlama döneminde, daha önceden tespit edilen lokasyonlar ziyaret edilmiş ve kabuklu bir şekilde tohumlar laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvar ortamında tohumlar kabuklarından ayrılmıştır. Ardından sağlıklı görünümdeki tohumlar ile sağlıklı bir görünüme sahip olmayan tohumlar birbirinden ayırt edilerek sağlıklı tohumlar çalışmada kullanılmıştır.

3.2. Sterilizasyon

Çalışmada kullanılan *A. officinalis* L. tohumlarının yüzey sterilizasyonu ticari çamaşır suyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (ACE – Türkiye, %5 NaOCl). Tohumlar çamaşır suyunda 10, 15, 20, 25, 30 dakika bekletilerek en uygun sterilizasyon protokolü geliştirilmiştir. Sterilizasyonun ardından tohumlar steril distile saf sudan 3 defa geçirilerek yüzeylerindeki sodyum hipoklorit uzaklaştırılmıştır. Sterilizasyondan sonra her magentaya 10 tane tohum gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Çalışmada kullanılan cam malzeme, ekipmanlar, MS (Murashige and Skoog, 1962) ve Gamborg – B5 besi yerleri, 121 °C de 20 dakika tutularak sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kallus gelişimini sağlamak amacı ile kullanılan hormonların (2,4-D ve BAP) yapısı sıcaklığın etkisi ile bozulmadığından, hormonlar sterilizasyon öncesinde besi yeri içerisine ilave edilerek sterilizasyonlar sağlanmıştır.

3.3. Tohumların Çimlendirilmesi

Bu çalışmada tohumların çimlenmesini sağlamak amacı ile %3 oranında sukroz içeren ve %0,65 oranında plant agar ve %0,35 oranında gelrite ile katılaştırılmış, MS ve Gamborg – B5, besi yerleri kullanılmıştır. Besi yerlerinin pH'sı 1N'lık NaOH ve HCl kullanılarak $5,8 \pm 0,2$ ayarlanmıştır. Böylece çimlenmenin en yüksek oranda gerçekleştiği ortam ve katılaştırıcı madde tespit edilerek, çalışmanın ilerleyen dönemlerinde en uygun ortam kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir.

3.4. Kallus Kültürlerinin Oluşturulması

Steril tohumların çimlenmesiyle gelişen, steril *Althaea officinalis* L. bitkiciklerinin yaprak, yaprak sapı ve kök kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Eksplantlar %3 oranında sukroz içeren, %0,35 oranında gelrite ile katılaştırılmış, pH'ı 1N'lık NaOH ve HCl kullanılarak $5,8 \pm 0,2$ ayarlanmış, Tablo 2.4.1 de belirtilen kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiş, MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bütün kültür kapları $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyodunda, $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda, iklim dolabında kültüre alınarak kallusların gelişimi sağlanmıştır. Çalışmaların tamamı steril hava akışlı kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4.1. Kallus gelişimini sağlamak için MS besin ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları ve konsantrasyonları

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)
1	-
1	0,25
1	0,50
1	0,75
2	-
2	0,25
2	0,50
2	0,75

3.5. Kallus Kültürlerine UV-C Uygulanması

Çalışmada kısa dalga boylu UV-C ışığı kullanılmıştır. UV-C ışığı kallusların gelişmiş olduğu magentaların kapaklarını açmak sureti ile 15 cm'lik bir mesafeden 15 dakika süre ile uygulanmıştır. UV-C uygulamasının ardından kültür kaplarının kapakları kapatılarak 48 saat iklim dolabında bekletilmiştir.

3.6. Kalluslardan Metanol ve Etil Asetat Ekstraktların Elde Edilmesi

Kallus geliştirme ortamında geliştirilen kalluslar kurutulup toz haline getirildikten sonra, 100 gr kallus alınarak üzerine 2000 ml metanol veya etil asetat ilave edilip 24 saat boyunca normal şartlar altında çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda masere edilmiş  z lti süzgeç kağından geçirilerek büyük partiküllerin uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından rotary evaporator yardımı ile  z ltiler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen ekstrakt cam petriler içerisine konularak 37  C de etüvde bekletilerek  z ltinin iyice uzaklaşması sağlanmıştır.

3.7. Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ekstraktlar uygun şekilde  z ld kten sonra son konsantrasyonları 1 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar Tablo 3.7.1 de belirtilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için çalışmada kullanılacak mikroorganizmaların son konsantrasyonları 10^6 olacak şekilde sıvı besin ortamında (LB Broth, Germany)  oğaltılmıştır. Mueller Hinton Agar (Merck, Germany) kullanılarak cam petriler içerisinde katı besin ortamı hazırlanarak, çalışmada kullanılan mikroorganizmaların katı besin ortamına ekimleri gerçekleştirilmiştir. Besi yeri üzerine yerleştirilen disklere önceden hazırlanmış olan ekstraksiyon  z ltilerinden 20  l ilave edildikten sonra besi yerleri 2 saat + 4  C de buzdolabında bekletilmiştir. Buzdolabından alınan besi yerleri 37  C de 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda disklerin etrafında oluşan zon çapları ölçülerek mm cinsinden ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilmiştir.

Tablo 3 7.1 Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan mikroorganizmalar

Bakteri	Gram (Pozitif/Negatif)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6337	Pozitif
<i>Brevibacillus brevis</i>	Pozitif
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	Pozitif
<i>Bacillus subtilis</i> IM 622	Pozitif
<i>Bacillus cereus</i> EMC 19	Pozitif
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538 P	Pozitif
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 5348	Pozitif
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4413	Negatif
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negatif
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	Negatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i> EMCS	Negatif
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negatif
<i>Proteus vulgaris</i> FMC II	Negatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50070	Negatif
<i>Proteus vulgaris</i>	Negatif
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	Negatif

3.8. Ekstraktların Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi

İnsan nöroblastoma kanser hücreleri (SH-SY5Y), %12 Fetal bovin serum ve %0,5 antibiyotik içeren (penicillin-streptomycin) DMEM F12 besin ortamında, %5 CO₂'li, nemlendirilmiş ortamda, 37 °C'de inkübatörde kültüre alınmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra 96'lık well platelerde UV-C ışınları ile muamele edilmiş yaprak ve yaprak sapına ait kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL dozlarına ait antikanser aktivite sonuçlarına bakılmıştır. 96'lık well platelerde ki her bir kuyucuğa 4 µl WST-1 canlılık kiti eklenerek 2 saat beklendikten sonra, Elisa Reader cihazında, 450 nm dalga boyunda ölçüm alınmak sureti ile bitki ekstraktlarının anti kanser aktiviteleri tespit edilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada ele alınan özellikler için kallus gelişimini sağlamak üzere, MS besin ortamı ve (ilave edilen) bitki büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarında, tanımlayıcı istatistikler, “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak verilmiş ve bu kombinasyonlarda herhangi bir karşılaştırma yapılmamıştır. Kültür kaplarının her birine 10 tane yaprak, yaprak sapı ve kök eksplantı konulmuş ve her bir deneme 3 tekerrürlü olacak şekilde planlanmıştır. Çalışmada ele alınan konsantrasyonlarda; her bir konsantrasyon için Hücre canlılığını (%) kontrol grubu ile karşılaştırmada Students't testi kullanılmıştır. İstatistik önemlilik (anlamlılık) düzeyi %5 olarak alınmış ve analizler için GraphPad paket istatistik programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sterilizasyon ve Tohum Çimlenmesi ile İlgili Sonuçlar

Bitki doku kültürü çalışmalarında bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonunun sağlanması çok önemlidir. Bu nedenle öncelikle *Althaea officinalis* L. tohumlarının yüzey sterilizasyonunun sağlanması için uygun bir yüzey sterilizasyon protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bitki tohumları 10, 15, 20, 25, 30 dakika süre ile ticari çamaşır suyu içerisinde bekletilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1.1. *Althaea officinalis* L. tohumlarının yüzey sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon süresinin tespit edilmesi

Süre (dakika)	Kontaminasyon Oranı (%)
10	%100
15	%88
20	%57
25	%18
30	%0

Tohumlar çamaşır suyu içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra besin ortamlarına ekimlerinin yapılmasının ardından tohumların tamamında %100 oranında kontaminasyon gözlenmiştir. Tohumların 15, 20, 25, 30 dakika süre ile çamaşır suyunda bekletilmesinin ardından, sırası ile %88, %57, %18 ve %0 oranlarında kontaminasyonun olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1.1). *Althaea officinalis* tohumları için en uygun tohum sterilizasyonunun, 30 dakika süre ile ticari olarak satılan çamaşır suyunda bekletmenin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.1.1). Sterilizasyondan sonra tohumlar %3 oranında sukroz içeren ve %0,35 oranında gelrite ile katılaştırılmış ve pH'sı

1N NaOH ve HCl kullanılarak $5,8 \pm 0,2$ 'e ayarlanmış MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Ancak tohumlarda çimlenme güçlüğüne olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle farklı besin ortamları ve farklı katılaştırıcı maddeler kullanılarak uygun bir çimlenme protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır (Tablo 4.1.2). MS ve Gamborg-B5 besin ortamlarına plant agar ve gelrite katılaştırıcı maddeleri eklenerek en uygun çimlenme ortamı tespit edilmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulgular Tablo 4.1.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1.2. *Althaea officinalis* L. tohumlarının çimlenmesi için en uygun besi yeri ve katılaştırıcı maddenin belirlenmesi

Besi yeri	Katılaştırıcı madde	Çimlenme oranı (%)
MS	Plant agar	%11
MS	Gelrite	%25
Gamborg-B5	Plant agar	%5
Gamborg-B5	Gelrite	%8

Çimlenme ortamları olarak MS + plant agar, MS + gelrite, Gamborg-B5 + plant agar ve Gamborg-B5 + gelrite kullanılmıştır. Bu ortamlardaki çimlenme oranlarının sırası ile % 11, %28, %5 ve %8 oranlarında olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1.2). MS besin ortamında tohum çimlenmesinin, Gamborg-B5 besin ortamına kıyasla daha yüksek olduğu, kullanılan katılaştırıcı maddelerin birbirleri ile kıyaslandığında en etkili çimlenmenin gelrite içeren besin ortamları olduğu sonucuna ulaşılmıştır. En etkili çimlenmenin %28 oranında MS + gelrite kullanılarak hazırlanan ortamda olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1.2). Bundan sonra yapılan çalışmalarda MS + gelrite kullanılarak hazırlanan ortamlar kullanılmıştır.



Şekil 4.1.1. Çimlenme ortamında gelişen *Althaea officinalis* L. bitkileri

4.2. Kallus Gelişim Oranı ve Kallus Ağırlığı İle İlgili Sonuçlar

Steril ortamda çimlendirilen *Althaea officinalis* L. bitkilerinin yaprak, yaprak sapı ve kök kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Uygun bir şekilde bitkiden ayrılan eksplantlar farklı dozlarda 2, 4- D (1, 2 mg/l) ve BAP (0,25, 0,50,0,75 mg/l) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler 35 gün boyunca iklim dolabında uygun koşullarda bekletilmiştir. 35 günlük bir sürenin ardından kültür ortamlarında ki kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları belirlenmiştir.

Çalışmalar üç tekerrürlü olacak şekilde planlanmış ve çalışma sonunda bu tekerrürlerden elde edilen verilerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 4.2.1, Tablo 4.2.2 ve Tablo 4.2.3,'de gösterilmiştir.

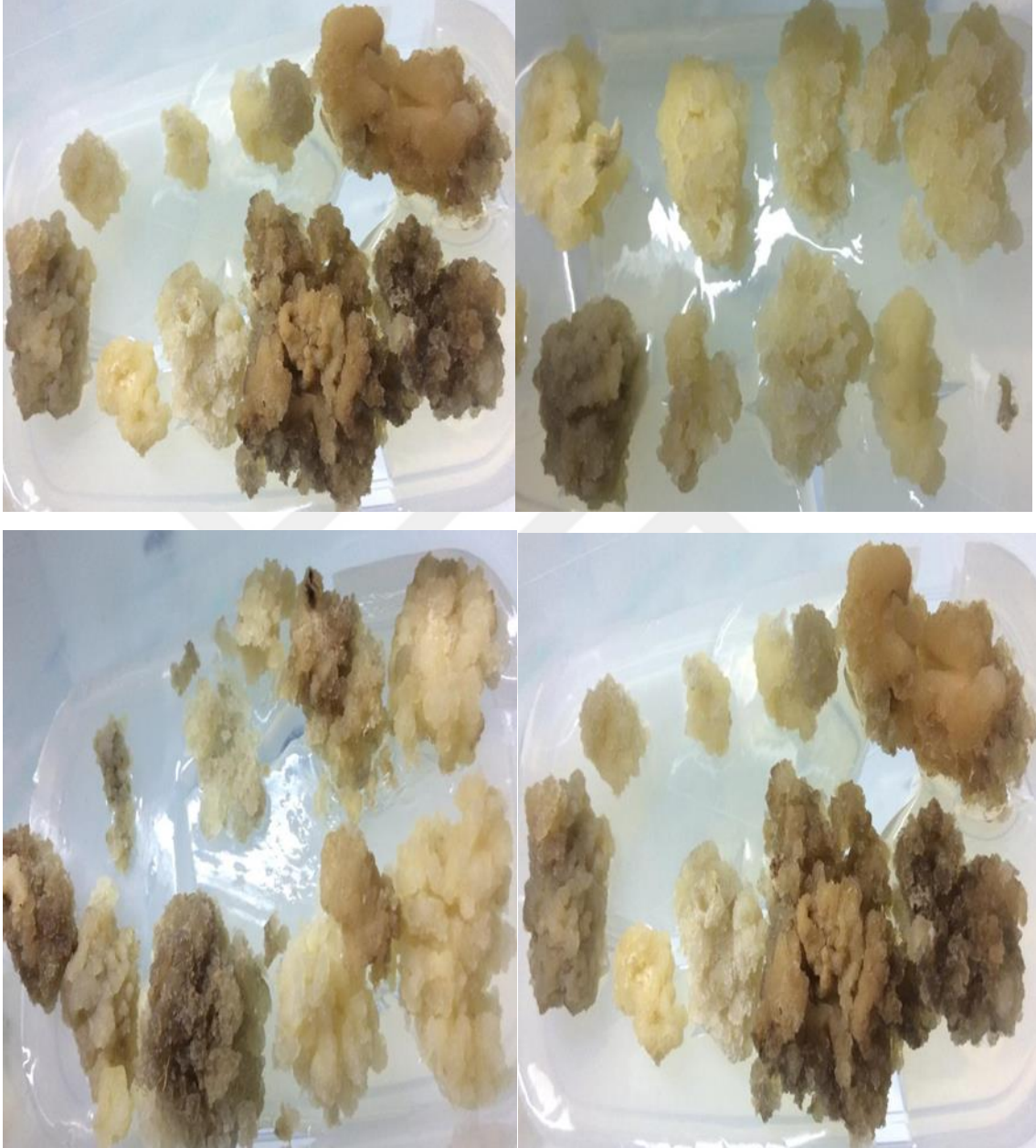
Tablo 4.2.1. Yaprak sapı eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları

Kullanılan hormonlar		Kallus gelişim oranı	Kallus ağırlığı (mg)
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)		
1	-	%64	324.65±1.43
1	0,25	%100	516.24±0.48
1	0,50	%51	294.31±0.87
1	0,75	%43	254.86±1.73
2	-	%78	347.82±0.58
2	0,25	%62	320.15±0.47
2	0,50	%58	298.37±0.13
2	0,75	%47	263.58±1.02

±: En az üç tekrarla elde edilen standart sapma değerini ifade etmektedir.

Yaprak sapı eksplantlarında, en etkili kallus gelişimi %100 oranında, 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. Bunu sırası ile %78 oranında 2 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, %64 oranında 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, %62 oranında 2 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP içeren besi ortamı, %58 oranında 2 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, %51 oranında 1 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı,

%47 oranında 2 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besi ortamı ve son olarakta %43 oranında 1 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besin ortamı izlemektedir (Tablo 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar

Ortamda sadece bir oksin olan 2,4-D nin bulunması kallus gelişimi üzerinde etkili olsa da bir sitokinin olan BAP ile birlikte kullanılması daha etkili kallus gelişimini sağlamıştır. Ancak kullanılan BAP miktarının artması kallus gelişimi üzerinde olumsuz bir etki oluşturmuştur. 2,4-D miktarının 1 mg/l den 2 mg/l ye çıkarılması kallus gelişim yüzdesini

arttırmıştır. Kallus ağırlıklarına bakıldığında sonucun kallus gelişim oranı ile bir benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamında 516,24±0.48 mg ağırlığında kalluslar gelişirken, bunu sırası ile 347,82±0.58 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, 324.65±1.43 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, 320,15±0.47 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP içeren besi ortamı, 298,37±0,13 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, 294,31±0,87 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, 263,58±1,02 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besi ortamı ve 254,86±1,73 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besin ortamı izlemektedir (Şekil 4.2.1).

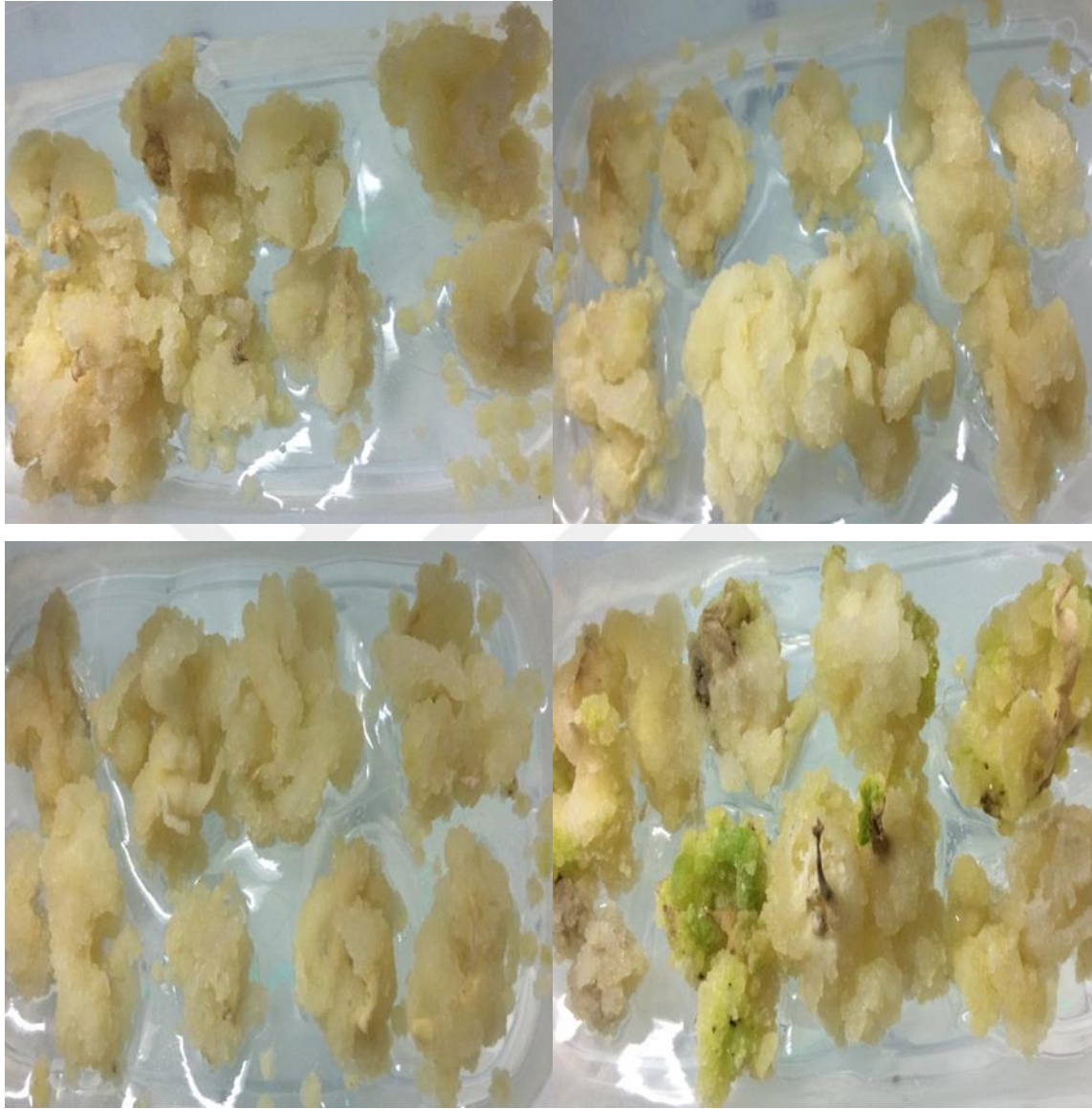
Tablo 4.2.2. Yaprak eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları

Kullanılan hormonlar		Kallus gelişim oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg)
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)		
1	-	%59	257.71±1.39
1	0,25	%71	332.54 ±0.78
1	0,50	%39	224.62±0.98
1	0,75	%29	196.38±1.73
2	-	%63	260.48 ±0.46
2	0,25	%54	245.93±0.21
2	0.50	%41	238.06 ±0.81
2	0,75	%34	211.37±0.21

±: En az üç tekrarla elde edilen standart sapma değerini ifade etmektedir.

Yaprak eksplantlarında, en etkili kallus gelişimi %71 oranında, 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren MS besin ortamında tespit edilmiştir. Bunu sırası ile %63 oranında 2 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, %59 oranında 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, %54 oranında 2 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamı, %41 oranında 2 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, %39 oranında 1 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, %34

oranında 2 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besi ortamı ve son olarakta %29 oranında 1 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besin ortamı takip etmektedir (Tablo 4.2.2).



Şekil 4.2.2. Yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar

Ortamda sadece bir oksin olan 2,4-D nin bulunması yaprak eksplantlarından kallusların gelişimi üzerinde etkili olsa da, bir sitokinin olan BAP ile birlikte kullanılması kallus gelişim oranı üzerinde daha etkili olmuştur. Ancak kullanılan BAP miktarının artması yaprak eksplantlarından kallus gelişim oranı üzerine olumsuz bir etkide bulunmuştur. 2,4-D miktarının 1 mg/l den 2 mg/l ye çıkarılması yaprak eksplantlarında da kallus gelişim yüzdesini arttırmıştır (Şekil 4.2.2.) 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamında

332,54 $\pm$ 0,78 mg ağırlığında kalluslar gelişirken, bunu sırası ile 260,48 $\pm$ 0,46 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, 257,71 $\pm$ 1,39 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamı, 245,93 $\pm$ 0,21 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamı, 238,06 $\pm$ 0,81 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, 224,62 $\pm$ 0,98 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP içeren besi ortamı, 211,37 $\pm$ 0,21 mg ağırlığında 2 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besi ortamı ve 196,38 $\pm$ 1,73 mg ağırlığında 1 mg/l 2,4-D + 0,75 mg/l BAP içeren besin ortamı takip etmiştir (Tablo 4.2.2).

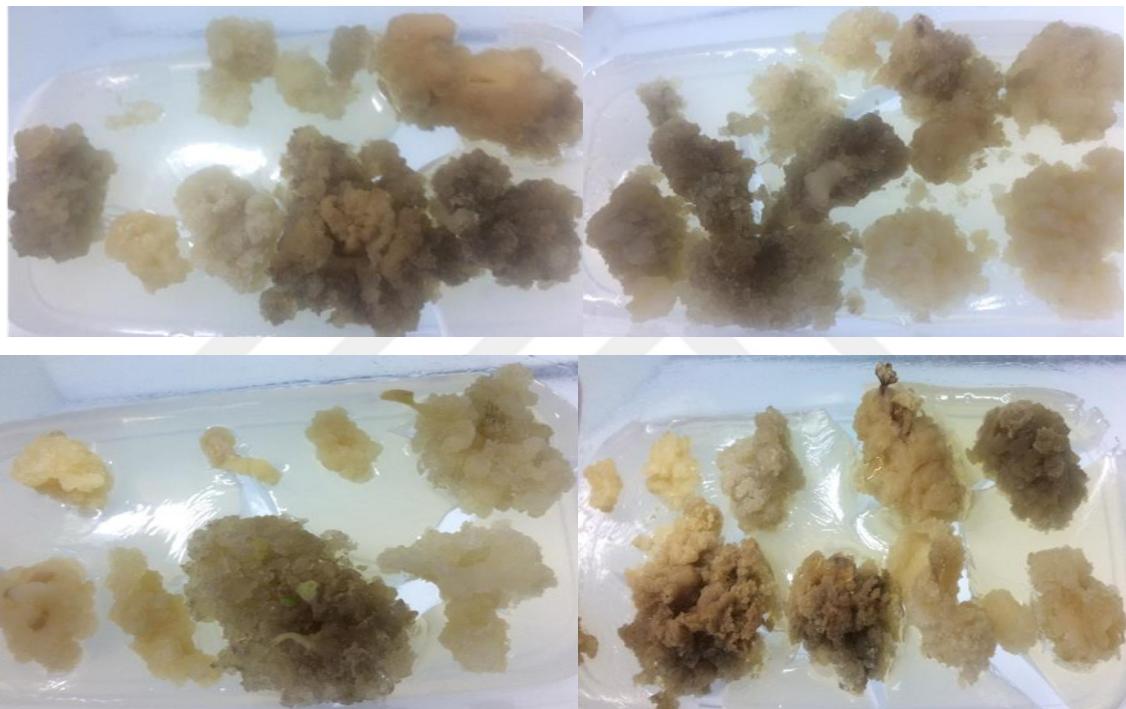
Tablo 4.2.3 Kök eksplantlarında kallus gelişim oranı ve kallus ağırlıkları

Kullanılan hormonlar		Kallus gelişim oranı (%)	Kallus ağırlığı (mg)
2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)		
1	-	%3	25.74 $\pm$ 1,68
1	0,25	%18	78.26 $\pm$ 2,34
1	0,50	-	-
1	0,75	-	-
2	-	%8	48.06 $\pm$ 0,97
2	0,25	-	-
2	0,50	-	-
2	0,75	-	-

$\pm$: En az üç tekrarla elde edilen standart sapma değerini ifade etmektedir.

Kök eksplantlarının kallus gelişimi açısından en verimsiz eksplantlar olduğu gözlenmiştir. Kullanılan hormon kombinasyonlarının sadece üçünde kallus gelişimi gözlenmiş olup, diğer ortamlarda kallus gelişimi saptanamamıştır. 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamında %18 oranında, 2 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında %8 oranında, 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında %3 oranında kallus gelişim oranı belirlenmiştir (Tablo 4.2.3). Kallus ağırlıklarının ise 78,26 $\pm$ 2,34 ile 25,74 $\pm$ 1,68 mg arasında olduğu, kallus ağırlığının en fazla olduğu ortamın 1 mg/l 2,4-D + 0,25 mg/l BAP içeren besi ortamı olduğu, en hafif kallusların ise 1 mg/l 2,4-D içeren besi ortamında geliştiği saptanmıştır (Tablo 4.2.3).

Yaprak sapı, yaprak ve kök eksplantlarının kallus geliştirme oranları ve kallus ağırlıkları birbirleri ile kıyaslandığında, yaprak sapı eksplantının kallus gelişim oranı ve kallus ağırlığı açısından diğer iki eksplanta kıyasla daha verimli olduğu gözlenmiştir. Gerek kallus gelişim oranı gerekse kallus ağırlığı ile ilgili en iyi sonuçlar yaprak sapı eksplantlarından elde edilmiştir. Kallusların gelişimleri gözlemlendikten sonra kallusların geliştiği kültür kaplarının kapaklarının açılması süreti ile hava akışlı kabin içerisinde 15 cm'lik bir mesafeden 15 dakika süre ile UV-C uygulaması yapılmıştır (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.3. UV-C uygulamasından 48 saat sonra kalluslardan görünüm

UV- C uygulanmasındaki amaç UV-C' yi bir elisitör olarak kullanıp bitki içerisindeki sekonder metabolit çeşidini ve miktarını arttırmaktır. UV-C uygulamasının ardından kültür kaplarının kapakları kapatılarak kültürler 48 saat boyunca iklim dolabında uygun şartlarda bekletilmiştir. UV-C uygulanmış yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslar kurutulduktan sonra, metanol ve etil asetat çözeltileri kullanılarak ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kök esplantlarından yeterli miktarda kallus gelişimi olmadığı için, kök eksplantlarından ekstraksiyon gerçekleştirilmemiştir. Ekstraksiyonlar yapılırken 100 gr ağırlığındaki kalluslar havanlar içerisinde iyice ezilerek toz haline getirilmiştir. Toz haline

getirilmiş kalluslar üzerine 2000 ml metanol veya etil asetat çözeltileri ilave edilerek 24 °C sıcaklıkta çalkalayıcı inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra, süzgeç kağıtları yardımı ile süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Süzme işleminin ardından rotary evaporator yardımı ile çözeltiler uzaklaştırılmıştır. Çözeltilerin tamamen uzaklaşması için cam petriler içerisine konulan ekstraktlar 37 °C de etüvde bekletilmiştir. Çözeltilerin tamamen uzaklaşmasının ardından ekstraktlar cam petrilerden kazınarak alınmış ve + 4 °C de muhafaza edilmiştir.

4.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Yaprak ve yaprak sapına ait kallusların metanol ekstraktları steril distile su ile, etil asetat ekstraksiyonları ise DMSO kullanılarak, son konsantrasyonları 1 mg/ml, 5 mg/ml ve 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Her üç konsantrasyona ait çözeltilerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1. Yaprak ve yaprak sapı kalluslarının metanol ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bakteri	Gram (Pozitif/Negatif)	Metanol Ekstraksiyonu		Etil Asetat Ekstraksiyonu	
		Yaprak sapı kallusları	Yaprak Kallusları	Yaprak sapı kallusları	Yaprak Kallusları
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6337	Pozitif	-	-	-	-
<i>Brevibacillus</i> <i>brevis</i>	Pozitif	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> DSM 32	Pozitif	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IM 622	Pozitif	-	-	-	-

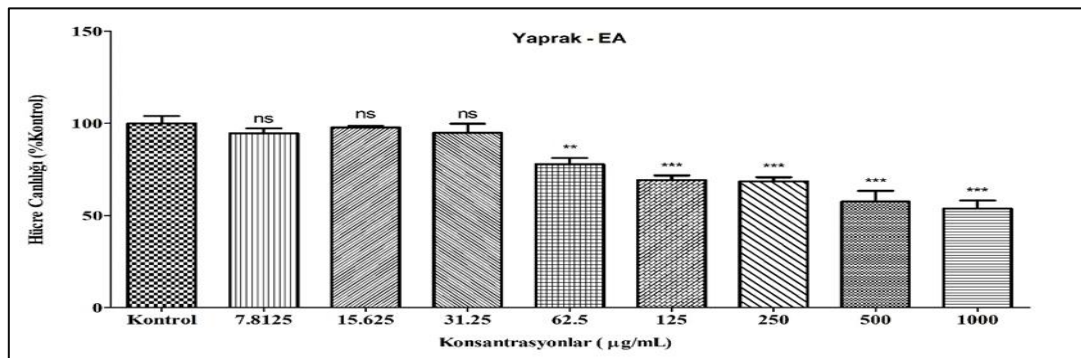
<i>Bacillus cereus</i> EMC 19	Pozitif	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538 P	Pozitif	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 5348	Pozitif	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> NRRLE 4413	Negatif	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negatif	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	Negatif	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> EMCS	Negatif	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negatif	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> FMC II	Negatif	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50070	Negatif	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Negatif	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13311	Negatif	-	-	-	-

Yaprak ve yaprak sapına ait kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının, hazırlanan her üç konsantrasyondaki (1, 5, 10 mg/ml) çözeltilerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.3.1).

4.4. Antikanser Aktivite Sonuçları

Yaprak ve yaprak sapına ait UV- C uygulamasına maruz bırakılmış kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki antikanser aktiviteleri, WST-1 canlılık kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Ekstraktların 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ dozlarına ait anti kanser aktivite sonuçları Şekil 4.4.1, Şekil 4.4.2, Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4'te gösterilmiştir.

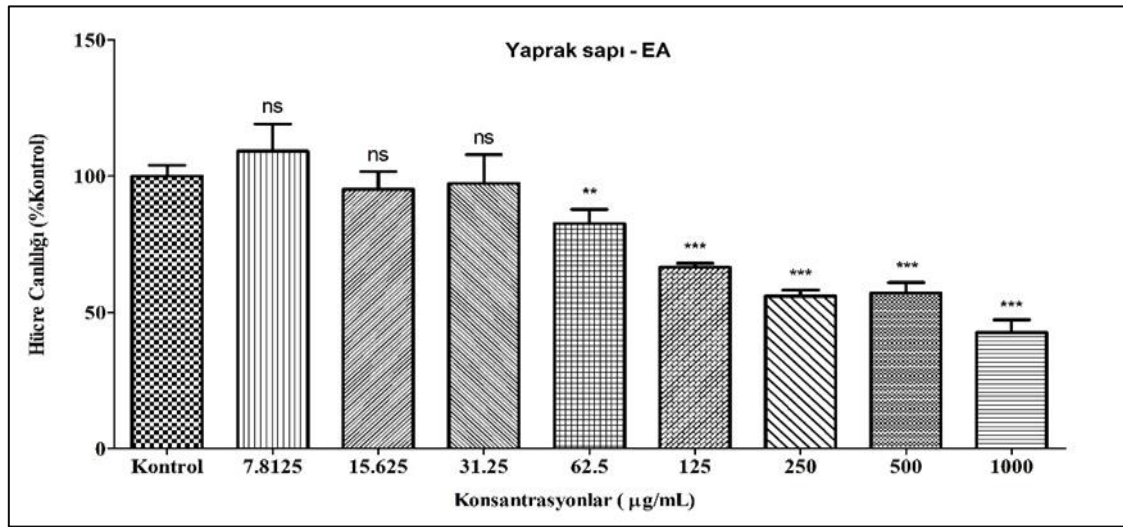
Yaprak kalluslarından elde edilen etil asetat ekstraktlarının 1000, 500, 250, 125 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($P < 0,001$) oldukça anlamlı bir düzeyde anti kanser aktivite gösterdiği, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ dozunun ise kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($P < 0,01$) anlamlı bir düzeyde anti kanser aktivitesinin olduğu ancak, 31,25, 15,625, 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının kontrole kıyasla istatistiksel olarak her hangi bir anti kanser aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4.1). Yaprak kalluslarından elde edilen ekstraktların dozlarındaki azalışa bağlı olarak anti kanser aktivitenin de azaldığı gözlenmiştir. Yani kullanılan dozlar içerisinde dozlar arttıkça aktivite artışı söz konusu iken dozun azalmasına bağlı olarak aktivitenin azalışı söz konusudur.



Şekil 4.4.1.Yaprak kalluslarına ait etil asetat ekstraktının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi. Sonuçlar üç farklı tekerrürün ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir. Konsantrasyonların kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları: Ns: önemli değil, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

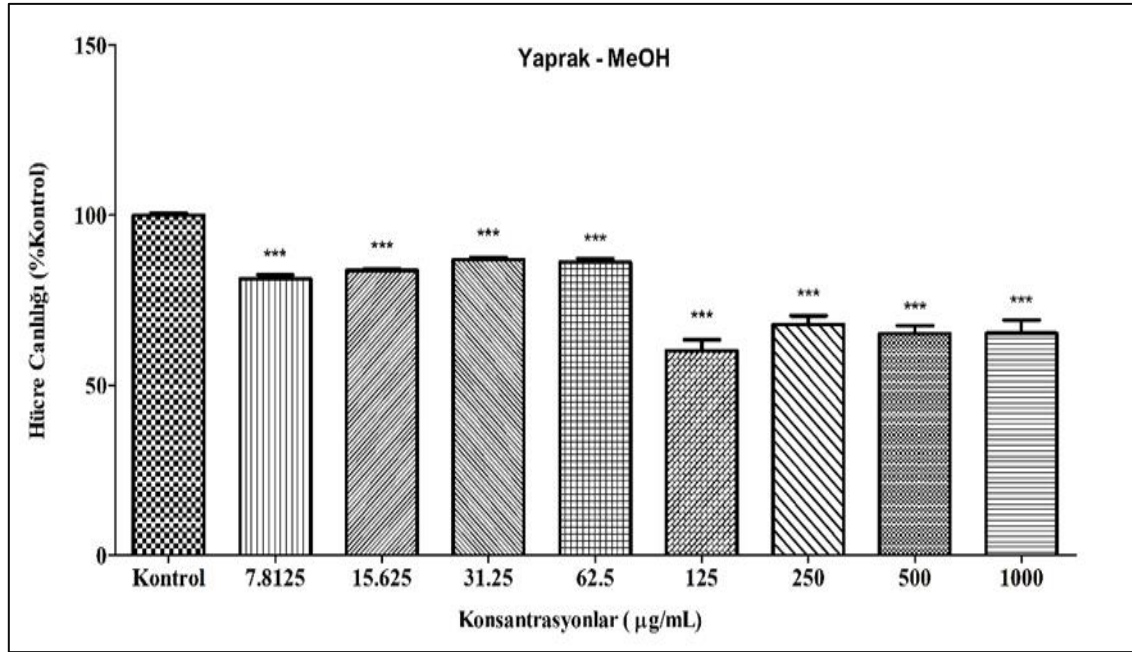
Yaprak sapı kalluslarına ait etil asetat ekstraktının 1000, 500, 250, 125 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($P < 0,001$) oldukça anlamlı bir düzeyde anti kanser aktivite gösterdiği, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ dozunun

ise kontrole kıyasla istatistiksel olarak ($P < 0,01$) anlamlı bir düzeyde anti kanser aktivitesinin olduğu ancak, 31,25, 15,625, 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının istatistiksel olarak herhangi bir anti kanser aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4.2). Yaprak ve yaprak sapı eksplantlarından gelişen kalluslardan elde edilen etil asetat ekstraktlarının benzer bir anti kanser aktivite gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Böyle bir sonucun ortaya çıkmasının nedeni, kullanılan çözücünün benzer sekonder metabolitleri ekstrakta geçirmesi olabilir.



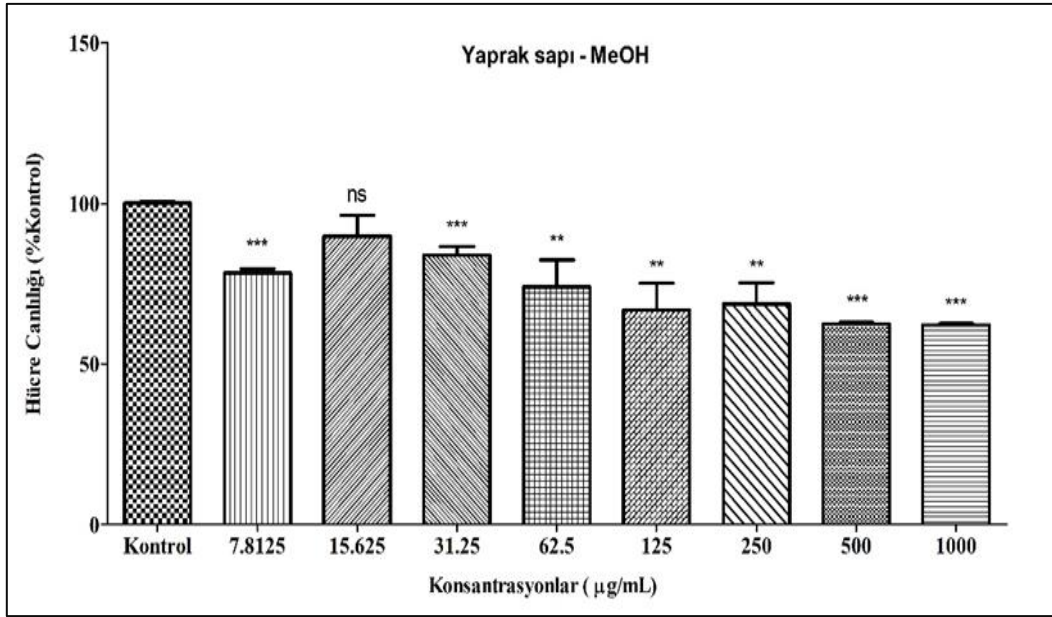
Şekil 4.4.2. Yaprak sapı kalluslarına ait etil asetat ekstraktının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitesi. Sonuçlar üç farklı tekerrürün ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir. Konsantrasyonların kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları: Ns: önemli değil, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Yaprak kalluslarına ait metanol ekstraktının kullanılan bütün dozları (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125 $\mu\text{g/mL}$), SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde, anti kanser aktivite göstermiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu aktivitenin istatistiksel olarak ($P < 0,001$) oldukça anlamlı olduğu görülmüştür. En etkili anti kanser aktivite 125 $\mu\text{g/mL}$ dozunda elde edilmiştir (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3. Yaprak kalluslarına ait metanol ekstraktının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi. Sonuçlar üç farklı tekerrürün ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir. Konsantrasyonların kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları: Ns: önemli değil, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Yaprak sapı kalluslarına ait metanol ekstraktının, 15,625 µg/ml dozu hariç, kullanılan diğer bütün dozlarda (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 7,8125 µg/mL) SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerinde, anti kanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında bu aktivitenin istatistiksel olarak ($P < 0,01$) anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.4.4). Yaprak ve yaprak sapı kalluslarının metanol ekstraktlarının anti kanser aktivite bakımından hemen hemen benzer bir sonuç gösterdiği tespit edilmiştir. Metanol ve etil asetat ekstraktlarının anti kanser aktiviteleri karşılaştırıldığında, metanol ekstraktlarının etil asetat ekstraktlarına kıyasla daha etkili bir anti kanser aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumun nedeni metanolün etkili bir organik çözücü olması ile açıklanabilir.



Şekil 4.4.4. Yaprak sapı kalluslarına ait metanol ekstraktının SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesi. Sonuçlar üç farklı tekrerrün ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir. Konsantrasyonların kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları: Ns: önemli değil, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Malvaceae familyasına ait bitkilerin fitoterapide kullanımı çok yaygındır. Bu familya içerisinde yer alan *A. officinalis* L. ve *A. rosea* alternatif tıp da, oral tahrişlerde, kuru öksürükte, hafif gastritte, deri yaralanmalarında ve böcek ısırıklarında kullanılmaktadır. Bitkilerin alternatif tıpta kullanılmalarının nedeni içerdikleri değerli sekonder metabolitleridir. *A. officinalis*' in değişik kısımları birçok bileşen içermektedir. Pektinler, mono ve disakkaritler, müsilaj, flavonoidler, isoquersetin, kamferol, kafeik, p-kumarik asit, kumarinler, scopoletin, fitosterol, taninler, asparajinler bu bileşenlerin belli başlılarıdır (Al-Snafi, 2013).

Önceki yapılmış çalışmalar *A. officinalis* L. ve *A. rosea*'nın antimikrobiyal, antiinflamatuvar, kardiyovasküler, antiöstrojenik, sitotoksik, immünolojik ve immünomodülatör etkileri dahil olmak üzere birçok farmakolojik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Ahmad ve ark., 1998; Lin ve ark., 1999; Bonjar ve ark., 2004; Park ve ark., 2010; Guatem ve ark., 2015; Rezai ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016; Twaij ve ark., 2018, Qaralleh ve ark., 2020).

Bu çalışmada da *A. officinalis* L. nin yaprak ve yaprak sapı kullanılarak geliştirilen kalluslara UV-C uygulaması sonrasında elde edilen metanol ve etil asetat ekstraktlarının anti kanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımız literatür bulguları ile desteklenir niteliktedir.

Naz ve Anis (2012)'in *A. officinalis*'de eksojen hormon konsantrasyonu ve adenin sülfatın karşılıklı etkileşimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, üç farklı kallus oluşum fazı araştırılmış ve farklı yaprak segmentlerinden elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Çalışma sonucunda sıvı MS besin ortamında, ortama 15 μ M konsantrasyonda 2,4-D'nin eklenmesi ile etkili bir kallus gelişim protokolü oluşturulmuştur. Çalışmamızda da kallus gelişimini sağlamak amacı ile 2,4-D'nin 1 ve 2 mg/l'lik dozları kullanılmıştır. Aynı bitki büyüme düzenleyicisi kullanılarak benzer bir sonuç elde edilmiştir. Ancak çalışmamızda 2,4-D, bir sitokinin olan BAP ile birlikte kombine edilerek kullanıldığı gibi 2,4-D'nin kullanım miktarı da bahsedilen çalışmadan farklılık göstermektedir. Her iki çalışmanın benzer bir diğer yönü ise yaprağın eksplant kaynağı olarak kullanılmasıdır. Fakat biz çalışmamızda yaprağı ortadan ikiye ayırmak sureti ile eksplant kaynağı olarak kullanmışken, bahsedilen çalışmada yaprağın farklı segmentlerinin kullanımı söz konusudur. Bu durum da her iki çalışmayı birbirinden farklı kılmaktadır. *A. officinalis*'de etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü geliştirme ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada (Naz ve ark. (2015), bitkinin nod kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. BA, Kn ve 2-iP ile birlikte IBA, IAA ve NAA kombinasyonlarının MS besi ortamına ilave edilmesi ile etkili bir sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. Yapılan çalışmada sürgün oluşumunu sağlamak amacı ile farklı sitokinin ve oksin çeşitleri kullanılmış ve etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü elde edilmiştir. Çalışmamızda da bir sitokinin olan BAP bir oksin olan 2,4-D ile farklı konsantrasyonlarda birlikte kullanılarak etkili bir kallus gelişim protokolü elde edilmiştir. Ancak yapılan çalışmanın bir sürgün rejenerasyonu olması bizim çalışmamızın ise bir kallus geliştirme çalışması olması iki çalışmayı bir birinden ayırmaktadır.

Ayrıca her iki çalışmada kullanılan eksplantlarda bir birinden farklıdır. Yapılan çalışmada bitkinin nod kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmışken bu çalışmada bitkinin yaprak, yaprak sapı ve kök kısımlarının eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. *A. officinalis*'in *in vitro* üretimi üzerine, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi ile ilgili yapılan bir başka çalışmada (Mujib ve ark., 2017) bitkinin kök, nod ve yaprak kısımları

eksplant kaynağı olarak kullanılmış, ortama 2,4-D'nin ilave edilmesi ile kullanılan eksplantlardan kallus elde edilmiştir. En etkili kallus gelişimi %62'lik bir oran ile nod eksplantlarından, %39 luk bir oran ile yaprak eksplantlarından ve %27'lik bir oran ile kök eksplantlarından elde edilmiştir. Ancak ortama sadece 2,4-D değil aynı zamanda 0,5, 1 ve 2 mg/l oranında BAP ilave edilmiştir. Çalışmamızda da yapılan çalışmaya benzer şekilde 2,4-D ve BAP' ın birlikte kullanılması sonucunda etkili bir kallus gelişim protokolü elde edilmiştir. Bahsedilen çalışma ile çalışmamızda kullanılan bitki hormonları aynı olsa da, kullanılan konsantrasyonlar bir birinden farklılık göstermektedir. Ayrıca yapılan çalışmada en etkili kallus gelişim oranı nod eksplantından elde edilmişken, bizim çalışmamızda yaprak sapı kallus gelişimi açısından en verimli eksplant olarak belirlenmiştir. Her iki çalışmada da kök eksplantı kallus gelişimi açısından verimsiz bir eksplant kaynağı olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kök eksplantlarında en fazla %18 oranında kallus gelişimi gözlenirken, bahsedilen çalışmada ise bu oranın %27 olduğu görülmektedir. *A. rosea* 'nın sürgün uçlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada (Tyup ve ark., 2016) BAP, NAA, IBA ve IAA gibi farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile zenginleştirilmiş MS besin ortamında, dolaylı çoğaltma yolu ile etkili bir sürgün rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. En etkili sürgün geliştirme ortamının BAP ve NAA kombinasyonlarının kullanıldığı MS besin ortamının olduğu kaydedilmiştir. Çalışmamızda da 1 mg/l 2,4-D ile birlikte 0.25 mg/l oranında BAP' ın birlikte kullanılması sonucunda en etkili kallus gelişimi sağlanmıştır. Fakat bahsi geçen çalışma da kullanılan bitki her ne kadar bu çalışmada kullanılan bitki ile aynı cins içerisinde bulunsun da farklı türler olmaları iki çalışmayı birbirinden farklı kılmaktadır. Ayrıca bahsi geçen çalışma bir sürgün rejenerasyon çalışması olup çalışmamızın bir kallus geliştirme çalışması olması da iki çalışma arasındaki farklılıklardan bir diğeridir.

A. rosea 'nın kallogenenezisi ve organogenezisi üzerine yapılan bir çalışmada (Munir ve ark., 2012) oksin ve sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin değişik kombinasyonları ve konsantrasyonları kullanılmış, en fazla kallus oluşumunun oksinlerin tek başına kullanıldığı ortamlarda geliştiği tespit edilmiştir.

Sitokinin içeren besin ortamlarında ise en etkili sonuç BAP içeren ortamlarda elde edilmiştir. Çalışmamızda ise en etkili kallus gelişiminin 2,4-D ve BAP' ın birlikte kullanıldığı MS besin ortamında elde edilmesi, iki çalışmayı birbirinden farklı kıldığı gibi, çalışılan bitki

türlerinin farklı olması da, iki çalışmanın birbirinden farklı olmasını sağlamaktadır. *A. officinalis* ve *A. hirsute* ekstraktlarının anti bakteriyel aktivitelerini belirlemek amacı ile yapılmış bir çalışmada (Lin ve ark., 1999), her iki bitki ekstraktının antibakteriyel etki göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda da yaprak ve yaprak sapından elde edilen kalluslara UV-C uygulanmasının ardından, kallusların metanol ve etil asetat ekstraktları yapılmış ve bu ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu anlamda çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ile literatür bulguları birbirini destekler niteliktedir. *A. officinalis* ve *A. cannabina*'nın metanol özütlerinin antibakteriyel etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise (Ahmad ve diğerleri, 1998), her iki bitki ekstraktının inhibisyon meydana getirdiği gözlenmiştir. 52 farklı bakteri türü ile yapılan bu çalışmada kullanılan 17 bakteride çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çalışmamızda geliştirilen kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin olmaması her iki çalışmanın birbirinden farklı olmasına neden olmuştur. Bu durumun nedeni bahsedilen çalışmada direk bitkinin kullanılması bizim çalışmamızda ise bitkinin yaprak ve yaprak sapından geliştirdiğimiz kallusların kullanılmış olması olabilir. Bitkinin kendisi ile kallusların biyolojik aktif bileşiklerinin farklı olması böyle bir sonucun elde edilmiş olmasında etkili olabilir. Bu nedenle daha ayrıntılı çalışmalar yapılmalı ve doğal yetiştirme ortamından toplanmış olan bitki ile kallusların biyolojik aktif bileşiklerinin kıyaslanması gerekmektedir. *A. officinalis* çiçeklerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada (Bonjar, 2004), kullanılan patojen mikroorganizmaların bazıları üzerinde etkili bir antimikrobiyal aktivite gözlenmişken, bazıları üzerinde antimikrobiyal aktivitenin olmadığı vurgulanmıştır. Yaptığımız çalışmada da kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin olmadığına saptanması literatür bulguları ile desteklenmektedir. Ancak yapılan çalışmada bitkinin çiçeklerinden elde edilen ekstraktlar kullanılmışken, bizim çalışmamızda yaprak ve yaprak sapından geliştirilmiş ve UV-C uygulanmış, kallus ekstraktlarının kullanılmış olması iki çalışmanın birbirinden farklı olmasına neden olmuştur.

A. officinalis'in etanol, heksan, etil asetat ve su ekstraktlarının, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* bakterileri üzerinde ki antimikrobiyal aktivitelerinin disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak araştırıldığı çalışmada (Qaralleh ve ark., 2020), ekstraktların zayıf bir antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Özellikle

mikrodilüsyon yönteminin antimikrobiyal aktivite tayininde daha etkili bir yöntem olduğu vurgulanmıştır. Çalışmamızda da antimikrobiyal aktivite tayininde disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve yapılmış çalışmaya benzer bir sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda mikrodilüsyon gibi farklı bir antimikrobiyal aktivite ölçüm tekniğinin kullanılması belki de çalışma sonucunda daha olumlu sonuçlar almamıza neden olabilirdi. *A. officinalis* L.'nin hidroalkolik ekstraktlarının siprofloksasin, gentamisin ve penisilin antibiyotikleri ile karşılaştırmalı olarak *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* gibi patojenik bakterilerin yanı sıra klinik suşlar üzerinde ki antimikrobiyal aktivitelerinin ve yara iyileştirme potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada (Rezai ve ark., 2015). Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında disk difüzyon ve MIC yöntemleri kullanılmış, çalışma sonucunda ekstraktın gram negatif bakteriler üzerinde etkili olmamasına rağmen, gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerinde yaprak ve yaprak sapı kalluslarından elde edilen metanol ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin olmaması her iki çalışmanın birbirini kısmen desteklemesini sağlamıştır. Her iki çalışmada da gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır. Bir diğer fark ise, bizim çalışmamızda metanol ve etil asetat ekstraktları kullanılırken mevcut çalışmada hidroalkolik ekstraktın kullanılmasıdır. *A. officinalis*'in kök ekstraktlarının kullanılarak A549 hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada (Zhang ve ark., 2016) 25 mg/ml dozda ki kök ekstraktının oldukça etkili bir anti kanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da hem metanol hem de etil asetat ekstraktlarının oldukça etkili bir antikanser aktivite gösterdiği tespit edilmiş olup, bu durum aynı biyolojik aktif maddenin veya maddelerin kullanılan ekstraktlarda mevcut olabileceğini akla getirmektedir. Bu durum ayrıntılı kromatografik teknikler kullanılarak ortaya konulmalıdır. Ancak bahsi geçen çalışmada A549 hücreleri kullanılmışken biz çalışmamızda SH-SY5Y nöroblastoma kanser hücrelerini kullandık.

A. officinalis bitkisinin çiçek, yaprak ve kök kısımlarının su ekstraktları kullanılarak yapılan bir çalışmada (May ve Willuhn, 1985) ekstraktların %10'luk konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerinde inaktivasyon etkisi gösterdiğini belirlenmiştir. Çalışma bulgularımız da kullandığımız metanol ve etil asetat ekstraktlarının SH-SY5Y nöroblastoma kanser hücreleri üzerinde oldukça etkili bir inaktivasyona sahip olduğunu

göstermiştir. Her iki çalışma farklı kanser hücrelerinin kullanılması, farklı çözücüler kullanılarak ekstraksiyonun yapılması ve ekstre edilen bitki kısımlarının farklı olması konularından bir birinden farklılıklar göstermektedir. *A. officinalis* ve *A. esculentus* çiçek ve kök ekstraktlarının HeLa ve SK-Hep1 hücreleri üzerindeki anti kanser aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada (Park ve ark., 2010) her iki bitkinin antikanser aktivitelerinin olduğu gözlenmiştir. *A. officinalis*'in *Abelmoschus esculentus*' a kıyasla daha güçlü bir antikanser aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bitkinin tamamını kullanarak elde ettikleri ekstraktların anti kanser aktivitesinin, çiçek ve kök kısımlarına kıyasla daha etkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda da *A. officinalis*' in yaprak ve yaprak sapı kullanılarak geliştirilen, UV-C uygulaması yapılmış kallusların oldukça etkili bir anti kanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bahsi geçen çalışmada *A. officinalis*' in çiçek ve kök ekstraktlarının, HeLa ve SK-Hep1 kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmışken, bizim çalışmamızda *A. officinalis*' in yaprak ve yaprak sapı kullanılarak geliştirilen, UV-C uygulaması yapılmış kallusların metanol ve etil asetat ekstraktlarının, SH-SY5Y nöroblastoma kanser hücreleri üzerinde ki anti kanser aktivitesini araştırmamız çalışmaların bir birinde farklı olmasına neden olmuştur. *A. ludwigii* L.'nin toprak üstü kısımları kullanılarak, metanol ekstraktının elde edilip, MCF-7 hücrelerine karşı anti kanser aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, kullanılan bitki ekstraktının, MCF-7 kanser hücrelerine karşı oldukça etkili bir anti kanser aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Biyoaktif bileşen bakımından bitki ekstraktının rutin bakımından oldukça zengin olduğu, güçlü bir anti kanser aktivitesi bulunan rutinün böylesi bir etkinin oluşmasında rol oynamış olabileceğine dikkat çekilmiştir (Alshaya ve ark., 2019). Bu durum çalışmamızda kullandığımız ekstraktların güçlü bir anti kanser aktiviteye sahip olmalarının nedeni rutin içeriği bakımından zengin olabilirler mi? Ayrıca kalluslarda UV-C uygulanmadan önce ve UV-C uygulaması sonrasında rutin miktarındaki değişim nasıl olmaktadır? Sorularını akla getirmektedir. Bu soruların aydınlatılabilmesi için UV-C uygulaması öncesinde ve sonrasında kallusların rutin içerik analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Bahsedilen çalışmadaki bitki, çalışmamızda kullandığımız bitki ile aynı cins içerisinde yer alsa da farklı türler olmaları ve her iki çalışmada farklı kanser hücrelerinin kullanılması çalışmaların birbirinden farklı olmalarına neden olmuştur. *A. officinalis*'de bol miktarda bulunan skopoletin (7-hidroksi-6-metoksi kumarin) tümoral lenfosit etkisini yok ederek anti kanser aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Ding ve ark., 2008). Çalışmamızda da

kullandığımız ekstraktların etkili bir anti kanser aktivite göstermelerinin nedeni skopoletin içeriğinin yüksek olması mıdır? Bu durum çalışmada kullanılan ekstraktların biyolojik aktif bileşen içerikleri kapsamlı bir şekilde çalışılarak ortaya konabilir. Sonuç olarak bu çalışma ile *Althaea officinalis* L. bitkisine ait tohumları, *in vitro* ortamda kültüre alabilmek için etkili bir sterilizasyon protokolü geliştirilmiş, ardından çimlenme güçlüğü ile karşılaşıldığı için etkili bir çimlenme ortamı oluşturulmaya çalışılmıştır. *In vitro* ortamda gelişen bitkilerin yaprak, yaprak sapı ve kök kısımları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve etkili bir kallus rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Kallus gelişimi için en etkili ortamın 1 mg/l 2,4-D ve 0,25 mg/l BAP içeren MS besin ortamı olduğu, kallus gelişimi için en verimli eksplantın ise yaprak sapı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen kalluslara UV-C uygulamasının ardından bu kalluslardan metanol ve etil asetat ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve anti kanser aktiviteleri araştırılmış, kullanılan ekstraktların etkili bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları ancak güçlü bir antikanser aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar prokaryot bir hücre yapısına sahip iken, çalışmada kullandığımız kanser hücrelerinin ökaryotik bir hücre yapısına sahip olması böyle bir sonucun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir. Çalışmada kullandığımız ekstraktların biyolojik aktif bileşen içeriğini bilmememiz bir eksiklik oluşturmakla birlikte ileride bu konu ile ilgili yapılacak çalışmalara yeni kapılar açmaktadır. Çünkü rutin ve skopoletin içerik analizlerinin yapılmasının ardından normal bitki ile kullanılan kalluslar bu iki bileşen, hatta farklı bileşen içeriklerinin, UV-C uygulaması öncesinde ve UV-C uygulaması sonrasında bir birleri ile kıyaslama fırsatı oluşturulmuştur. Bu bileşenlerin prokaryotik ve ökaryotik hücreler üzerinde nasıl bir etki gösterebileceği sorusu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

Aboaba OO, Smith SI, Olude FO (2006) Antibacterial effect of edible plant extract on *Escherichia coli*. Pakistan Journal of Nutrition 5(4): 325-327

Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F (1998) Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal of Ethnopharmacol 62: 183–193

Akgül A (2018) İpek yolu üzerinde kültürlerin yaşadığı bir şehir olan Midyat'ta (Türkiye) etnobotanik bir çalışma. Etnobiyoloji ve Etnotıp Dergisi 14.1: 12

Ali Şah SM, Akhtar N, Akram M, Akhtar SP, Saeed T, Ahmed K, Asif HM (2011) *Althaea officinalis* L.'nin Tıbbi Faaliyetleri. Araştırma Dergisi (24): 5662-5666

Al-Snafi AE (2013) The Pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and a review. International Journal of PharmTech Research 5(3): 1387-1385

Altan A (2001) Özel gıdalar teknolojisi. 3. Baskı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Adana Genel Yayın No: 178

Arab A, Yazdian RR, Rezaei SH, Ehtesham GM, Soltani F (2017) Evaluation of neuroprotective effect of *Althaea Officinalis* flower aqueous and methanolic extracts against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences (13)1: 49 – 56

Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (2001) Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, s. 374

Baytop T (1984) Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayın no: 3637, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, s. 240-376

Benli M, Yiğit N (2005) Ülkemizde yaygın kullanımı olan kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 3(8): 1-9

Bigot C (1987) *In Vitro* manipulation of higher plants: some achievements, problems and perspectives the international association of peacekeeping training centres (iaptc) french-british meeting France: The International Association of Peacekeeping Training Centres s. 5-17

Bodeker G (2002) Tıbbi bitkiler: sürdürülebilirlik ve güvenliğe doğru; idrc şifalı bitkiler global network wocmap için sponsorlu tartışma belgesi. Tayland: Chiang Mai

Bonjar Sb (2004) Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used. Iran Journal of Ethnopharmacol 94: 301-305

Changizi AS, Yarmohammadi P, Hosseini N, Salehi I, Ramazani M (2015) The effect of *Althaea officinalis*.L root alcoholic extract on blood sugar level and lipid profiles of streptozotocin induced-diabetic rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 17(3): 238 - 250

Davis PH (1984). Flora of turkey and east aegean islands. University Press. Edinburgh, s. 8

Deshpande HA, Chalse MN, Bhalsing SR (2010) Bitkisel Tıp ve Toksikoloji Dergisi 4: 119-122

Ding Z, Dai Y, Hao H, Pan R, Yao X, Wang Z (2008) Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying mechanisms. Pharmaceutical Biology 46(12): 854–860

Diplock A (1998) Healty lifestyles nutrition and physical aktivite:antioxidant nutritiens. europe consice monograph series Belgium, s. 59

Djipa CD, Delmee M, Quetin-Leclercq P (2000): Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* L. Journal of Ethnopharmacology 71: 307–313

Elmastas M, Ozturk L, Gokce I, Erenler R, Aboul-Enein HY (2004) Detremination of antioxidant activity of marshmallow flower (*Althaea officinalis*). Analytical Lett, 37: 1859-1869

Eren E (2011) Bazı soğansı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, s. 20

Essam Z, Alshaya H, Kadhim EJ, Sahib HB (2019) Antiproliferative activities of *Althaea ludwigii* L. extract on michigan cancer foundation-7 breast cancer cell line. Journal of Applied Biology and Biotechnology 7(3): 9-11

Faisal M, Ahmad N, Anis M (2007) Bitki biyoteknolojisi raporları, flavonoitler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 1(1): 47-58

Faisal M, Anis M (2003) Bitki Hücre Dokusu ve Organ Kültürü 75:125-129

Fatemeh K, Khosro P (2013) *In vitro* cytotoxic activity of aqueous root extract of *Althea kurdica* against endothelial human bone marrow cells (line k562) and human lymphocytes. Bulletin of Environment. Pharmacology and Life Sciences 2(6): 23-29

Gautam SSN, Kumar S, Chauhan R (2015) Antimicrobial efficacy of *Althaea officinalis* linn. seed extracts and essential oil against respiratory tract pathogens. Journal of Applied Pharmaceutical Science 5(9): 115-119

Giugliano D (2000) Dietary Antioxidants for cardiovascular prevention. nutrition metabolism and cardiovascular disease 10: 38-44

Gudej J (1991) *Planta Medica*, 57: 284-285

Han BH, Paek KY, Choi JK (1991) *Kore Bahe Kltrleri Derneği Dergisi* 32: 394-400

Hoareau L, Da Silva E (1999) *EJB Elektronik Biyoteknoloji Dergisi* 2: 56-70

Horta E, Evren E, Altunay F, Kuyucu U, Ergen O (2016) *Staphylococcus aureus* izolatlarında metisilin direncinin disk difüzyon, kromojenik besiyeri, gradient difüzyon testi ve oksasilin agar tarama yöntemleriyle araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 46(1): 40-46

Jang PHW, Lee HK, Lee KS, Jin D (2010) Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities in *Abelmoschus esculentus* and *Althaea officinalis*. *The Korean Society of Medicinal Crop Science* 83(2): 447-448

Kalkan ř (2017) Bitkisel rnlerle Tedavilerde İlaç Etkileşmeleri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* (31)1: 41-50

Kim J, Marshall MR, Wie C (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839–2845

Kırbağ S, Zengin F (2006) Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 16(2): 77-80

Kucukoner M, Bilge Z, Isıkdogan A, Kaplan MA, Inal A, Urakci Z (2013) Complementary and alternative medicine usage in cancer patients in southeast of Turkey. *Africa Journal of Traditional Complement Alternatif Medicine* 10:21-25

Lewington A (1993) Tıbbi bitkiler ve bitki zleri, bir trafik ağı raporu. Cambridge: Uluslararası Trafik

Lin J, Opoku AR, Geheeb-Keller M, Hutchings AD, Terblanche SE, Jager AK, Van Staden J (1999) Preliminary screening of some traditional zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacol* 68: 267–274

May G, Willuhn G (1985) Antiviral activity of aqueous extracts from medicinal plants in tissue cultures. *Arzneim-Forsch* 28(1): 1-7

Merrily A (2002) Kuhn RN. Herbal remedies: drug-herbal interactions. *Critical Care Nurse* 22:22-35

Munir M, Hussain I, Ul-Haq R, Qureshi M, Munazir M, Arshad MKL (2012) Callogenesis potential of cotyledonary explants of *Althaea Rosea* L. from Pakistan *Pakistan Journal of Botany* 44: 271-275

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497

Naz R, Anis M (2012) Acceleration of adventitious shoots by interaction between exogenous hormone and adenine sulphate in *Althaea officinalis* L. Applied Biochemistry Biotechnol 168:1239–1255

Naz R, Anis M, Aref IM (2015) Management of cytokinin–auxin interactions for in vitro shoot proliferation of *Althaea officinalis* L. a valuable medicinal plant. Rend. Fis. Acc. Lincei 26:323–334

Pehlivan M, Güleriyüz, M (2004) Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. Bahçe 33(2): 51-57

Pierik RLM (1987) *In vitro* culture of higher plants. martinus nijhoff publishers. Dordrecht The Netherlands

Pipal MT, Ali M, Tonk D, Zafar N, Gulzar B (2017) *In Vitro* propagation of *Althaea officinalis* the role of plant growth regulators in morphogenesis. Biotechnologia 98(3): 167-173

Qaralleh H, Al-Limoun MO, Khlaifat A, Khleifat KM, Al-Tawarah N, Alsharafa KY, Harirah HAA (2020) Antibacterial and antibiofilm activities of a traditional herbal formula against respiratory infection causing bacteria. Tropical Journal of Natural Product Research 4(9):527-534

Rahavan V (1980) Embryo culture. in: vasil IK (ed), perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, s. 209-236

Rezaei M, Dadgar Z, Zadeh AN, -Namin SAM, Pakzad I (2015) Elham davodian, evaluation of the antibacterial activity of the *Althaea Officinalis* L. leaf extract and its wound healing potency in the rat model of excision wound creation. Avicenna Journal of Phytomedicine 5(2): 105-112

Sezgin FM, Sevim E, Sevim A (2019) *Enterokok* suşlarında antibiyotik duyarlılığı: clsi ve eucast disk difüzyon klinik sınır değer yorumlarının karşılaştırılması. Klimik Dergisi 32(1): 35-9

Shah SMA, Akhtar N, Akram M, Shah PA, Saeed T, Ahmed K, Asif HM (2011) Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L., Journal of Medicinal Plants Research 5(24): 5662-5666

Sleiman RH, Mroueh M, Daher CF (2011) Pharmacological evaluation of aqueous extract of *Althaea officinalis* flower grown in Lebanon. Pharmaceutical Biology 49(3): 327–333

Tulunay M, Aypak C, Yikilkan H, Gorpelioglu S (220) Herbal medicine use among patients with chronic diseases. Journal of Intercult Ethnopharmacol, s. 215-217

Twaij BM, Alwan AH (2018) Anti-Fungal Activity of *Althaea officinalis* L. tissue culture extracts. Plant Archives18 (2): 2053-2057

Tyub S, Kamili AN, Bhat MM (2016) In vitro propagation of *Althaea rosea* - a valuable medicinal plant of Kashmir Himalaya. Journal of Nature and Natural Sciences 1(5): 1-4

www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/.../bilesenler_2_fenolikler.pdf (20.03.2021)

Yağcı C, Toker MC, Toker G (2008). Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 1(1): 47-58

Zhang Y, Kong F, Zhang L, Li C, Zhang R (2016) Modulatory effect of *Althaea officinalis* l root extract on cisplatin-induced cytotoxicity and cell proliferation in A549 human lung cancer cell line. Tropical Journal of Pharmaceutical Research (12): 2647-2652

