

**T.C.**  
**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN *Dactylorhiza romana* subsp.  
*georgica* YUMRULARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS**

**Buğra BOZKIR**

**TEMMUZ-2022**  
**GÜMÜŞHANE**



**T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN *Dactylorhiza romana* subsp.  
*georgica* YUMRULARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT EXTRACTION  
METHODS ON SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Dactylorhiza romana*  
subsp. *georgica* TUBERS**

**YÜKSEK LİSANS**

**Buğra BOZKIR**

**TEMMUZ-2022  
GÜMÜŞHANE**



T.C.  
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN *Dactylorhiza romana* subsp.  
*georgica* YUMRULARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT EXTRACTION  
METHODS ON SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Dactylorhiza romana*  
subsp. *georgica* TUBERS

YÜKSEK LİSANS

Buğra BOZKIR

Danışman: Doç. Dr. Tuba ACET  
İkinci Danışman: Doç. Dr. Kadriye ÖZCAN

TEMMUZ-2022  
GÜMÜŞHANE



## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

**Yüksek Lisans Tezi** olarak hazırlamış olduğum “**Farklı Ekstraksiyon Yöntemlerinin *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* Yumrularının Bazı Biyolojik Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmalarını kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğum intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

20/07/2022

.....  
**Buğra BOZKIR**

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmalarım boyunca, değerli katkıları, bilgileri ve destekleri için Tez Danışmanlarım Doç. Dr. Tuba ACET ve Doç. Dr. Kadriye ÖZCAN'a şükranlarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarım sırasında plazmit DNA çoğaltımı ve saflaştırılmasında değerli katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN'e teşekkür ederim. Tüm tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Gümüşhane Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından, GÜBAP2907: Lisansüstü Öğrenci Destek Programı (proje no: 21.E0102.07.03) dâhilinde desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Gümüşhane Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

**Buğra BOZKIR**  
**GÜMÜŞHANE - 2022**

## ÖZET

Orkide (*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*: *Drg*) Anadolu'da yayılış göstermektedir. Bu bitki bölge halkı tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda söz konusu bitkinin çeşitli biyolojik aktiviteleri kısmen araştırılmış olsa da bilimsel veriler ışığında biyolojik özellikleri ayrıntılarıyla ortaya konulmamıştır. Bu çalışmada, orkide yumrularından farklı ekstraksiyon metodları kullanılarak elde edilen ekstraktlarının antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibisyon ve DNA koruyucu aktivitesiyle, fenolik içeriğinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bitki yumrularının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için FRAP, DPPH, ABTS metodları kullanılmıştır ve toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için fosfomolibdat yöntemi tercih edilmiştir. Enzim inhibisyon aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. *Drg* ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitesi mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bununla birlikte, bitkinin fenolik içeriği HPLC ile analiz edilmiştir. Ekstrelerin DNA koruyucu aktivitesi pUC19 plazmit DNA kullanılarak agaroz jel elektroforezi ile ortaya konulmuştur. Elde edilen bulgular, her ekstrenin çeşitli biyolojik aktiviteler sergilediği ortaya koyduğunu göstermiştir. Buna göre en etkili biyoaktivitenin, kuru yumrulara ait 24 saat çalkalayıcı ve 24 saat çalkalayıcı ardından 60 dakika ultrasonik banyoda hazırlanan ekstrelerde olduğu görülmüştür. HPLC sonuçlarına göre *Drg* ekstrelerinde en yüksek fenolik bileşen *p-hidroksibenzoik asit* olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, orkide yumrularının farklı ekstraksiyon yöntemlerine göre biyolojik aktivitelerinin değiştiği saptanmıştır. Buna göre, *Drg* yumrularının sergilediği biyolojik aktiviteler göz önünde bulundurulduğunda, gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanıma potansiyelinin yüksek olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal, Antioksidan, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*, DNA koruyucu aktivite, Orkide

## SUMMARY

Orchid (*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*: *Drg*) spreads in Anatolia. This plant is consumed by the local people for various purposes. Even if some biological activities of this orchid have been previous partially studies, its biological features have not been bring out in detail in the based on scientific data. It was purposed to enlighten the phenolic content, enzyme inhibition, antioxidant, antimicrobial and DNA protective activities of the extracts obtained using various extraction processes. In this research to determine antioxidant properties of plant tubers, FRAP, DPPH, ABTS assays were used, and the phosphomolybdate assay was preferred to detect the total antioxidant capacity. Enzyme inhibition activity was determined spectrophotometrically. Also, the phenolic ingredient of the orchid tubers was analyzed via HPLC. The antimicrobial activity of the *Drg* extracts were revealed by microdilution method. The DNA protective properties of the *Drg* extracts were demonstrated with agarose gel electrophoresis. The findings showed that each extract displayed different biological activities. Accordingly, it was observed that the most effective bioactivity was in the extracts of dry tubers prepared in a shaker for 24 hours and a shaker for 24 hours, followed by an ultrasonic assist for 60 minutes. In compliance with HPLC findings, *p-hydroxybenzoic acid* was the major phenolic component in the *Drg* extracts. Finally, it was determined that the biological activities of *Drg* changed according to varried extraction methods. So, considering biological properties exhibited by *Drg*, it can be declare that it has a high potential for use some sectors such as pharmaceutical and food.

**Keywords:** Antimicrobial, Antioxidant, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*, DNA protective activity, Orchid

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                               |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                                                           | III  |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....                                                           | IV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                 | V    |
| ÖZET.....                                                                                     | VI   |
| SUMMARY .....                                                                                 | VII  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                             | VIII |
| TABLOLAR DİZİNİ .....                                                                         | XI   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                          | XII  |
| EKLER DİZİNİ.....                                                                             | XIV  |
| 1. GENEL BİLGİLER .....                                                                       | 1    |
| 1.1. Giriş.....                                                                               | 1    |
| 1.2. Çalışmanın Amacı.....                                                                    | 3    |
| 1.3. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> Bitkisiyle İlgili Genel Bilgiler ..... | 3    |
| 1.4. Bitkisel Sekonder Bileşikler.....                                                        | 5    |
| 1.4.1. Fenolik Bileşikler .....                                                               | 6    |
| 1.5. Serbets Radikaller ve Oksidatif Stres.....                                               | 7    |
| 1.5.1. Oksidatif Stres .....                                                                  | 9    |
| 1.6. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları .....                                               | 10   |
| 1.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması .....                                               | 11   |
| 1.7. Mikroorganizmalar.....                                                                   | 12   |
| 1.8. Antimikrobiyal Ajanlar .....                                                             | 16   |
| 1.9. DNA ve DNA Hasarı .....                                                                  | 18   |
| 1.9.1. DNA Tamir Mekanizmaları .....                                                          | 20   |
| 1.9.2. pUC19 Plazmit DNA .....                                                                | 20   |
| 1.10. Enzim İnhibisyon Çalışmaları.....                                                       | 21   |
| 1.10.1. Alfa Amilaz (E.C:3.2.1.1) .....                                                       | 22   |
| 1.10.2. Alfa Glukozidaz (E.C:3.2.1.20) .....                                                  | 23   |
| 1.10.3. Tirozinaz (E.C 1.14.18.1).....                                                        | 24   |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....                                                                   | 26   |
| 2.1. Materyal .....                                                                           | 26   |
| 2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.....                                              | 26   |
| 2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....                                  | 26   |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2. Metot .....                                                                                           | 28 |
| 2.2.1. Bitki Yumrularının Ekstraksiyona Hazırlanması ve Ekstraksiyon İşlemi .....                          | 28 |
| 2.3. Toplam Fenolik İçeriğin Belirlenmesi .....                                                            | 30 |
| 2.4. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi .....                                                        | 30 |
| 2.5. Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi.....                                                    | 31 |
| 2.6. Antioksidan Aktivite Belirleme Deneyleri .....                                                        | 33 |
| 2.6.1. ABTS Radikal Süpürücü Aktivitesinin Belirlenmesi .....                                              | 33 |
| 2.6.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi .....                                               | 34 |
| 2.6.3. FRAP Demir İndirgeme Gücü Aktivitesi.....                                                           | 35 |
| 2.7. Ekstraktların Enzim İnhibisyon Aktiviteleri ( $\alpha$ -amilaz ve $\alpha$ -glukozidaz): .....        | 35 |
| 2.7.1. Alfa Glukozidaz Enzim İnhibisyon Yöntemi.....                                                       | 36 |
| 2.7.2. Alfa Amilaz Enzim İnhibisyon Yöntemi .....                                                          | 37 |
| 2.7.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyon Yöntemi.....                                                             | 38 |
| 2.8. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi: .....                                                          | 38 |
| 2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi..... | 41 |
| 2.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Analizleri.....                                                            | 42 |
| 2.11. İstatistiksel Analiz .....                                                                           | 42 |
| 3. BULGULAR .....                                                                                          | 43 |
| 3.1. Ekstrakt Verimi .....                                                                                 | 43 |
| 3.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları .....                                                           | 43 |
| 3.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları .....                                                         | 44 |
| 3.4. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları .....                                                    | 45 |
| 3.4.1. Fosfomolibdat Yöntemi Tayini Sonuçları.....                                                         | 45 |
| 3.5. Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları .....                                                           | 47 |
| 3.5.1. ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini Sonuçları .....                                               | 47 |
| 3.5.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini Sonuçları.....                                                | 48 |
| 3.6. FRAP (Demir(III) İndirgeyici) Tayini .....                                                            | 50 |
| 3.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları .....                                                        | 51 |
| 3.7.1. Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları.....                                                                | 51 |
| 3.8. Enzim İnhibisyon Tayini Sonuçları .....                                                               | 53 |
| 3.8.1. Alfa Glukozidaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları .....                                                   | 53 |
| 3.8.2. Alfa Amilaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları .....                                                       | 54 |
| 3.8.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyon Sonuçları .....                                                          | 54 |
| 3.9. DNA Koruyucu Aktivite Sonuçları.....                                                                  | 55 |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 3.10. HPLC Analizi ile Fenolik Madde İçeriği Sonuçları..... | 56 |
| 4. TARTIşMA .....                                           | 58 |
| 4.1. Toplam Fenolik İçerik (TPC).....                       | 58 |
| 4.2. Toplam Flavonoid İçerik (TFC).....                     | 59 |
| 4.3. Toplam Antioksidan Kapasitesi .....                    | 60 |
| 4.4. Antioksidan aktivite .....                             | 60 |
| 4.5. Enzim İnhibisyon Aktivitesi .....                      | 61 |
| 4.6. Antimikrobiyal Etkinlik .....                          | 63 |
| 4.7. Fenolik Bileşen Analizi.....                           | 63 |
| 4.8. DNA Koruyucu Aktivite .....                            | 64 |
| 5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME .....                             | 66 |
| KAYNAKÇA.....                                               | 67 |
| EKLER.....                                                  | 82 |
| ÖZGEçMİş .....                                              | 88 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Antimikrobiyal testlerde kullanılan mikroorganizmalar .....                              | 13 |
| Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar .....                                                      | 26 |
| Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler .....                                           | 27 |
| Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan ekstraksiyon yöntemleri .....                                | 28 |
| Tablo 5. Toplam fenolik madde analizi için deney tasarımı .....                                   | 30 |
| Tablo 6. Toplam flavonoid madde tespiti için deney tasarımı .....                                 | 31 |
| Tablo 7. Toplam antioksidan kapasite tespiti için deney tasarımı .....                            | 32 |
| Tablo 8. ABTS radikali giderme aktivite tespiti için deney tasarımı .....                         | 33 |
| Tablo 9. DPPH radikali süpürme aktivite tespiti için deney tasarımı .....                         | 34 |
| Tablo 10. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> yumrularının ekstrakt verimleri ..... | 43 |
| Tablo 11. Toplam fenolik madde miktarı bulguları .....                                            | 43 |
| Tablo 12. Toplam toplam flavonoid madde miktarı bulguları .....                                   | 44 |
| Tablo 13. Toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat) bulguları .....                             | 45 |
| Tablo 14. Antioksidan aktivite (ABTS) bulguları ve IC <sub>50</sub> değerleri .....               | 47 |
| Tablo 15. Antioksidan aktivite (DPPH) bulguları ve IC <sub>50</sub> değerleri .....               | 48 |
| Tablo 16. Antioksidan aktivite (FRAP) bulguları .....                                             | 51 |
| Tablo 17. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (MİK) bulguları .....                               | 52 |
| Tablo 18. Ekstrelerin enzim inhibitör ( $\alpha$ -glukozidaz) aktiviteleri .....                  | 53 |
| Tablo 19. Ekstrelerin enzim inhibitör ( $\alpha$ -amilaz) aktiviteleri .....                      | 54 |
| Tablo 20. Ekstrelerin enzim inhibitör (Tirozinaz) aktiviteleri .....                              | 55 |
| Tablo 21. Ekstrelerin fenolik bileşen içeriği .....                                               | 57 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Doğal ortamında <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> .....                                                                                                            | 4  |
| Şekil 2. <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisine ait çatal biçimli yumrular .....                                                                                                 | 5  |
| Şekil 3. Fenol yapısı.....                                                                                                                                                                  | 7  |
| Şekil 4. Oksidatif stres hasarı.....                                                                                                                                                        | 10 |
| Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması .....                                                                                                                                           | 12 |
| Şekil 6. pUC19 plazmit DNA .....                                                                                                                                                            | 21 |
| Şekil 7. Nişastanın glukoza parçalanması.....                                                                                                                                               | 23 |
| Şekil 8. $\alpha$ - Glukozidaz enziminin nişasta ile etkileşimi .....                                                                                                                       | 24 |
| Şekil 9. Tirozinden melanin oluşumu .....                                                                                                                                                   | 24 |
| Şekil 10. Ekstraksiyon işlemi.....                                                                                                                                                          | 29 |
| Şekil 11. Petrilerde transformasyon sonucu oluşan mavi renkli koloniler. ....                                                                                                               | 40 |
| Şekil 12. Çoğaltılan pUC19 plazmitine ait jel görüntüsü .....                                                                                                                               | 40 |
| Şekil 13. HPLC analizi için araştırılan standart maddelere ait kromotogram.....                                                                                                             | 42 |
| Şekil 14. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin gallik asite eşdeğer, fenolik madde miktarları .....                        | 44 |
| Şekil 15. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin kuersetine eşdeğer flavonoid madde miktarları. ....                         | 45 |
| Şekil 16. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin askorbik asite eşdeğer fosfomolibdat bulguları .....                        | 46 |
| Şekil 17. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin troloksa eşdeğer fosfomolibdat bulguları.....                               | 46 |
| Şekil 18. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin askorbik asite eşdeğer ABTS bulguları.....                                  | 47 |
| Şekil 19. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin troloksa eşdeğer ABTS bulguları.....                                        | 48 |
| Şekil 20. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin ve standartların ABTS aktivitesine ilişkin IC <sub>50</sub> değerleri. .... | 48 |
| Şekil 21. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin askorbik asite eşdeğer DPPH bulguları.....                                  | 49 |
| Şekil 22. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i><br>ekstrelerinin troloksa eşdeğer DPPH bulguları.....                                        | 50 |

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 23. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> ekstralarının ve standartların DPPH aktivitesine ilişkin IC <sub>50</sub> bulguları ..... | 50 |
| Şekil 24. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> ekstralarının troloksa eşdeğer FRAP bulguları .....                                       | 51 |
| Şekil 25. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> ekstralarının enzim inhibitör ( $\alpha$ -glukozidaz) aktiviteleri .....                  | 53 |
| Şekil 26. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> ekstralarının enzim inhibitör ( $\alpha$ -amilaz) aktiviteleri .....                      | 54 |
| Şekil 27. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> ekstralarının enzim inhibitör ( tirozinaz ) aktiviteleri .....                            | 55 |
| Şekil 28. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstraların (20 mg/ml) DNA koruyucu aktiviteleri .....                  | 56 |
| Şekil 29. Fenolik madde tayini için gallik asit standart grafiği.....                                                                                                                    | 82 |
| Şekil 30. Flavonoid madde tayini için kuersetin standart grafiği.....                                                                                                                    | 82 |
| Şekil 31. Fosfomolibdat testi için askorbik asit standart grafiği.....                                                                                                                   | 83 |
| Şekil 32. Fosfomolibdat testi için troloks standart grafiği .....                                                                                                                        | 83 |
| Şekil 33. ABTS için askorbik asit standart grafiği.....                                                                                                                                  | 84 |
| Şekil 34. ABTS için troloks standart grafiği.....                                                                                                                                        | 84 |
| Şekil 35. DPPH için askorbik asit standart grafiği.....                                                                                                                                  | 85 |
| Şekil 36. DPPH için troloks standart grafiği.....                                                                                                                                        | 85 |
| Şekil 37. FRAP için troloks standart grafiği .....                                                                                                                                       | 86 |
| Şekil 38. Alfa amilaz ve alfa glukozidaz için akarboz standart grafiği .....                                                                                                             | 86 |
| Şekil 39. Trozinaz için baicalein standart grafiği.....                                                                                                                                  | 87 |

## EKLER DİZİNİ

|                     |    |
|---------------------|----|
| Ek 1. Şekiller..... | 82 |
|---------------------|----|



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 24h                           | : 24 saat çalkalayıcı                                     |
| 24h+30'US                     | : 24 saat çalkalayıcı+30 dk ultrasonik su banyosu         |
| 24h+60'US                     | : 24 saat çalkalayıcı+60 dk ultrasonik su banyosu         |
| 30'US                         | : 30 dk ultrasonik su banyosu                             |
| 60'US                         | : 60 dk ultrasonik su banyosu                             |
| AAE                           | : Askorbik asit eşdeğeri                                  |
| ABD                           | : Amerika Birleşik Devletleri                             |
| ABTS                          | : 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)    |
| AEkstre                       | : Yumru ekstresinin absorbans değeri                      |
| AKontrol                      | : Kontrol absorbans değeri                                |
| ATCC                          | : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu                         |
| ATP                           | : Adenozin trifosfat                                      |
| BAE                           | : Baicalain eşdeğeri                                      |
| Bp                            | : Baz çifti                                               |
| BSM                           | : Bitkisel sekonder metabolitler                          |
| DMSO                          | : Dimetilsülfoksit                                        |
| DNA                           | : Deoksiribo Nükleik Asit                                 |
| DPPH                          | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                            |
| DSMZ                          | : Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu |
| DW                            | : Kuru ağırlık                                            |
| E                             | : Etanol ekstresi                                         |
| ETZ                           | : Elektron transport sistemi                              |
| FRAP                          | : Demir iyonu indirgeyici                                 |
| GAE                           | : Gallik asit eşdeğeri                                    |
| GSH                           | : Glutatyon                                               |
| GSH-Px                        | : Glutatyon peroksidaz                                    |
| GÜ                            | : Giresun Üniversitesi                                    |
| H                             | : Hidrojen                                                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit                                       |
| HCL                           | : Hidroklorik asit                                        |
| HO•                           | : Hidroksil radikali                                      |
| HPLC                          | : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                 |

|        |                                                        |
|--------|--------------------------------------------------------|
| IPTG   | : İzopropil $\beta$ -d-1-tiyogalaktopiranosid          |
| Kb     | : Kilobayt                                             |
| MHA    | : Müller Hinton Agar                                   |
| MHB    | : Müller Hinton Broth                                  |
| MİK    | : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu                    |
| MSC    | : Çoklu Klonlama Bölgesi                               |
| NO-    | : Nitrik oksit                                         |
| O•2    | : Süper oksit anyon radikali / Singlet oksijen         |
| OD     | : Optik Yoğunluk                                       |
| OH-    | : Hidroksil anyonu                                     |
| QE     | : Kuersetin eşdeğeri                                   |
| RNA    | : Ribo Nükleik asit                                    |
| RNT    | : Reaktif Nitrojen Türleri                             |
| ROS    | : Reaktif Oksijen Türleri                              |
| SM     | : Sekonder metabolitler                                |
| SOD    | : Süperoksit dismutaz                                  |
| spp.   | : Türler                                               |
| subsp. | : Alt tür                                              |
| TAE    | : Tris-Acetate-EDTA                                    |
| TE     | : Troloks eşdeğeri                                     |
| UV     | : Ultra viyole                                         |
| X-GAL  | : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside   |
| YETEM  | : Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi |
| WHO    | : Dünya sağlık örgütü                                  |

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

İnsanoğlu varoluşundan beri şifalı bitki türlerini araştırmıştır ve bunların pek çoğunu çeşitli hastalıkları iyileştirmek için veya gıda amaçlı olarak kullanmıştır (Cowan, 1999; Petrovska vd., 2012). Zaman içerisinde, bu bitkiler yeni ilaçların geliştirilmesinde de ilham kaynağı olmuştur (Verma vd., 2016). Çünkü bitkiler onlara şifalı özelliklerini kazandıran bazı sekonder metabolitlere sahiptir (Guru vd., 2021). Bu metabolitler, bitkilerde farklı biyosentez yollarıyla oluşturulan, azot içeren bileşikler (siyanojenik glikozitler, alkaloidler ve glukozinolatlar), fenolik bileşikler (flavonoidler ve fenilpropanoidler) ve terpenler (izoprenoidler) gibi üç ana gruba ayrılmaktadır. Sekonder metabolitler, ilaç öncül maddeleri olarak ele alınabilmektedir (Fang vd., 2011). Özellikle sentetik maddelerin kullanılmasından kaynaklı yan etkiler göz önüne alındığında, daha güvenilir, daha ucuz ve ulaşılabilir alternatif doğal kaynaklardan biri olan bitkilere yönelim artırmıştır (Naveen vd., 2021). Bitkilerdeki fitokimyasal yapı, farmakolojik etkiler bakımından keşfedilmeyi bekleyen eşsiz bir kaynak sunmaktadır. Dünyanın pek çok yerinde, bitkilerin farklı kısımları (yapraklar, çiçekler, meyveler, rizomlar, yumrular, kökler, saplar ve ağaç kabukları), ekstraktlar veya karışımlar halinde kullanılmaya devam edilirken; bunların bilimsel verilerle olası etkilerinin doğrulanması gerekliliği de doğmuştur.

Modernleşme ve buna özgü yaşam biçimlerinin oluşması ile günümüzde pek çok rahatsızlık ortaya çıkmıştır. Özellikle içinde bulunduğumuz Covid-19 salgın süreci insanlar üzerinde önemli ölçüde strese neden olmuştur (Bhuiyan vd., 2021). Stres, hücresel dengeyi bozarak, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olan önemli bir faktördür (Sun vd., 2022). Bu durum başta diyabet olmak üzere pek çok metabolik rahatsızlığa neden olmaktadır (Özcan, 2019). Bunlara ek olarak küresel iklim değişikliğinin en şiddetli biçimde hissedildiği günümüzde UV ışınlarına bağlı olarak ileri pigmentasyon ve bunun sonucu gelişen ciddi rahatsızlıklar ortaya çıkmıştır (Liu vd., 2022). Diğer taraftan, dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonel hastalıklar artmıştır (Çicek vd., 2013). Söz konusu bu problemleri ortadan kaldırabilmek veya hafifletebilmek için yan etkileri olan sentetik ilaçlara göre daha güvenli, ekonomik, doğal yeni alternatif çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır (Özcan, 2021). Bu yüzden, geçmişte kullanılan doğal yöntemler bilim insanlarına ilham kaynağı olmuştur.

Bu manada, eski çağlardan beri halk tarafından hem görsel güzelliği ile dikkat çeken, hem de gerek gıda olarak tüketilen gerekse tıbbi özellikleri sayesinde sayısız rahatsızlığı tedavi etmek amacıyla kullanılan orkideler ön plana çıkmaktadır (Ahmed vd., 2021; Hossain, 2011).

Türkiye, coğrafi konumu ve farklı iklim koşulları nedeniyle zengin bir floraya sahiptir ve bu durum orkide türlerinin çeşitliliğine de yansımıştır (Polat vd., 2018). Çiçekli bitkilerin en büyük ve en gelişmiş ailesi olan Orchidaceae, 750 ila 850 cins altında 25.000 ila 35.000 tür içermektedir (Dressler, 1993; Hossain, 2011; Singh vd., 2001). Buzlu Antarktika ve sıcak çöller dışında dünyanın hemen hemen tüm bölgelerinde bulunurlar, ancak en büyük çeşitliliği tropikal ve subtropikal bölgelerde görülmektedir. Türkiye’de yaklaşık 150 orkide türü bulunmaktadır ve bunların %80’inden fazlasının yumru kökleri vardır (Kreutz, 2009). Bu orkideler içinde Ophrys, Orchis, Himantoglossum, Serapias, Anacamptis, Compreria, Barli, Dactylorhiza, Aceras ve Neotinea cinsleri ülkemizde salep elde etmek için kullanılmaktadır (Sezik, 2002). Orkideler sahip oldukları fitokimyasallar sayesinde fitotoksik, antispazmodik, antioksidan, enzim inhibitörü, antimikrobiyal ve cilt yaşlanmasını geciktirici gibi pek çok biyolojik aktivite sergilemektedirler (Gantait vd., 2021). Bununla birlikte, literatürde çeşitli orkidelerin, antidiyabetik, antiinflamatuvar (Wu vd., 2019), antitümör (Mohanty vd., 2013), ateş düşürücü (Mohanty vd., 2012), antitrombosit agregasyonu ve diüretik aktivite (Park vd., 2018) gibi önemli terapötik özellikleri de bildirilmiştir.

Dactylorhiza türü de Anadolu’da halk tarafından geleneksel olarak kullanılan orkide türlerinden birisidir (Sezik, 2002). Bu bitki, ince gövde yapısına sahip, uzun yapraklı, orta-kısa boylu ve toprak altı yumrulara sahip bir bitkidir. Anadolu’da, Karadeniz Dağlar’nda, özellikle Zigana Geçidi ve Gümüşhane çevresinde etkili bir yayılım göstermektedir (Kreutz, 2009). Bu tür, Gümüşhane’nin Kelkit bölgesinde de yetişmektedir ve bölge halkı tarafından yaygın bir biçimde balgam söktürücü, göğüs yumuşatıcı, ishali önleyici olarak ve de yara, çiban gibi cilt sorunlarının tedavisinde aynı zamanda sıcak içecek (salep) ve dondurma yapımında da geleneksel olarak kullanılmaktadır.

Orkideler ile ilgili son yıllarda yapılmış bazı çalışmalar olsa da *D. romana* subsp. *georgica* üzerine yapılmış çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Kotiloğlu vd. (2020), bu türün yöresel kullanım biçimleri esas alarak bazı biyolojik aktivitelerini ortaya koymuşlardır. Ancak, bitkinin en etkili kullanım biçimleri hala net değildir. Bu bağlamda, mevcut çalışma ile *D. romana* subsp. *georgica* bitki yumrularının sahip olduğu biyolojik aktiviteleri en etkili ekstraksiyon yöntemi ile belirlemek amacıyla, farklı ekstaksiyon

yöntemleri kullanılarak, toplam fenolik, flavonoid aktivitelerinin yanı sıra, antimikrobiyal, antioksidan, enzim inhibisyon ( $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glukozidaz ve tirozinaz) özellikleri ve de fenolik içeriğinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak bu bitkinin DNA koruyucu aktivitesi ve tirozinaz enzim inhibisyon yeteneği daha önce araştırılmamış olup bu çalışma ile ilk kez değerlendirilmiştir.

### 1.2. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında, Gümüşhane iline ait dağlık bölgelerden yerel halk tarafından toplanarak geleneksel ilaç ve gıda (salep) olarak kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisinin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında bitkiye ait yaş ve kuru yumrulara ait farklı yöntemlerle hazırlanmış ekstraktların fenolik, flavonoid, antioksidan, antimikrobiyal ve antidiyabetik etkinin tayin edilerek, fenolik içeriğinin aydınlatılması, ayrıca ilk kez DNA koruyucu potansiyelinin ve tirozinaz enzim inhibisyon özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Günümüzde hala bölge halkı tarafından yöresel kullanım biçimleriyle hazırlanarak kullanılan bu bitkinin biyolojik etkilerinin, en etkili ekstraksiyon yöntemiyle belirleyerek elde edilen verilerin bilimsel anlamda ortaya koyulması hedeflenmektedir.

### 1.3. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* Bitkisiyle İlgili Genel Bilgiler

Orchidaceae familyası, dünya üzerinde yaklaşık 20.000 den fazla tür, 850 cinsten oluşan en büyük bitki ailelerinden biridir (Gantaid vd., 2021). Çiçeklerinin güzelliğinden dolayı kesme çiçekçilik ve süs bitkisi sektöründe yaygın olarak kullanılsa da birçok çalışma, orkidelerin bazı rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldığını belirtmiştir (Hossain, 2011). Türkiye’de bulunan orkideler ele alındığında kökleri veya yumruları aracılığıyla topraktan çeşitli yaşamsal ihtiyaçlarını karşılayabilen orkideler, karasal ya da “Orta Kuşak Orkideleri” olarak isimlendirilir. Ayrıca toprak altında kendi yumrularını üretebilen türler salep orkidesi olarak da bilinmektedir. Türkiye’de *Dactylorhiza* orkide cinsinin 26 türüyle ile 3. sırada dağılım gösterdiği bilinmektedir (Çalışkan, 2018). Orkideler içinde *Dactylorhiza* cinsinin farklı bir önemi bulunmaktadır. Diğer salep orkideleri oval bir şekle sahip yumru üretirken *Dactylorhiza* cinsi ise çatal biçimli çıkıntılı yumrular üretmektedir. Yüksek adaptasyon özelliğinden dolayı 0-2000 m rakımlar arasındaki yüksekliklerde görülebilmekte, Avrupa, Akdeniz ve Kuzey Afrika’dan Asya’ya kadar yayıldığı bildirilmektedir (Renz ve Taubenheim, 1984; Shipunov vd., 2004).

*D. romana* subsp. *georgica* ince, uzun, yassı yapraklı bir yapıya sahip, orta boya ve ayrıca çatal biçimli yumruya sahip bir orkide türüdür (Kreutz, 2009). Yumrularının alt kısmında var olan parmaklı çıkıntılardan dolayı halk arasında ona “Çatal Salep” denilmektedir (Çalışkan, 2018). Bitkinin çiçeklenme dönemi mart ayından başlayarak mayıs ayının son günlerine dek uzanmaktadır. Bitkinin yumruları haziran ve temmuz ayları boyunca olgunlaştıktan sonra hasat edilebilmektedir. Türkiye’de bu bitki, genelde Karadeniz bölgesindeki dağlar’da ve belirgin olarak Zigana Dağı civarında, Gümüşhane yakınların da fazlaca yayılış göstermektedir. Bununla birlikte Bitlis, Trabzon, Hakkari, Van Gölü’nün çevresi, Artvin, Ordu, Samsun, Iğdır, Kars, Siirt, Sivas ve Yozgat Akdağmadeni’nde görülmektedir (Kreutz, 2009).

*D. romana* subsp. *georgica* alt türünün varlığı genelde düşük yükseltideki bölgelerde azalırken, 700-2100 metre yükselti aralığında yayılışı artmaktadır. Bu orkide seyrek çam ve köknar ormanları, çalılık meşelikler gibi kısmi gölgeli bölgeleri yaşam alanı olarak tercih etmektedir. Özellikle nemli bölgelerde, orman tabanlarında bulunan aynı alt türe ait, beyaz ve mor çiçek rengine sahip bitkiler (Şekil 1) dağınık bir şekilde yaşamaktadır (Kreutz, 2009).



Şekil 1. Doğal ortamında *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*

Birçok farklı kaynaktaki bilgilere göre Türkiye’de *Dactylorhiza* orkide türünün içinde yer aldığı 154 farklı orkidenin yumruları yöresel olarak salep, sıcak içecek, dondurma ve kıvam artırıcı olarak kullanılmaktadır (Çalışkan, 2018).



Şekil 2. *D. romana* subsp. *georgica* bitkisine ait çatal biçimli yumrular

Diğer orkide türlerden ayrılan bir diğer farkı ise içeriğinde yüksek glikomannan ihtiva etmesidir. Bu özelliğinden dolayı ise çok daha değerli bir salep orkidesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Blinova ve Uotila, 2012; Çalışkan, 2018; Farhoosh ve Riazi, 2007). Ticari boyutta ise bir salebin kalitesi glikomannan oranına bağlıdır ve bu oranın yaklaşık %40 olması beklenmektedir. *D. romana* subsp. *georgica* ait çatal biçimli yumruların (Şekil 2) ortalama %48.54 glikomannan içerdiği bilinmektedir. Türkiye’nin farklı bölgelerinden toplanılan 20 farklı salep orkidesi ele alındığında glikomannan içeriğinin daha az olduğu bildirilmektedir (Şen, 2016). Bu nedenle bu tez çalışmasında kullanılan orkide yumrularının biyoteknolojik değeri oldukça önemlidir.

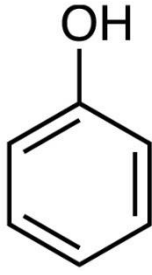
#### 1.4. Bitkisel Sekonder Bileşikler

Dünya genelinde, doğal kaynaklardan elde edilmiş olan sekonder metabolitlerin yaklaşık %80’i bitkilerden elde edilmektedir (Zhong, 2013). Yeryüzündeki bitkiler, yüzbinlerce düşük molekül ağırlıklı organik bileşik üretir. Bu bileşikler, varsayılan etkinliklerine dayanarak 3 kapsayıcı grupta sınıflandırılmışlardır. Bunlar; doğrudan bitki büyümesi için elzem olan birincil metabolitler, metabolizma ile organizma süreçlerini düzenleyen hormonlar ve bitki-çevre etkileşimlerine aracılık eden ikincil metabolitler olarak adlandırılmaktadır (Erb ve Kliebenstein, 2020). Primer metabolitler bitkilerin temel yaşamsal faaliyetlerini doğrudan etkileyen, aminoasit, lipid ve karbonhidratlar gibi hücresel fonksiyonların sürekliliği için sentezlenen moleküllerdir (Delgoda ve Murray, 2022; Paech, 1950). Sekonder metabolitler ise stres koşullarında bitkide

meydana gelen çeşitli fizyolojik değişiklikler sonucu yüksek oranda indüklenebilen bitki metabolitleridir (Kliebenstein, 2013; Zandalinas vd., 2017). Bitki sekonder metabolitleri (BSM), bitkilerin dışarıdan gelebilecek zararlılara, hastalıklara, olumsuz çevre şartlarına karşı dayanıklılık oluşturmaları ve birtakım yabancı otlara karşı allelopatik etkilerinden dolayı bitkilerin yaşamı için primer metabolitler kadar değerlidirler (Seigler, 1998; Ramakrishna ve Ravishankar, 2011). Ayrıca BSM 'ye dahil olan karotenoidler ve flavonoidler bitkilerde tozlaşmayı sağlayan canlıları çeken çiçek ve tohumlardaki hücre pigmentasyonunda işlev göstermektedirler. Bu sebeple, bitki üremesine de katkı sağlarlar. Bitkilerdeki faydalarının yanı sıra sekonder metabolitler endüstriyel alanlarda yağ, boya, elyaf, aroma, tutkal, parfüm ve ilaçlar içerisinde kullanımları mevcuttur. Birbirinde farklı etkilere sahip sekonder metabolitlerin çeşitli biyolojik özelliklerinin tanınmasıyla beraber bu alanda yeni ilaç, antibiyotik, insektisit ve herbisitlerin arayışını artırmıştır (Dawson, 1994; Zinkel ve Russell, 1989). Bitki sekonder metabolitlerinin üretimi genellikle bitkinin türüne, fizyolojik ve gelişimsel dönemlerine, özellikle de çevresel şartları bağlı olarak değişir. Bitkilerdeki miktarları ise bitki kuru ağırlığının %1'inden daha az miktarlardadır (Zheng, 2010). Bitkilerde biyosentetik yollarla üretilen sekonder metabolitler 3 temel sınıfa ayrılır. Bunlar; azot içeren bileşikler, terpenler ve fenolik bileşiklerdir (Wang vd., 2018). Azot içeren bileşikler, siyanojenik glikozitler, glukosinolatlar ve alkaloidler olarak 3 ana sınıfa ev sahipliği yapmaktadır (Facchini, 2001). Bu sınıfta yer alan alkaloidler, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların iyileştirilmesinde, antimikrobiyal madde, kas gevşetici, öksürük kesici ayrıca analjezik olarak tıbbi öneme sahip (Ashraf vd., 2018; Akhgari vd., 2017). Terpen grubuna ise mono/diterpenler, absisik asit, seskiterpenler, karotenoidler, fitol, filokinonlar, plastokinonlar, isoprenler, tokoferoller, polifenoller, brassinosteroidler, steroller ve özellikle giberellin gibi bitki hormonları dahildir (Eric ve Baron, 2018). Fenolik bileşikler bu çalışma çerçevesinde incelendiği için sonraki bölümde daha detaylı bir biçimde ele alınacaktır.

#### **1.4.1. Fenolik Bileşikler**

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin oldukça önem arz eden sınıflarından biri olan fenolik bileşikler, fenol grubu kimyasal olarak heterojen bir grup olan ve şekil 3'te görüldüğü üzere aromatik halka üzerinde bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Naczki ve Shahidi, 2006).



Şekil 3. Fenol yapısı

Fenolik bileşiklerin bitkilerdeki işlevlerine bakıldığında büyüme, üreme, çeşitli abiyotik ve biyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığın sağlanması karşımıza çıkmaktadır. Bu gibi çeşitli olaylarda işlev görmek için malonik asit ve şikimik asit yolları ile meydana getirilmektedirler (Achakzai vd., 2009; Chaparro vd., 2013; Giménez vd., 2014). Kısaca fenolik bileşikler zararlılara ve hastalıklara karşı bitkilerin kendi savunma sistemi için oldukça önemlidir. Özellikle bitkiler çeşitli faktörler sebebiyle strese girdikleri zaman fenolik bileşiklerin üretimi artar, üretimi artan bu fenolik bileşikler bitkilerin çeşitli kısımlarında (meyve, tohum, çiçek, yaprak, dal, gövde) birirmektedirler (Achakzai vd., 2009; Balasundram vd., 2006; Verma ve Shukla, 2015). Bitkisel fenolik bileşiklerin bitki gelişiminde, üremesinde ve savunmasında önemli rol oynadıkları gibi insan sağlığı içinde faydalı özellikleri bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin; antioksidan, antibakteriyel, antimikrobiyal, antiaterojenik, antiviral, antialerjik, antikarsinojenik, antienflamatuar, antimitojenik, antidiyabetik, antitrombotik ve antiülser etkilerine ek olarak, proteinler ile kompleksler oluşturmak suretiyle enzim aktivitesini inhibe eden ürünler üretmektedir (Balasundram vd., 2006; Moure vd., 2001). Yapılan farklı araştırmalarda, oksidatif stres ile ilişkili fenolik bileşiklerin, meyve ve sebze açısından zengin bir diyetle beraber alımıyla kanser, yüksek kolesterol, kronik kalp, katarakt, diyabet gibi hastalıkların ve yaşlanmanın önlenildiği görülmüştür. Bitkisel ürünlerin bu sağlığa yararlı etkilerinin birçoğu, antioksidan etkili fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Balasundram vd., 2006; Demir vd., 2019; Erlund vd., 2008; Fisher vd., 2015; Thangapazham vd., 2006). Geçmişten bugüne dek 8000'den fazla bitkisel fenolik bileşik bildirilmiştir ve biyoteknolojik yöntemler sayesinde bu fenolik maddelere sürekli olarak yenileri eklenmektedir (Harborne ve Williams, 2000; Naczki ve Shahidi, 2006).

### 1.5. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikal olarak adlandırılan yapılar genellikle eşlenmemiş değerlik elektronları içeren atom, molekül veya iyon türleridir. Oldukça reaktif karakterlerinden

dolayı, serbest radikaller genellikle geçici, kısa ömürlü ve çevrelerindeki moleküllerle seçici davranmadan reaksiyona girmektedirler (Jiang vd., 2021). Elektronlarını genellikle çiftler şeklinde bünyesinde bulunduran moleküller, diğer moleküllerle reaksiyon oluşturma isteği serbest radikaller gibi fazla değildir (Halliwell, 1999; Valko vd., 2007). Canlı organizmalarda serbest radikal yapıları zararlı türler olarak kabul edilmektedir (Beckman ve Ames, 1998). Birçok farklı fiziksel ve kimyasal uyarıcının etkisiyle organizmada gelişen pek çok dejeneratif duruma karşı az miktarlarda üretilen serbest radikal yapıları hücrelerin sinyal iletim ve savunma mekanizmalarında rol alabilmektedirler fakat fazla miktarda üretilen ya da normal miktarda üretildiği halde doğal yollardan nötralize edilemeyen serbest radikal yapıları proteinlerde yıkıma bağlı olarak lipidlerde peroksidasyona, enzim aktivitesi kayıplarına ve DNA yıkımının bir sonucu olarak mutagenesis ve karsinogeneze yol açar (Özcan vd., 2015; Sivanandham, 2011). Bunlara ek olarak serbest radikallerin yaşlanmaya yol açan önemli bir faktör olduğu da öne sürülmektedir. Serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklardan üretilmektedir. Endojen kaynaklı meydana gelen serbest radikallerin %90'nı mitokondri tarafından üretilirken, eksojen kaynaklı radikalleri üretimi ise ultraviyole tahrişi, hava/su kirliliği, toksik kimyasallar, sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı ve psikolojik stres gibi çeşitli dış uyaranlara bağlanabilir (Lushchak, 2014; McAllister vd., 2019).

Oksijeni kullanarak solunum yapan canlılarda, organizmaya alınan oksijenin %90'ından fazlası elektron taşıma zincirinde (ETZ) sitokromoksidaz yardımıyla direkt suya dönüşmektedir. Bu olay reaktif oksijen türlerinin salınımı olmadan dört-elektron mekanizması yoluyla gerçekleşmektedir (Skulachev, 2012). Ökaryotik canlı sistemlerinde, ETZ'ler mitokondriyal membranda yer almaktadırlar. ETZ sisteminde, ATP biçiminde bir enerji ortaya koymak amacıyla buna oksidatif fosforilasyon eşlik etmelidir. Tüketilmiş olan oksijen moleküllerinin %10'dan az bir miktarı, moleküler oksijenin bir elektron almasıyla birlikte indirgenerek süper oksit anyon radikallerine ( $O^{\cdot-}$ ) dönüşür. Bunun ardından  $O^{\cdot-}$  nin iki adet proton kabul etmesiyle beraber hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) meydana gelir. Oluşan bu bileşik serbest radikal özelliği göstermemektedir, fakat kimyasal olarak moleküler oksijenden daha fazla aktif özellik taşımaktadır. Bu özelliğinden dolayı ROT sınıfına dahildir. Hidrojen peroksit molekülüne bir elektron daha eklendiğinde bu molekül hidroksil radikaline ( $HO^{\cdot}$ ) ve hidroksil anyonuna ( $OH^-$ ) ayrılmaktadır. Bu durumda  $HO^{\cdot}$  bir elektron ve bir proton daha kabul ettiğinde su oluşumu gerçekleşir (Lushchak, 2014). Oluşan bu oksidatif türler normal metabolik yan ürünlerdir Özetlenecek olursa;  $H_2O_2$  ve  $HO^{\cdot}$  reaktif oksijen

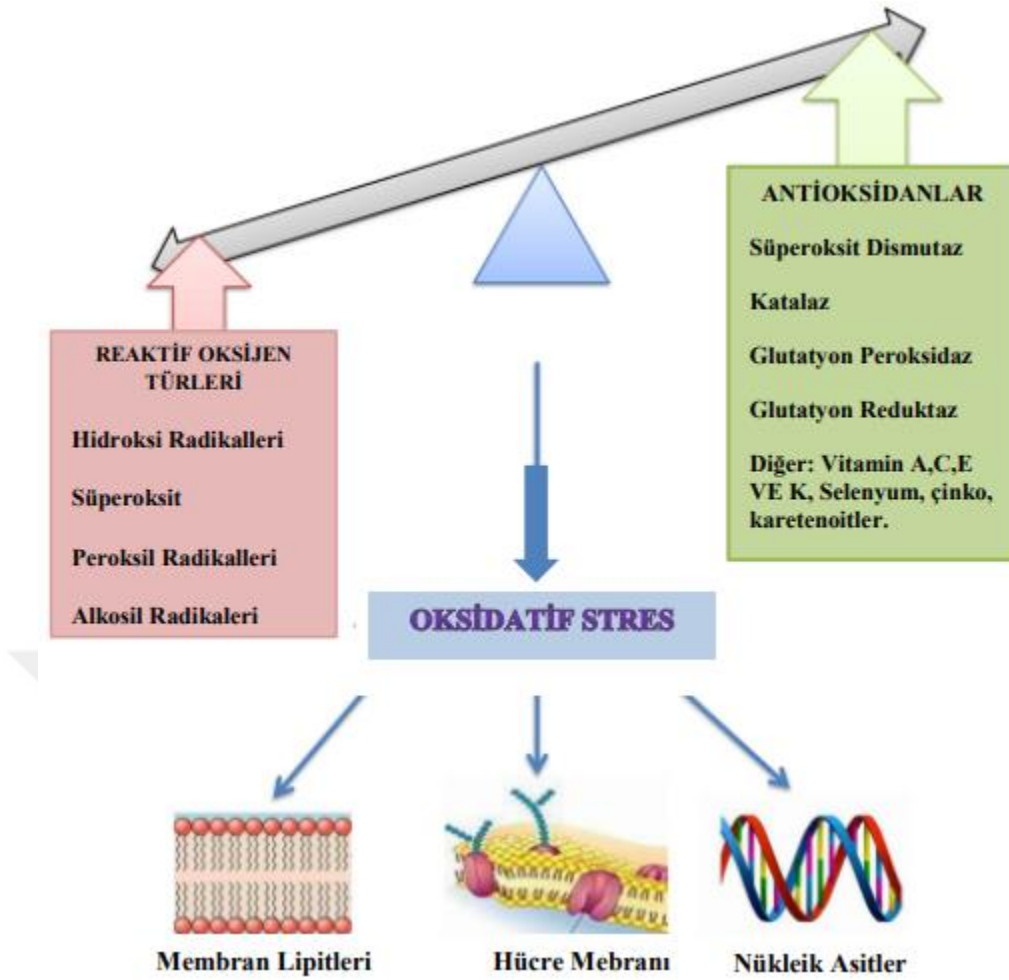
türleri olarak isimlendirilir ancak  $H_2O_2$  serbest radikal değilken, sadece  $O^{\cdot-2}$  ve  $HO^{\cdot}$  serbest radikallerdir. ROT ve RNT'nin düşük seviyeleri, zararlı bakteri, virüs gibi organizmalara karşı savunma mekanizması, hücrelerin birbirleriyle iletişimi gibi biyolojik roller oynarken, yüksek seviyeleri, çeşitli biyolojik moleküllerde (DNA, lipid ve proteinler) hasarlara, ayrıca hücre kayıplarına sebebiyet vermektedir (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015).

### 1.5.1. Oksidatif Stres

Oksijen, biyolojik sistemler için hem olumlu faydaları hem de potansiyel olarak zararlı bir reaktiviteye sahip olduğu için genellikle Janus gazı olarak anılır. Bu reaktivite, oksijenin yüksek enerjili elektron transferlerine katılmasına olanak sağlar. Dolayısıyla oksijen, oksidatif fosforilasyonla birlikte büyük miktarlarda ATP oluşumunu desteklerken aynı zamanda protein, lipid ya da DNA gibi, herhangi bir biyolojik moleküle saldırmaya meyilli hale gelir. Bunun sonucu olarak canlı bünyesi ROS'lar tarafından sürekli oksidatif saldırı altında kalmaktadır. Canlılarda bu saldırıyı dengeleyen karmaşık bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Fakat bazı durumlarda bu denge bozularak oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres, oksijen toksisitesinin bir hücre üzerinde sahip olabileceği çok sayıda yan etkinin, potansiyel bir hasara yol açabilen oksidan-antioksidan dengesinde negatif anlamda gelişmiş değişiklik olarak tanımlanır (Jaganjac vd., 2022).

Oluşan bu denge durumunun bozukluğu aşağıdaki koşulların biri veya birkaçının kombinasyonu ile bozulabilmektedir. Bunlar;

- Endojen ve eksojen bileşenlerin artışıyla beraber otooksidasyonun başlaması ve ona eşlik eden reaktif oksijen türlerinin üretimi,
- Düşük molekül ağırlığına sahip antioksidan kaynaklarının bitmesi,
- Antioksidan özellik gösteren enzimlerin inaktive olması,
- Antioksidan özelliğe sahip enzimlerin üretiminin düşmesi şeklinde açıklanabilir (Sies, 1997).



Şekil 4. Oksidatif stres hasarı (Akhigbe ve Ajayi, 2021).

Şekil 4’te antioksidanlar ve reaktif oksijen türler arasındaki dengesizlik sonucu meydana gelebilecek oksidatif stres hasarı şematize edilmiştir.

Biyolojik sistemlerde, reaktif oksijen türleri ve bunların normal seviyelerde tutulması arasındaki dengesizliğin sonucunda ROT seviyesindeki artışla beraber oluşan oksidatif stres, hepsini olmasa bile birçok yaşam prosesinin etkilenmesinde rol oynayabilmektedir. Oksidatif stres, başta kanser olmak üzere diyabet, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, gibi pek çok hastalığın gelişiminden sorumludur (Berlett, 1997; Şahin, 2017).

### 1.6. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyerek, oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını engelleyebilen maddeler olarak tanımlanmıştır (Shinde vd., 2012). Antioksidanlar serbest radikallere karşı yüksek afinite göstermektedirler. Bundan dolayı, canlı organizmalarda belirli bir seviyeye kadar olan oksidanların artışı vücutta daima belirli bir seviyede bulunan doğal antioksidanlar tarafından etkisizleştirilir. Bu

olay antioksidan savunma olarak bilinir. Genel olarak antioksidanlar düşük miktarlarda bile DNA, protein ve lipid gibi hücre bileşenlerinin oksidasyonunu geciktirip önleyebilirler böylece hücre içindeki antioksidan-oksidan denge durumunun sürdürülebilmesi sağlanır (Casas-Grales ve Muriel, 2015; Halliwell, 1990). Genellikle reaktif oksijen türlerinin, oluşumunu önleyen veya çoğalmalarını engelleyen antioksidanlar, faydalı etkilerini birkaç mekanizmayla sergilerler.

Bu mekanizmalar;

- Oluşan serbest radikallerin antioksidanlar tarafından toplayarak, onları daha kararlı bir yapıya çevirerek,
- Zincir kırıcı özellik ile serbest radikal üretimini gerçekleştiren kimyasal tepkimeleri durdurarak,
- Baskılayıcı etkiyle beraber reaksiyon hızını düşürerek,
- Onarıcı etki ile biyolojik molekülerde meydana gelen hasarı onararak,
- Canlı organizmadaki antioksidan enzimlerin yardımıyla enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak,
- Oksidasyonu başlatan yüksek reaktif özellik gösteren türleri süpürerek, etki göstermektedirler (Brewer, 2011; Nawar, 1996).

Antioksidanların kendilerine has yapı özellikleri, fiziksel konumları, indirgeme potansiyelleri, aktivasyon enerjileri uçuculukları ve ısıya duyarlılıkları onların etkinliklerinde rol oynamaktadır. İyi özellik gösteren antioksidanlar, zincir reaksiyonlarının çoğalmasını engelleyen antioksidanlar olarak bilinmektedir. Antioksidanların, 1 tane H atomu alabilme özellikleri nedeniyle reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini sınırlandırarak, süpürücü kabiliyete sahiptirler (Brewer, 2011).

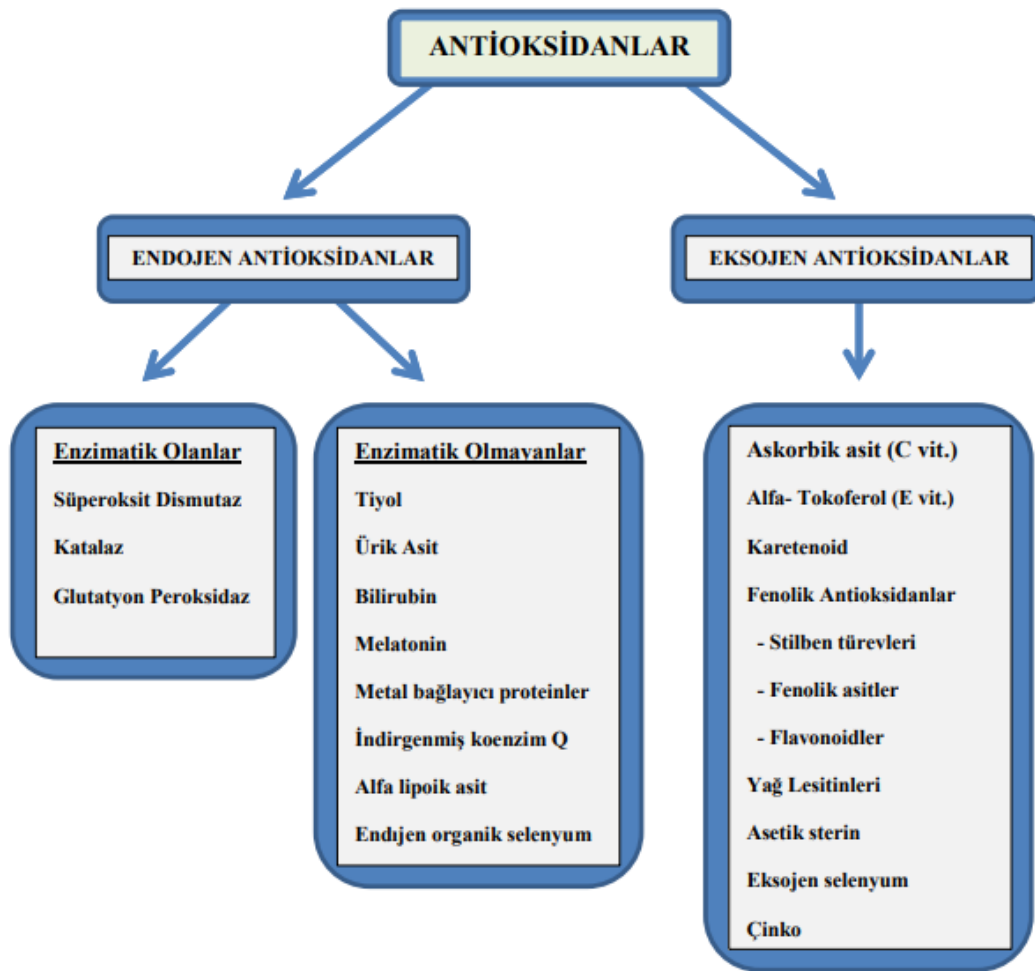
#### **1.6.1. Antioksidanların Sınıflandırılması**

Genel olarak antioksidan özellik gösteren maddeler farklı özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır.

Antioksidanlar;

- Enzimatik ve enzimatik olmayan,
- Birincil veya ikincil,
- Endojen ve eksojen,
- Suda çözünür ve yağda çözünür,
- Önleyici ve tamir edici,

- Doğal veya sentetik, olmak üzere sınıflandırılabilirler (Pisoschi ve Pop, 2015).
- Oksidatif açıdan antioksidanları değerlendirdiğimizde ise eksojen ve endojen olacak şekilde 2 farklı sınıf karşımıza çıkmaktadır. Bu eksojen ve endojen kaynaklı antioksidanlar antioksidan-oksidan dengesi oluşturmak için oksidatif strese neden olan serbest radikallerden vücudu koruyarak onları etkisizleştirirler. Yapılan sınıflandırma aşağıdaki Şekil 5'te şematize edilmiştir (Şen vd., 2011).



Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması (Pisoschi ve Pop, 2015).

### 1.7. Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında *D. romana* subsp. *georgica* yumru eskrelerinin antimikrobiyal özelliklerini ortaya çıkarmak amacıyla insan, hayvan ve gıdalarda bulunan patojenik mikroorganizmalar kullanılmıştır. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi 6 adet Gram (-) bakteri, 3 Gram (+) bakteri ve 2 maya olmak üzere 11 mikroorganizmaya karşı araştırılmıştır (Tablo 1). Yapılan analizde *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Salmonella thyphi*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Proteus vulgaris* mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Tablo 1. Antimikrobiyal testlerde kullanılan mikroorganizmalar

| Cinsi           | Mikroorganizma Adı             | Suş Numarası |
|-----------------|--------------------------------|--------------|
| Gram (+)Bakteri | <i>Listeria monocytogenes</i>  | ATCC 7644    |
|                 | <i>Bacillus cereus</i>         | RSKK 709     |
|                 | <i>Staphylococcus aureus</i>   | ATCC 6538    |
| Gram (-)Bakteri | <i>Salmonella typhimurium</i>  | CCM 5445     |
|                 | <i>Escherichia coli</i>        | ATCC 29,998  |
|                 | <i>Klebsiella pneumoniae</i>   | ATCC 13,883  |
|                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | ATCC 27853   |
|                 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | ATCC 17,802  |
|                 | <i>Proteus vulgaris</i>        | FMC 1        |
| Fungus          | <i>Candida albicans</i>        | DSMZ 5817    |
|                 | <i>Candida tropicalis</i>      | NRRL YB-366  |

*Salmonella typhimurium*: Enterobacteriaceae familyasında yer alan *S. typhimurium*, çubuk şekilli, gram negatif bir bakteri türüdür. Genellikle insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan bir mikroorganizma olduğu bilinmektedir (Brenner vd., 2000). Çoğu salmonellozis vakası *S. typhimurium* tarafından enfekte olmuş gıdalardan kaynaklanır. Büyükbaş ve kümes hayvanlarının sıkça bu bakteri tarafından enfekte edildiği bilinse de ev kedileri ve hamsterların da mikroorganizmayı taşıyarak insan enfeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. İyi pişirilmeyen kümes hayvanlarının ve yumurtalarının tüketilmesiyle salmonella yayılarak enfeksiyona neden olur (Swanson vd., 2007).

*Escherichia coli*: Bu bakteri, Enterobacteriaceae ailesine ait gram negatif, fakültatif anaerobik, hareketli ve spor oluşturmeyen özelliğe sahiptir. Sıvı besi ortamlarında hızla üreyebilirler, tek başına ya da çiftler halinde görülebilmektedirler (Ewers vd., 2004). *Escherichia* cinsi içerisinde yedi tür vardır. Bunlar: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulnaris*, *E. blattae* ve *E. alberti*'dir. İçlerinde en önemlileri *E. coli*'dir (Ewers vd., 2004). Genellikle bağırsak bakterisi olarak bilinmektedir. Bağırsak dışına çıkıp dokulara yerleştiğinde birçok sağlık problemlerine neden olmaktadır. Bu sağlık sorunlarına menenjit, safra ve yara enfeksiyonları, peritonit, üriner sistem sorunları, sinüzitle beraber hemolitik üremik sendrom gibi örnekler verilebilir (Ustaçelebi, 1999).

*Vibrio parahaemolyticus*: *Vibrio* ailesine mensup, çomak şekilli, halofilik, kıvrık, durgun sularda yaşayan, gram negatif bir bakteri türüdür. Genellikle ishal ve kramplar ile seyreden gastrointestinal sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. Deniz ürünlerini enfekte etmesiyle bilinir ve insan sağlığı için büyük risk oluştururlar. Öyleki *Vibrio* türleri içinde önemli yeri olan *Vibrio parahaemolyticus* Japonya'daki 272 kişiyi etkileyen ve 20 kişinin ölümüyle sonuçlanan salgının ardından ilk kez 1950'de Fujino tarafından gıda kaynaklı hastalık etkeni olarak bildirilmiştir (Daniels vd., 2000).

*Listeria monocytogenes*: Hayvanlarda ve insanlarda bazı enfeksiyonlar meydana getirebilen, gram pozitif, çomak şeklinde, hareketli, sporsuz ve kapsül bulundurmeyen zorunlu bir hücre içi parazit olan bakteridir. *L. monocytogenes*'in 1980'li yıllarda gıda kökenli salgın hastalıklara sebep olduğu tespit edilince bu mikroorganizma araştırma konusu olmuştur (McLauchlin vd., 2004). *L. monocytogenes* yüksek sıcaklıklara karşı dirençlidir. Aynı zamanda buzdolabı sıcaklıklarında da ürediği bilinmektedir. *Listeria* ile kontamine olan gıda tüketildikten 12 saat sonra ateş, yorgunluk, karın krampları, kusma, baş ağrısı ve diyare ile seyreden sağlık sorunları meydana gelmekte ve *Listeria* menenjit ve bakteriyemi gibi önemli sağlık problemleri günler sonra ortaya çıkmaktadır (Sergelidis ve Abraham, 2009).

*Bacillus cereus*: Doğada sıkça rastlanılan gram pozitif, kapsülsüz, aerob, hareketli, basil şekilli bir bakteri türüdür. Saprofit bakteri oldukları halde gıda zehirlenmelerine neden olurlar. Bunun dışında başka enfeksiyonlarda neden olduğu bilinir. Bunlar; apseler, göz içi enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve endokardit olarak bilinmektedir (Ustaçelebi, 1999).

*Klebsiella pneumoniae*: *K. pneumoniae* gram negatif, hareketsiz, fermentasyon yapabilen, kapsüllü bir bakteri türüdür. *Klebsiella* sınıfının *Enterobacteriaceae* şubesinin bir üyesidir. Genel olarak ağız, deri ve bağırsak florasında bulunmasına rağmen, düşük immün sistemli kişilerde solunum sistemine yerleştiği zaman akciğerlerde yoğun prulan balgam üreten enflamasyon, hücre ölümleri ve hemoroji ile birlikte yıkıcı hasarlara neden olabilmektedir. *K. pneumoniae* kaynaklı ciddi enfeksiyonların sayısındaki artış ve etkili tedavi yöntemlerinin azalması nedeniyle bu mikroorganizma bulaşıcı bir ajan olarak ün kazanmıştır (Cejas vd., 2022).

*Pseudomonas aeruginosa*: *P. aeruginosa*, gram negatif, aerob, kapsülsüz, hareketli ve sporsuz bir bakteridir. Dünyada hastane kaynaklı enfeksiyonların en sık ve en önemli etkenlerinden biridir. Kendilerini çevre şartlarına karşı kolaylıkla uyurabilmelerinin yanı sıra nemli ve sulu ortamlarda çok iyi üreme kabiliyetine sahiptirler. Genellikle üst solunum yollarında kolonize olan *P. aeruginosa*, alt solunum

yollarına ilerlemesiyle beraber primer pnömoniye sebep olur. Özellikle hastanede yatmakta olan ve immün sistemi zayıf olan hastalarda son derece ciddi ve hayatı tehdit eden enfeksiyonların nedenidir. Birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu bilinen *P. aeruginosa*, kullanılan antimikrobiyal ajanlara çok çabuk hızlı bir biçimde direnç geliştirmektedir. Gelişen direnç sorunu ve çevre şartlarına dayanıklılığı bu enfeksiyon etmeninin önemi artırmaktadır (Zilberberg vd., 2010).

*Staphylococcus aureus*: Micrococcaceae familyası içinde yer alan *S. aureus*, spor oluşturmeyen, gram pozitif, hareketsiz, fakültatif anaerob ve ayrıca katalaz pozitif bir bakteridir. Protein ve nişasta içeren gıdalarda yüksek gelişim gösteren *S. aureus*'a et ve süt ürünleri, balık, makarna, patates ve bunlarda yapılan gıdalarda sıkça karşılaşılmaktadır. Özellikle mikroorganizma sayısının azaltılmasına yönelik yapılan, başta ısıl işlem olmak üzere birçok uygulamaya karşı yüksek duyarlılık gösterdikleri gibi hijyenik koşullarda üretilmeyip ve doğru şartlarda muhafaza edilmeyen gıdaların stafilokokal zehirlenmeye sebep oldukları bilinmektedir (Tükel ve Doğan, 2000). Stafilokokal gıda zehirlenmeleri genellikle *S. aureus* tarafından sentezlenen enterotoksinlerin sindirim sistemi üzerinde yarattığı hastalıklardan birsidir (Kınık vd., 1998; Meyrand vd., 1999). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar, gıda zehirlenmesi vakalarının yaklaşık 1/3'ünün enterotoksijenik *S. aureus*'lar ile kontamine olan gıdaların tüketiminden kaynaklandığını ortaya koymuştur (Rao vd., 2022).

*Proteus vulgaris*: Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan *Proteus* bakterileri gram negatif, kokobasil görünümlü, kapsülsüz ve sporsuz bakterilerdir. Suda, toprakta ve dışkı ile kontamine olmuş maddelerde bulunurlar. Genel olarak *proteus* bakterilerinin uzun süreli idrar yolu enfeksiyonlarına ve böbrek taşı oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca *P. vulgaris*, menenjit, organ apseleri, yara enfeksiyonları, yeni doğan bebeklerde göbek kordonu enfeksiyonlarına ve bu enfeksiyonların bir sonucu olarak epidemiler halinde görülebilen sepsisinde nedenidir. Enterobacteriaceae ailesinde yer alan bakterilerde geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamlar, florokinolonlar ve aminoglikozidleri içeren birçok antimikrobiyale karşı direnç gelişimi büyük bir sorundur (Sun vd., 2022).

*Candida albicans*: Cryptococcaceae ailesine mensup, küre, oval veya silindirik şekle sahip, ince hücre duvarlı, aerobik ve 2-8 x 3-15  $\mu$ m boyutlarında ve eşeyli çoğalan ökaryotik bir mantar türüdür. 2-8 pH aralığında gelişim gösterebilen *C. albicans*, mikroaerofilik hatta anaerobik koşullarda bile üreyebilir. *C. albicans*, vücutta nemli ve ılık bölgeleri tercih eder, normal bireylerde %30-50 civarında ağız, vajen florası ve gastrointestinal sistemde bulunur (Richardson, 2003). Candidalara ait yaklaşık 200 farklı tür bulunmaktadır, içlerinde mantar enfeksiyonuna sıklıkla *C. albicans* neden

olur. Bu mantarların kaynağı birçok durumda endojendir ve immün sistemi zayıf bireylerde kolonizasyon bölgesinden yayılarak vücutta enfeksiyonlara sebep olurlar. Kolonizasyon oluşum ve yayılım özelliklerinin iyi olmasından dolayı *C. albicans*, konak canlıda ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir (Kruzai vd., 2002).

*Candida tropicalis*: Genellikle *C. tropicalis* kan dolaşımında ve idrar yolları enfeksiyonlarında en sık rastlanılan, eşeysiz çoğalan diploid mayalardan birisidir (Suzuki vd., 1991). Deri dahil olmak üzere gastrointestinal, solunum yolları ve genitoüriner yollarda kolonize olan bir insan patojenidir. Vücutta nemli ve ılık bölgeleri tercih eden maya, aynı zamanda osmotik basınca karşı dayanıklıdır ve yoğun tuz içeren ortamlarda dahi yaşamsal özellikler göstermektedirler (Zuza-Alves vd., 2017). *C. tropicalis*, *C. albicans*'ın ardından virulans özelliği oldukça fazla olan patojenlerden biri olarak bilinmektedir. Aynı zamanda güçlü bir biyofilm üretme özelliği bulunan *C. tropicalis* bu özelliğinden dolayı bazı durumlarda *C. albicans*'dan daha tehlikeli olabilmektedir. Bağışıklık sistemi zayıf olan insanlarda pişşge, deri ve tırnak enfeksiyonlarına ağız ve vajinal problemlere sebep olan bu mikroorganizmanın bazı vakalarda ölüme sebep olduğu bilinmektedir (Chai vd., 2010).

### 1.8. Antimikrobiyal Ajanlar

Geçmişten günümüze dek dünya üzerinde ölümlerin birçoğunu enfeksiyon kaynaklı ölümler oluşturmaktadır. *E. coli*, *Shigella* ve *Salmonella* mikroorganizmalarının sebep olduğu enfeksiyonlardan dolayı Afrika'da her yıl 300.000 çocuk ölmektedir (Karou vd., 2007). Gelişmiş ülkelere bakıldığında da enfeksiyona bağlı rahatsızlıklar ve ölümler gün geçtikçe artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki araştırmalara göre, 1981 yılında mikroorganizma etmenlerinin sebep olduğu enfeksiyona bağlı ölümler sırada 5. iken, 1992 yılında %58 artışla 3. sıraya ulaşmıştır ve enfeksiyona bağlı ölümler dünya çapında insan sağlığı için hala büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Iwu vd., 1999; Murray vd., 2022). Günümüzde tüm dünyayı etkisi altına alan Covid-19 pandemisinde toplam vaka sayısı 512.635.444 ve Covid-19 nedeniyle toplam ölüm sayısı 6.232.818 olarak bildirilmiştir ve bu rakamlar her geçen gün artmaktadır (Covid-19 Data Explorer, 2022). Meydana gelen enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavi edilmesinde yeni tedavi stratejileri geliştirmesini ve yeni antimikrobiyal ajan arayışını zorunlu kılmıştır (Silva vd., 2010). Antimikrobiyal ajan terimi mantar, virüs ya da bakteri gibi mikroorganizmaları öldüren ve onların gelişimlerini engelleyerek çoğalmalarını sınırlayan moleküller için kullanılmaktadır (Musumeci ve Puglisi, 2013).

Antimikrobiyal özellik gösteren maddeler kimyasal durumlarına ve etki şekillerine göre çeşitli şekillerde etki göstermektedirler. Bu mekanizmalar aşağıdaki gibi sınıflandırılır;

- Bakterilerin hücre duvar yapılarının sentezini inhibe eden ajanlar,
- Doğrudan mikroorganizmaların hücre zarı yapısında artan geçirgenlikten dolayı hücre içi bileşiklerin bozulmasına sebep olan ajanlar,
- Protein sentezini durdurmak için ribozomda bulunan 30S ve 50S birimlerinin işlevselliklerine zarar veren maddeler,
- Antimetabolitler (Musumeci ve Puglisi, 2013).

Bitkiler kendilerini mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlar gibi biyotik saldırılardan korumak için kendi bünyelerinde birçok antimikrobiyal bileşik üretirler. Bu özelliklerinden dolayı bitkiler, doğal antimikrobiyal madde kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir ve mikroorganizmalara karşı çeşitli çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Orhan vd., 2012). Antimikrobiyal özellikli fitokimyasallar kumarinler, saponinler, terpenoidler, kinonlar, fenolik asitler, alkaloidler, taninler, fenolikler ve flavonoidler olarak toplamıştır (Kan vd., 2009).

Birçok araştırmacıya göre, bitkisel antimikrobiyal ajanların, mikroorganizmalar üzerindeki etkisi tam anlamıyla ortaya konulamamasıyla beraber bu maddelerin doğrudan veya dolaylı olarak hücrelerin biyokimyasal süreçlerini etkileyerek, fizikokimyasal bütünlüğünü bozduğu düşünülmektedir. Özellikle bitkilerde bulunan hidrofobik yapılu terpenler, mikroorganizmaların hücre duvarı ile etkileşimde bulunarak hücre duvar bütünlüğünü bozmaktadır. Hidrofobik yapılu terpenlerin hücre duvarında bulunan lipid yapıları ile reaksiyona girmesi sonucu lipidler bir araya toplanır, akabinde hücre zarının geçirgenliği artar. Bunun sonucu olarak hücre membran yapısının bozulması, hücre içeriğinin koagülasyonuna neden olarak hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını inhibe eder (Silva vd., 2010). Aynı zamanda fenolik bileşiklerdeki hidroksil (–OH) gruplarının, membran yapılarını bozarak hücresel bileşenlerin sızıntısına neden olmak için bakterilerin hücre membranı ile etkileşime girerek inhibitör etkiye neden olduğu da düşünülmektedir (Lai ve Roy, 2004 ; Zhong, 2013). Fenolik bileşikler ayrıca antioksidan görevi görmektedir. Fenolik bileşiklerde serbest bir –OH grubunun varlığı, antioksidan özelliklerle sonuçlanır. Bu özelliğin, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve ayrıca serbest radikallerin temizlenmesini engellediği ve böylece büyüme ortamının redoks potansiyelini azalttığı rapor edilmiştir. Redoks potansiyelinin bu şekilde düşürülmesi, istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini daha da kısıtlayabilir (Cueva vd., 2010; Stojković vd., 2013). Buna ek olarak

bitkilerdeki flavonoidlerin antiviral etkili olduğu ve bu özelliğın proteinlere yüksek oranda afinite yeteneği ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Buna örnek olarak araştırmacılar, antioksidan etkinliği yüksek, metil kuarsetinin, poliovirüsünün hücresel protein sentezini ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir (Kahraman vd., 2002). Bitkilere ek olarak algler ve mantarlar tarafından patojenlere karşı üretilen antimikrobiyal bileşikler de, antimikrobiyal madde kaynağı olarak işlev görmüştür (Bhagavathy vd., 2011; Ramesh ve Pattar, 2010). Funguslar tarafından üretilen penisilinin keşfiyle beraber antimikrobiyal araştırmalar artarak çeşitli mikroorganizmalardan streptomisin, aureomisin, kloromisetin gibi birçok antibiyotik keşfedilmiştir (Iwu vd., 1999; Shinji 1993). Nitekim zamanla antibiyotiklerin yanlış ve sık kullanımı bakterilerin, antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençli bir yapı sergilemesine neden olmuştur. Direnç durumu, mikroorganizmanın türüne bağılıdır (Eliopoulos, 1992). Bakterilerin antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları doğal direnç ek olarak kazanılmış direnç çok daha önemli bir sorun teşkil etmektedir (Tenover, 2006). Kazanılmış direnç durumu, mikroorganizmaların genetik materyallerindeki değişikliklere bağılıdır. Kazanılmış direnç, bir mikroorganizmanın daha önce hassas olduğu antibakteriyal maddeye karşı tepkisizlik şeklinde meydana gelir (Yüce, 2001). Antibiyotik dirençliliği 1 defa oluştuktan sonra bu direnç bakteriler arasında yayılır ve ardından geliştirilen antimikrobiyal ilaçlara karşı mikroorganizmaların hızla direnç kazanmasına neden olur. Bu da ilaçların etkinliğini yitirmesinin ana nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Kürek, 2007; Kuyucu, 2007). Tek bir aktif maddeye sahip olarak üretilen sentetik ilaçlara karşı bakterilerin direnç kazanması kolaylaşırken, bir çok aktif maddeyi kompleks halinde bünyesinde barındıran bitkiler, mikroorganizmaların çoklu direnç geliştirmesini güçleştirmektedir (Kürek, 2007; Tenover, 2006). Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin meydana getirdiği sinerjik etki ile, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde, bitkisel antimikrobiyal ajanların daha etkili olduğu belirtilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bundan dolayı bitkilerin, mikroorganizma temelli hastalıkların tedavisinde fayda sağlayacağı büyük bir umut kaynağıdır (Erdoğan ve Everest, 2013).

### **1.9. DNA ve DNA Hasarı**

DNA, canlı organizmalarda genetik özellikleri taşıyarak, gelecek nesillere aktarılmasını sağlayan ve üzerinde devamlı olarak birtakım hasarlar oluşan bir yapıdır. Meydana gelen DNA hasarları çeşitli DNA tamir sistemleri yardımıyla onarılmasının yanında, hasarın telafi edilemez boyutlarda ulaştığı durumlarda DNA’da meydana gelen hasarlar birikir. DNA üzerinde biriken bu hasarlar zamanla çeşitli mutasyonlara ve

özellikle hücre kayıplarına yol açar. DNA’da oluşan hasar tipleri iki grupta incelenebilir. Bunlardan birincisi; Kendiliğinden değişimler sonucunda meydana gelen hasarlar olarak; Yanlış eşleşmeler, Bazların kimyasal yapısında kendiliğinden oluşan farklılıklar, Baz kayıpları ve Oksidatif hasarlar olarak tanımlanabilirken, İkinci grup ise Çevresel problemlerden kaynaklı, DNA hasarına sebep olan fiziksel (İyonizan radyasyon, UV ışınları) ve kimyasal etkenler olarak gösterilebilir (Dinçer ve Akçay, 2000).

Başta karsinogenezis olmak üzere, oksidatif DNA hasarı, pekçok hastalığın patogenezi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek reaktif özelliğe sahip hidroksil radikalleri lipid ve proteinlerde olduğu gibi DNA bazları arasındaki çift bağlara H atomu eklemesi veya timin bazının yapısındaki metil gruplarından H atomu çıkarmasının sonucu olarak DNA molekülü ile reaksiyona girer (Breen ve Murphy, 1995). DNA üzerindeki oksidatif hasara bağlı olarak, çift ve tek zincir kırıkları, şeker-fosfat omurgası hasarı, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme) ve abazik alanlar oluşabilir bunun yanında DNA ve protein yapıları arasında çapraz bağlanma gerçekleşebilir (Cooke vd., 2003; Evans, 2004). Ayrıca  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları DNA’da bulunan guanin bazlarına yüksek bir afinite ile bağlanmasıyla beraber DNA hasarına katkıda bulunmaktadır (Helbock vd., 1999). Tüm bunların sonucu olarak DNA’da oluşan oksidatif hasar; replikasyon, transkripsiyon ve DNA tamir mekanizmalarını baskılaması üzerine etkili olarak hücre zedelenmesi veya hücre ölümünü meydana getirir (Ghisalbertie, 1979). ROS kaynaklı DNA hasarının 2 farklı şekilde olduğu öne sürülmektedir:

Somatik hücrelerde ekzojen kimyasallar veya endojen metabolik süreçler nedeniyle üretilen hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonları gibi reaktif oksijen türleri (ROS), nükleik asitler, lipidler ve proteinler, hücrelerdeki ROS’un ana hedefleridir. Özellikle ROS, nükleozit bileşenlerine saldırarak DNA’ya zarar verebilir ve gen ekspresyonuna dönüşebilir. Hasarlı DNA, genomik kararsızlığa neden olur ve birçok kanser ve nörodejeneratif hastalığın nedenidir. Fenton reaktifi hipotezinde  $\text{OH}\cdot$  radikalleri DNA’ya saldırır ve akabinde DNA hasarı meydana gelir.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$  gibi radikaller doğrudan DNA üzerinde hasar oluşturmaları mümkün değildir.  $\text{OH}\cdot$  radikalinin DNA üzerinde hasar bırakabilmesi için direkt DNA’da ya da DNA’ya çok yakın bir bölgede meydana gelmesi gerekmektedir. DNA fazla miktarda negatif yüklü fosfat grupları içeren bir makromoleküldür.  $\text{Fe}^{2+/3+}$  ve  $\text{Cu}^{+/2+}$  iyonları negatif yüklü DNA’ya sürekli bağlı bir şekilde bulunabildikleri gibi, oksidatif stres altında hücrede bulunan demir ve bakır içeren proteinlerden ayrılarakta DNA’ya bağlanabilmektedirler.

Bunlara ek olarak redoks aktif transisyon metal iyonlarında DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'nin hedefi haline getirmektedir (Halliwell, 1994; Özden, 2006). DNA'ya bağlı olan metal iyonları ile  $H_2O_2$ 'nin DNA üzerinde meydana gelen reaksiyon sonucu oluşan  $OH\cdot$  radikalleri,  $OH\cdot$  radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmaları mümkün değildir. Ayrıca,  $OH\cdot$  radikal temizleyicilerinin ortaya çıkardığı radikaller de DNA hasarına neden olabilmektedir (Milligan vd., 1994).

Nükleaz Aktivasyonu hipotezinde ise, oksidatif stres sitozolde bulunan  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonunu artırarak nukleusdaki  $Ca^{2+}$  bağımlı endonükleazları aktive eder ve kabinde DNA'nın fragmentasyonuna sebep olur. DNA üzerine yapılan çalışmalarda sıklıkla bazı hasarları tespit edilmiştir.  $Cu^{2+}$  iyonları DNA'da Guanin-Sitozin bazlarınca zengin bölgelerde yüksek miktarda bulunur. Bunun sonucu olarak oksidatif hasara en fazla guanin bazı maruz kalır (Cooke vd., 2003; Dinçer ve Akçay, 2000).

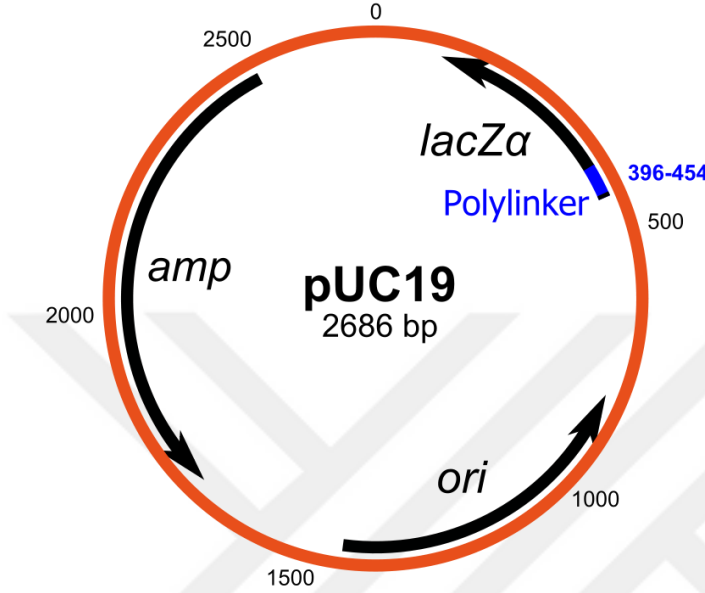
### **1.9.1. DNA Tamir Mekanizmaları**

DNA'nın bütünlüğü hücre bölünmesi için hayati öneme sahiptir ve oksidatif değişiklikler transkripsiyonu, translasyonu, DNA replikasyonunu bozabilir, bunun sonucu olarak mutasyonlara, hücre yaşlanmasına ve ölüme neden olabilir (Riso vd., 2004). Hücreler kendi genomik bütünlüklerini koruyabilmek için, oldukça karmaşık DNA onarım mekanizmalarını kendi bünyelerinde bulundurmaktadırlar (Ciccio ve Elledge, 2010; Jeppesen vd., 2011). DNA onarımı, ligazlar, glikozilazlar, fosfatazlar, helikazlar, demetilazlar, kinazlar topoizomerazlar, polimeraz ve rekombinazlar gibi kimyasal olarak modifiye edilmiş enzimatik işlevlerine göre gerçekleştirilmektedir. Canlı hücreler DNA hasarına karşı, doğru zamanda doğru yerde, doğru faktörleri aktive etmek için çeşitli stratejilere sahiptirler (Ciccio ve Elledge, 2010).

### **1.9.2. pUC19 Plazmit DNA**

Bu tez çalışmasında DNA korucu aktivitenin tespit edilmesinde pUC19 plazmit DNA'sı kullanılmıştır. pUC19 plazmiti, dairesel çift sarmallı yapıya sahip bir DNA'dır ve 2686 baz çiftine sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 6). Genel olarak rekombinant çalışmalarda en yaygın kullanılan vektör moleküllerinden biridir. Bu plazmit, bakteri hücresine "Transformasyon" adı verilen bir işlemle aktarılmaktadır. Plazmit DNA'ya ait Çoklu klonlama bölgesi (MCS), lac Z gen bölgesini içerir ve birçok endonükleaz kısıtlama bölgesi sağlamaktadır (Louro ve Crichton, 2013). Konakçı hücre için toksisiteyi azaltıcı olarak işlev gören  $\beta$ -laktamaz enzimi aracılığıyla pUC19 plazmitinde ampicilin direnç geni kodlanmaktadır, bu geni içeren hücreler ampicilin içeren besi

ortamında canlılıklarını sürdürebilmektedir (Wang, 2017). Bu sayede, ilgilenilen geni içeren plazmitin aktarıldığı hücreler, IPTG ve X-gal içeren besin ortamında meydana getirdiklerini koloninin rengine bakılarak, ilgilenilen geni almamış hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Rekombinantlar beyaz, rekombinant olmayanlar koloniler mavi renk koloni oluşturmaktadırlar.



Şekil 6. pUC19 plazmit DNA (Stringfixer, 2022).

Yabancı DNA'nın lac Z geni içinde yer alan MCS'ye eklenmesi, bu genin beta-galaktosidazın N-terminal parçasında insersiyonel inaktivasyonuna neden olur ve intra-allel tamamlamayı ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle, rekombinant plazmitleri taşıyan bakteriler, X-gal'i hidrolize edemez, bu da kültür ortamında mavi olan rekombinant olmayan hücrelerden ayırt edilebilen beyaz kolonilerin oluşmasına yol açmaktadır (Pasternak, 2005).

### 1.10. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Enzimler, genellikle canlılardaki kimyasal tepkimelerin uygun koşullar altında, herhangi bir yan ürün oluşturmadan, %100 verimle ürün meydana getirmesini sağlayan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin yardımıyla çeşitli biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi hem hızlı hemde kolay olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı enzimler, canlının hayatını devam ettirebilmesi için son derece elzemdir (Price, 1982). Enzimlerin etkiledikleri maddelere substrat denilmektedir ve enzimler kendi substratlarına karşı oldukça spesifikler. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmesine sebep olmaktadır (Nelson, 2005). Enzim

aktivitesinin olması gerekenden yüksek olduğu durumlarda birtakım sağlık sorunlarının meydana geldiği çeşitli çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Bundan dolayı birçok ilacın etken maddesi, enzim yapılarıyla etkileşecek şekilde tasarlanarak fazla enzimlerin verdiği zararlı etkileri ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır (Price, 1982). Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonları tamamen durduran veya hızlarının yavaşlatan moleküllere enzim inhibitörü denilmektedir (Nelson, 2005). Enzim aktivitelerinin inhibe edilmesi, metabolik bir hasarın düzelmesinin yanında bir patojeninde yok edilmesini sağlayabilmektedir. Bu sebeple enzim inhibitörü olarak kullanılması düşünülen ilaçların ya da etken maddelerin hedeflenen enzime yüksek oranda spesifik olması, yan etkisinin az, toksisitesinin ise düşük olması ve ayrıca çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olmasına dikkat edilmektedir (Çolak, 2014).

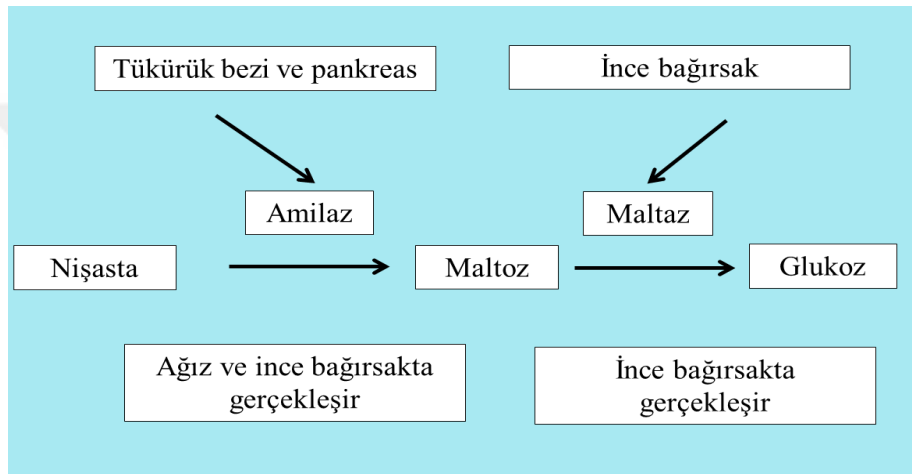
Tüketilen gıdalarla beraber alınan karbohidratların, vücutta monosakkaritlere kadar olan sindirimi 2 enzim ( $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glükosidaz) yardımıyla gerçekleşmektedir. Bu 2 enzimin gastrointestinal sistemde inhibe edilmesi, karbohidratların sindirilmesini engelleyerek glikoz emiliminin yavaşlamasına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak yemekten sonra kan plazmasındaki glikoz düzeyindeki yükselme azalır. Tirozinaz enzimi ise vücutta melanin oluşumundan sorumludur. Özellikle bazı kanser türlerinde, kanserli hücrelerdeki tirozinaz aktivitesinin artması bu kanser türlerinin tedavi edilmesinde tirozinaz enziminin inhibe edilmesine dikkat çekilmiştir (Maeda ve Fukuda, 1991).

#### **1.10.1. Alfa Amilaz (E.C:3.2.1.1)**

Diyabetes mellitus hastalığı, insülin yetersizliği ile beraber meydana çıkan, karbohidrat metabolizması önde gelmek üzere, yağ ve protein metabolizmasında da sorunlara sebep olan metabolik bir sağlık sorunudur (Memişlioğlu, 2005). Genellikle diyabet tedavisinde, karbonhidrat yıkımını sağlayan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz gibi enzimlerin inhibe edilmesiyle, karbohidratların glukoza parçalanması kontrol edilmektedir (Dik, 2013). Önceki çalışmalarda çeşitli fenolik bileşiklerin bu gibi enzimleri inhibe ederek, karbonhidrat emilimini geciktirmesiyle beraber antidiyabetik özelliği olan bir ajandan beklenen rolü üstlenebileceği belirtilmiştir (Jung vd., 2006; Longo, 2010).

Nişasta, birden fazla glikoz molekülünün çeşitli biçimlerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir.  $\alpha$ -amilaz enzimi, nişasta molekülündeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını parçalayarak maltotrioz, glikoz, maltoz ve  $\alpha$ -limit dekstrinlerin meydana gelmesini sağlamaktadır. Endoamilaz ve Ekzoamilaz olmak üzere iki gruba ayrılan

amilaz enzimleri, birbirinden farklı özelliklere sahiptirler. Nişastayı, farklı uzunluklarda dallanmış şekilde ya da düz oligosakkarit meydana getirecek şekilde rastgele biçimde parçalayanlar endoamilaz enzimleridir. Ekzoamilazlar ise nişastayı uç kısmından başlayarak parçalamaktadır (Gupta vd., 2003). Amilaz enzimi tükürük bezi ve pankreasta üretimi gerçekleştirilen bir enzimdir. Tükürük bezinden salgılanan amilaz enzimi sayesinde nişasta polimerleri, dekstrin ve maltoza parçalanırken pankreastan salınan amilaz enzimi nişastayı glukoza parçalamaktadır (Şekil 7) (Ecemiş ve Atmaca, 2012). Amilaz enzimleri sağlık, biyoteknoloji, tekstil, kağıt ve gıda endüstrilerinde önemli bir çok uygulamada kullanılmaktadır (Xiao, 2006).



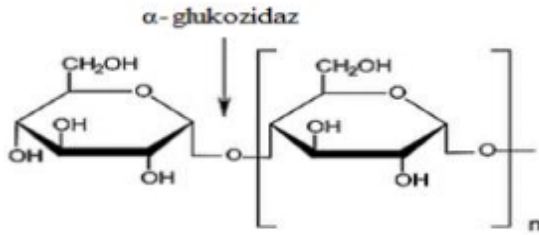
Şekil 7. Nişastanın glukoza parçalanması (Ecemiş ve Atmaca, 2012).

Aynı zamanda  $\alpha$ -amilaz enzimleri kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde de kullanılmaktadır. Tekstil sektöründeki gibi, kağıtların nişasta ile kaplanması kağıdın bazı mekanik hasarlardan korumasına yardımcı olmaktadır. Böylece üretilen kağıdın kalitesi, sertliği ve direnci iyileştirilmiş olur (Giri vd., 1990). Amilaz enzimlerinin bazı hayvanlardan, çeşitli mikroorganizmalardan ve bitkilerden üretimleri mevcuttur (Xiao, 2006).

#### 1.10.2. Alfa Glukozidaz (E.C:3.2.1.20)

Alfa-glukozidaz enzimi, ince bağırsakta bulunan ve karbohidratların emilebilir monosakkaritlere parçalanması için son derece önemli olan bir enzimdir. Bu enzim kısa zincirlere sahip olan oligosakkaritler üzerindeki  $\alpha(1\rightarrow4)$  bağlarını hidroliz etmektedir. Diyabet hastalığının semptomların hafifletmek amacıyla, bir alfa-glukozidaz inhibitörü olan akarboz, bağırsaklarda alfa-glukozidazı yarışmalı ve geri dönüşümlü olarak inhibe etmektedir. Glukoz düşürücü ilaçlar arasında,  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri, alınan karbohidratların emilimini geciktirerek, tokluk glukoz ve insülin seviyelerini

azaltmaktadır. Bu özelliğinden dolayı  $\alpha$ -glukozidaz inhibitörleri mevcut glikoz düşürücü ilaçlar arasındadır. Bu inhibisyon, gecikmiş karbonhidrat sindirimi ve uzun sindirim süresi yoluyla glikoz emilim oranını düşürüp akarboz benzeri bir işlev göstermesiyle diyabetik semptomların gelişmesini önleyebilmektedir. Bu nedenle, alfa-glukozidaz inhibitörleri, diğer antidiyabetik ilaçlarla kombinasyon halinde anti-diyabetik ilaçlar olarak kullanılabilir (Bischoff, 1995; Noori vd., 2022).

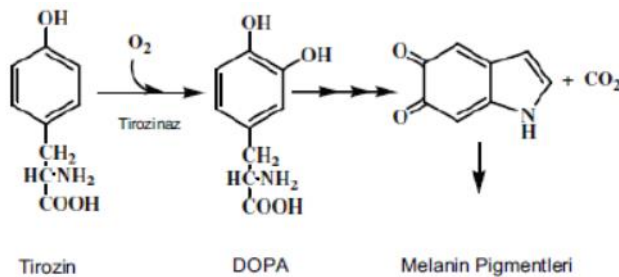


Şekil 8.  $\alpha$ - Glukozidaz enziminin nişasta ile etkileşimi (Taslîmi ve Gülçin, 2017).

### 1.10.3. Tirozinaz (E.C 1.14.18.1)

Tirozinaz enzimi, polifenol oksidaz, monofenol oksidaz, fenolaz veya katekolaz ve oksijen oksidoredüktaz (E.C 1.14.18.1) gibi isimlendirmelerle de adlandırılabilen bir enzimdir. Tirozinaz doğada çok yaygındır; memelilerde, bitkilerde, mikroorganizmalarda ve özellikle mantarlarda bulunur. Bitki ve hayvanlarda önemli yere sahip olan melanin pigmentlerinin sentezlenmesi için oldukça gerekli bir enzim olup kofaktörü bakırdır. Genelde proteinlerle vücuda alındığı bilinmektedir (Cooksey vd., 1997). Tirozinaz enzimi melanin sentezinde önemli bir enzimdir ve melanositlerdeki melanin pigmentini üç farklı reaksiyonla katalizler. Bunlar;

- Tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu.
- L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu.
- İnsanlarda dopakinonun, siklizasyon ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melaninine dönüşmesidir (Şekil 9) (Kim ve Uyama, 2005; Sugumaran, 1991).



Şekil 9. Tirozinden melanin oluşumu (De vd., 2008).

Melanin pigmentlerinin cilt üzerindeki rolü ultraviyole (UV) ışınları absorblayarak UV hasarına ve ayrıca reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği zararlara karşı cildi korumaktır (Kim ve Uyama, 2005). Ancak insan vücudunda tirozinaz tarafından fazla miktarda melanin sentezlendiği zaman cilt lekeleri gibi hiperpigmentasyon problemleri doğar. Meydana gelen bu hiperpigmentasyon problemlerinin tedavisinde tirozinazı inhibe eden ajanların kullanıldığı bilinmektedir (Gholamhoseinian vd., 2012). Genellikle orta ve ileriki yaşlarda ciltte üretilen anormal melanin pigmenti, ciddi bir estetik problemdir (Kalka vd., 2000). Özellikle eksojen sebepler sonucunda ultraviyole ışığa maruziyet ile melasma, solar lentigines ve çiller, pigmental anormalliklerin sebebidir (Maeda ve Fukuda, 1991). Tirozinaz inhibitörlerinin, güneş yanıkları sonrası cilt beyazlatıcı, pigmentasyonu önleyici özelliklerinden dolayı ilaç ve kozmetik endüstrilerinde önemi gün geçtikçe artmaktadır. Tirozinaz inhibitörleri dermal melanin üretimine baskı gösterdikleri için antihiperpigment ve beyazlatıcı ajan olarak tercih edilmektedir. Birçok kozmetik şirketi, ten rengini açma yeteneğine sahip kozmetik preparatlar için melanin inhibitörü özelliği gösteren yeni etken maddeler üzerine çalışmaktadır. Melanin inhibitörü özelliği gösteren maddelerin ten rengini açtığı ya da yaşlanmaya bağlı lekelerin tedavi edilmesi gibi işlevlerinin olduğu varsayılmaktadır. Gıdalarda da tirozinaz aktivitesi çoğu durumda etkili olmaktadır. Tirozinaz aktivitesine bağlı olarak gıdalarda doğal rengi dışında kararmalar oluşabilir, görünüş ve lezzetinde bozulmalar gerçekleşebilmektedir. Gıda sektörü bu istenmeyen durumları ortadan kaldırmak için tirozinaz inhibitörlerine başvurmaktadır (Marshall vd., 2000).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar aşağıdaki Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan cihazlar

| Cihazlar                | Firma                       |
|-------------------------|-----------------------------|
| Blok Isıtıcı            | Thermo Scientific           |
| Buz Makinesi            | Scotsman                    |
| Buzdolabı               | Beko                        |
| Cam Malzemeler          | ISO Lab                     |
| Çalkalayıcı İnkübatör   | Shel lab                    |
| Değirmen                | Retsch                      |
| Elektroforez            | Bio-Rad                     |
| Ependorf Tüp            | ISO Lab                     |
| Etüv                    | Memmert                     |
| Filtre Kağıdı           | Schleicher & Schüll         |
| Hassas Terazi           | Shimadzu                    |
| Jel Görüntüleme Cihazı  | Herolab                     |
| Manyetik Karıştırıcı    | IKA RH Basic                |
| Mikrodalga Fırın        | Altus                       |
| Mikroplaka Okuyucu      | Thermo Scientific           |
| Otoklav                 | HMC Hirayama                |
| Cam Baget               | Loop Plast                  |
| Petri                   | ISO Lab                     |
| pH Metre                | Hanna Instruments           |
| Evaporatör              | Heidolph                    |
| Santrifüj               | Allegra X-30R               |
| Steril Kabin            | Esco                        |
| Su Banyosu              | Memmert                     |
| Ultrasonik Banyo        | Wisd Laboratory Instruments |
| Vorteks                 | Heidolph                    |
| Steril Falkon Tüpleri   | ISO Lab                     |
| 96 Kuyucuklu Mikroplaka | Lp Italiana Spa             |

#### 2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler aşağıdaki Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

| <b>Malzeme adı</b>                        | <b>Firma</b>       |
|-------------------------------------------|--------------------|
| DNA Ladder                                | GeneDirex          |
| ABTS                                      | Sigma Aldrich      |
| Agaroz                                    | Sigma Alrich       |
| Akarboz                                   | Sigma Aldrich      |
| Alfa-amilaz                               | Sigma Aldrich      |
| Alfa-glukozidaz                           | Sigma Aldrich      |
| Alüminyum nitrat nonahidrat               | Merck              |
| Amonyum heptamolibdat tetrahidrat         | Merck              |
| Ampisillin                                | Sigma Alrich       |
| Askorbik asit                             | Merck              |
| Baicalein                                 | Sigma Aldrich      |
| Demir (III) klorür                        | Merck              |
| Dimetilsülfoksit                          | Merck              |
| DPPH                                      | Sigma Aldrich      |
| Etanol                                    | Merck              |
| Ethidyum Bromide                          | Panreac Applichem  |
| Folin-Ciocalteu fenol reaktifi            | Merck              |
| Fosfat Tamponu                            | Amresco            |
| Gallik asit                               | Merck              |
| Glutatyon                                 | Sigma Aldrich      |
| HCl                                       | Sigma Aldrich      |
| Hidrojen Peroksit                         | Sigma Alrich       |
| IPTG                                      | Sigma Alrich       |
| İyot                                      | Merck              |
| Kalsiyum Klorür                           | Sigma Alrich       |
| Kuersetin                                 | Sigma Aldrich      |
| LB Besi Yeri                              | Merck              |
| L-Dopa                                    | Sigma Aldrich      |
| Loadingdye                                | Biomatik           |
| Metanol                                   | Merck              |
| Müller-Hinton Agar                        | Merck              |
| Müller-Hinton Broth                       | Merck              |
| PNPG (4-nitrofenil $\beta$ -d-glukuronid) | Sigma Aldrich      |
| Potasyum asetat                           | Sigma Aldrich      |
| Potasyum ferrisiyanat                     | Merck              |
| Potasyum iyodid                           | Sigma Alrich       |
| Potasyum persülfat                        | Potasyum persülfat |
| Sodyum Karbonat                           | Merck              |
| Sülfürik asit                             | Merck              |
| TAE Buffer                                | Multicell          |
| Tirozinaz                                 | Sigma Aldrich      |
| Trikloroasetik Asit (TCA)                 | Sigma Alrich       |
| Troloks                                   | Sigma Aldrich      |
| X-Gal                                     | Sigma Alrich       |

## 2.2. Metot

Bu çalışmadaki bütün analizler 3 tekrarlı olacak biçimde yapılmıştır.

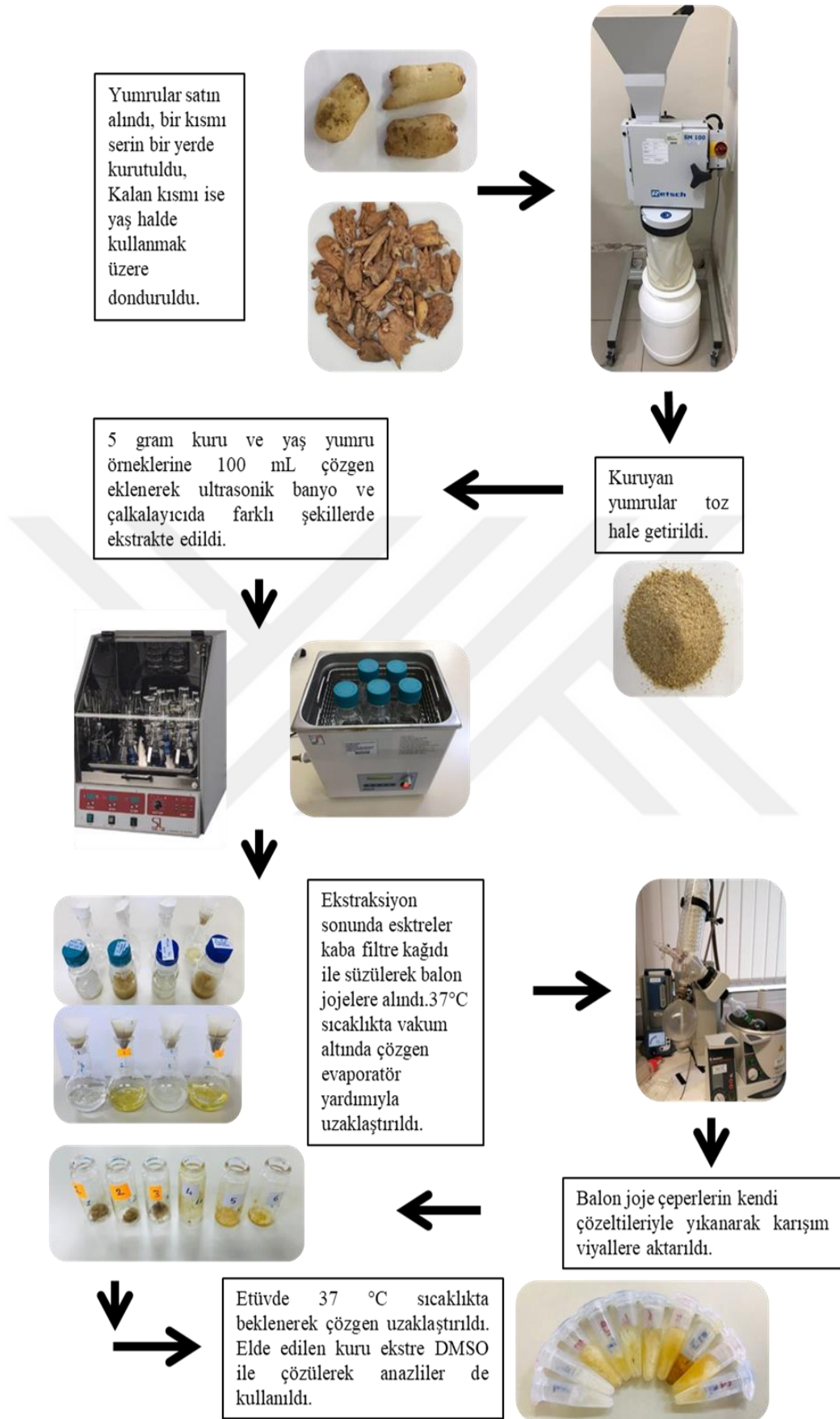
### 2.2.1. Bitki Yumrularının Ekstraksiyona Hazırlanması ve Ekstraksiyon İşlemi

Orkidelere ait yumrular ticari olarak satın alındı. Bir kısmı kurutuldu bir kısmı ise taze halde kullanılmak üzere, analizler yapılana kadar donduruldu. Bitki yumruları yaş ve kurutulmuş olarak, saf (%99) etanol ile 5 farklı ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edildi. Yumrular başlangıçta soğuk su ile yıkandı. Yıkanmış yumruların bir kısmı, gölgede iyice sertleşene kadar açık alanda kurutuldu bir kısmı ise yaş olarak donduruldu. Kurutulmuş ve yaş yumru örnekleri toz hale getirildi. 5 g yumru örneği üzerine 100 ml saf etanol eklendi. Tablo 4'teki ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstraktlar elde edildi.

Tablo 4. Tez çalışmasında kullanılan ekstraksiyon yöntemleri

|            | <b>Ekstraktlar</b> | <b>Ekstraksiyon Yöntemleri</b>                   |
|------------|--------------------|--------------------------------------------------|
| Kuru Yumru | 30'US              | 30 Dakika Ultrasonik Banyo                       |
|            | 60'US              | 60 Dakika Ultrasonik Banyo                       |
|            | 24h                | 24 Saat Çalkalayıcı (37 °C, 125 rpm)             |
|            | 24h+30'US          | 24 Saat Çalkalayıcı + 30 Dakika Ultrasonik Banyo |
|            | 24h+60'US          | 24 Saat Çalkalayıcı + 60 Dakika Ultrasonik Banyo |
| Yaş Yumru  | 30'US              | 30 Dakika Ultrasonik Banyo                       |
|            | 60'US              | 60 Dakika Ultrasonik Banyo                       |
|            | 24h                | 24 Saat Çalkalayıcı (37 °C, 125 rpm)             |
|            | 24h+30'US          | 24 Saat Çalkalayıcı + 30 Dakika Ultrasonik Banyo |
|            | 24h+60'US          | 24 Saat Çalkalayıcı + 60 Dakika Ultrasonik Banyo |

Toplamda yaş ve kuru yumrulara ait 10 farklı ekstrakt elde edildi. Yumru partikülleri kaba filtre kağıdından süzildikten sonra solvent evaporatörü ile 37 °C'de vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen kuru ekstraktlar tüm analizlerde kullanılmak üzere -18 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 10. Ekstraksiyon işlemi

### 2.3. Toplam Fenolik İeriğın Belirlenmesi

Yumru ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodunda (Slinkard ve Singleton, 1977), birkaç değişiklik yapılarak spektrofotometrik yöntemle mikrolakalarda belirlenmiştir (Acet ve Özcan, 2018).

#### Toplam Fenolik Madde Tayini İçin Gereken Çözeltiler:

- **%1’lik Sodyum karbonat çözeltisi:** Terazide 0.25 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartıldı. Tartılan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bir miktar saf su içinde çözüldükten sonra balon jojede son hacim 25 ml’ye saf su ile tamamlandı.
- **Folin-Ciocalteu reaktif çözeltisi:** Otomatik pipet yardımıyla 1 ml folin reaktifi alınarak son hacim saf su ile 10 ml’ye tamamlandı, ardından karanlık bir ortamda saklandı.
- **Gallik asit standart çözeltisi:** Terazide 10 mg gallik asit tartılarak 1 ml methanol içinde, vorteks kullanılarak tamamen çözölmesi sağlandı. Elde edilen stok çözelti 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml konsantrasyonda seyreltildi.

5-60 µg/ml (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60) konsantrasyon aralığı referans alınarak gallik asit standart grafiği oluşturuldu. Yapılan pipetlemeler Tablo 5’te özetlendi. Karışım 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra 760 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucuda absorpsiyon ölçümü yapılarak, toplam fenolik içerik gallik asit (mg GAE/g ekstre) eşdeğeri olarak ifade edildi. Yumru ekstrelerine ait 1 mg/ml’lik konsantrasyonları analizde kullanıldı.

Tablo 5. Toplam fenolik madde analizi için deney tasarımı

|                                           | Miktar, µl |         |          |        |
|-------------------------------------------|------------|---------|----------|--------|
|                                           | Kör        | Kontrol | Standart | Numune |
| Distile su                                | 250        | 31      | -        | -      |
| Ekstre                                    | -          | -       | -        | 31     |
| Standart                                  | -          | -       | 31       | -      |
| Folin-Ciocalteu fenol reaktifi çözeltisi  | -          | 125     | 25       | 125    |
| %10 (v/v)                                 | -          | -       | -        | -      |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> çözeltisi | -          | 94      | 94       | 94     |

\*Oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübasyona bırakıldı.

\*\*760 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu ile köre karşı absorbanslar ölçüldü.

### 2.4. Toplam Flavonoid İeriğının Belirlenmesi

Alüminyum nitrat kolorimetrik metodunda birkaç değişiklik uygulanarak, ekstrelerin toplam flavonoid miktarı mikrolakalarda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Moreno vd., 2000).

### Toplam Flavonoid Madde Miktarı İçin Gereken Çözeltiler:

- **Alüminyum nitrat ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) çözeltisi:** 0.176 g ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) hassas terazide tartılarak 1 ml saf su içerisinde çözülür.
- **Potasyum asetat ( $\text{KCH}_3\text{COO}$ ) çözeltisi (1 M):** 98.16 mg ( $\text{KCH}_3\text{COO}$ ) hassas terazide tartılarak 1 ml saf su içerisinde çözülür.
- **Etanol çözeltisi (%80, v/v):** 80 ml etanol mezür ile ölçülerek son hacmi balon joje içinde saf su kullanılarak 100 ml'ye tamamlanır.
- **Kuarsetin çözeltisi:** 10 mg kuarsetin hassas terazide tartılarak bir tüpe alınır. Öncelikle 80 µl saf etanol içerisinde çözülerek hacmi, 1000 µl'ye saf su ile tamamlanır. Ardından oluşturulan bu 10.000 µg/ml'lik kuarsetin stok çözeltisi %80'lik etanol ile 1:10 oranında seyreltilerek 1000 µg/ml'lik çözelti hazırlanır. Ardından 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 µg/ml seyreltik kuarsetin standart çözeltileri oluşturulur.

Yapılan pipetlemeler Tablo 6'da özetlendi. Pipetlemelerin sonunda mikropalakalar oda sıcaklığında ve karanlıkta 40 dakika bekletildikten sonra mikropalaka okuyucu ile 415 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Ekstraktların toplam favonoid içeriği, kuarsetin (mg QE/g ekstre) eşdeğeri olarak ifade edildi. 5-150 µg/ml (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150) konsantrasyon aralığında kuarsetin standart eğri grafiği oluşturuldu. Yumru ekstrelerinin 1 mg/ml'lik konsantrasyonları bu analizde kullanıldı.

Tablo 6. Toplam flavonoid madde tespiti için deney tasarımı

|                                      | Miktar, µl |         |          |        |
|--------------------------------------|------------|---------|----------|--------|
|                                      | Kör        | Kontrol | Standart | Numune |
| Etanol                               | 200        | 20      | -        | -      |
| Ekstre                               | -          | -       | -        | 20     |
| Standart                             | -          | -       | 20       | -      |
| Etanol çözeltisi                     | -          | 172     | 172      | 172    |
| $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ çözeltisi | -          | 4       | 4        | 4      |
| $\text{KCH}_3\text{COO}$ çözeltisi   | -          | 4       | 4        | 4      |

\*Oda sıcaklığında ve karanlıkta 40 dakika inkübasyona bırakıldı

\*\*415 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu ile köre karşı absorbanslar ölçüldü

### 2.5. Toplam Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Fosfomolibdat test metodunda birkaç küçük değişiklik yapılarak, yumru ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Zengin vd., 2014).

### Fosfomolibdat Testi İçin Gereken Çözeltiler:

- **Fosfomolibdat çözeltisi:** 1.6 ml sülfürik asit bir jöjeye dikkatlice alındı. Üzerine 12 ml methil alkol eklenerek homojen bir çözelti sağlanıncaya kadar karıştırıldı. 0.2472 g amonyum heptamolibdat tetrahidrat (4 mM  $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 4\text{H}_2\text{O})$ , MA:1235.86 g/mol) hassas terazide tartılarak balon jöjeye alınıp çözülmesi sağlandı. Ardından 0.2295 g sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (28 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ , MA:137.99 g/mol ) hassas terazide tartılıp bu karışıma eklenerek çözülmesi sağlandı. Çözülme oluşumunun ardından hacim çizgisine varana dek saf su ile tamamlandı.
- **Askorbik asit çözeltisi:** Hassas terazide 1.5 mg askorbik asit alındı ve 1 ml hacimde etanolde çözülmesi sağlandı. Ardından bu çözeltiden 1000 µg/ml'lik bir çözelti oluşturuldu. Son olarak 1000 µg/ml'lik stok çözeltisinden 50, 100, 150, 250 µg/ml'lik askorbik asit standart konsantrasyonları oluşturuldu.
- **Troloks çözeltisi:** Hassas terazide 1.5 mg troloks tartılarak alındı ve 1 ml hacimde etanolde çözülmesi sağlandı. Ardından bu stok çözeltiden 1000 µg/ml'lik bir çözelti oluşturuldu. Son olarak 1000 µg/ml'lik stok 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml'lik troloks standart konsantrasyonları oluşturuldu.

Askorbik asit standart grafiği için 50, 100, 150, 250 µg/ml, troloks için ise 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml konsantrasyonlarda troloks ile askorbik asit kullanılarak referans grafikleri oluşturuldu. Yapılan işlemler Tablo 7'de özetlendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için test tüpleri önceden ayarlanmış 95 °C sıcaklıktaki termal blokta 90 dakika bekletildi. Daha sonra soğutulan karışım 96 kuyucuklu plaklara otomatik pipet yardımı ile 250 µl hacimde eklenerek, mikrolaka okuyucuda 695 nm'de okuma gerçekleştirildi. Toplam antioksidan kapasitesi askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) olarak ifade edildi. Ekstrele ait 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonları bu analizde kullanıldı.

Tablo 7. Toplam antioksidan kapasite tespiti için deney tasarımı

|                              | Miktar, µl |         |          |        |
|------------------------------|------------|---------|----------|--------|
|                              | Kör        | Kontrol | Standart | Numune |
| Distile su                   | 3.3        | 0.3     | -        | -      |
| Ekstre                       | -          | -       | -        | 0.3    |
| Standart                     | -          | -       | 0.3      | -      |
| Fosfomolibdik asit kompleksi | -          | 3.0     | 3.0      | 3.0    |

\*Reaksiyonun gerçekleşmesi için deney tüpleri 95 °C termal blokta 90 dakika bekletildi.

\*\*Soğutulan karışım 96 kuyucuklu plakaya 250 µl hacimde enjekte edilerek mikrolaka okuyucuda 695 nm'de köre karşı (distile su) okundu.

## 2.6. Antioksidan Aktivite Belirleme Deneyleri

### 2.6.1. ABTS Radikal Süpürücü Aktivitesinin Belirlenmesi

Yumru ekstraktlarının ABTS radikal uzaklaştırma aktivitesi, Re vd. (1999) tarafından geliştirilen bir yöntemle, mikrolakalarda spektrofotometrik olarak birkaç küçük değişiklik yapılarak belirlenmiştir (Acet ve Özcan, 2018).

#### ABTS Tayini İçin Gereken Çözeltiler:

- **ABTS radikal çözeltisi (7 mM):** 38 mg 2,2'-azino-bis hassas terazide tartılarak 10 ml hacimde saf su içinde bir tüpte çözülmesi sağlandı. Ardından 6.622 mg potasyum persülfat ( $K_2S_2O_8$ ) hassas terazide tartılarak 10 ml distile su ile başka bir tüpte çözülmesi sağlandı. Bu 2 çözelti bir falkon tüpüne eklenerek karıştırıldı, falkon tüpünün çevresi folyo ile kaplandı. Işık görmeyen bir alanda oda sıcaklığında 12-14 saat süreyle bekletilerek ABTS radikal çözeltisi elde edildi. Bu çözeltinin optik yoğunluk değerinin 0.7 olması amacıyla karışım 1:37-40 oranında saf su kullanılarak istenilen yoğunluk değeri ayarlandı.
- **Askorbik asit çözeltisi:** Daha önce hazırlanan 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'lik çözeltiden 1, 3, 5, 7, 9  $\mu\text{g/ml}$ 'lik askorbik asit çözeltileri elde edildi.
- **Troloks çözeltisi:** Daha önce hazırlanan 1000  $\mu\text{g/ml}$ 'lik çözeltiden 1, 3, 5, 7, 9  $\mu\text{g/ml}$ 'lik troloks çözeltileri elde edildi.

Yapılan pipetlemeler Tablo 8'de özetlendi. ABTS radikal temizleme aktiviteleri şekil 32 ve 33'deki standart grafikleri baz alınarak askorbik asit ve troloks eşdeğeri olarak hesaplandı.

Ekstraktların radikal süpürme aktivitesi % inhibisyon formülüne göre hesaplandı ve  $IC_{50}$  değeri olarak verildi. Troloks ile askorbik asit için 1-9  $\mu\text{g/ml}$  (1, 3, 5, 7, 9) konsantrasyonlar da askorbik asit ve troloks standart grafikleri oluşturuldu. Ekstrelerin 0.1, 0.05, 0.0025, 0.0125, 0.00625, 0.003125  $\text{mg/ml}$ 'lik konsantrasyonları bu analiz için kullanıldı.

Tablo 8. ABTS radikali giderme aktivite tespiti için deney tasarımı

|                         | Miktar, $\mu\text{l}$ |         |          |        |
|-------------------------|-----------------------|---------|----------|--------|
|                         | Kör                   | Kontrol | Standart | Numune |
| Etanol                  | 240                   | 80      | -        | -      |
| Ekstre                  | -                     | -       | -        | 80     |
| Standart                | -                     | -       | 80       | -      |
| ABTS radikali çözeltisi | -                     | 160     | 160      | 160    |

\*Oda sıcaklığında, karanlıkta 6 dakika inkübe edildi.

\*\*750 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu ile köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.

### 2.6.2. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumru ekstraktlarının DPPH süpürücü aktivitesi, Özcan ve Acet (2018)'in metodunda birkaç değişiklik yapılarak mikroplakalarda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

#### DPPH Tayini İçin Gereken Çözeltiler:

- **DPPH radikal çözeltisi (0.1 mM):** 3.9 mg DPPH hassas terazide tartıldı ve balon jojeye eklendi. Etanol ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı. Balon joje etrafı folyo ile sarılarak çözeltinin karanlık bir ortamda muhafazası sağlandı.
- **Askorbik asit standart çözeltisi:** Hassas terazide 1.5 mg askorbik asit tartılarak bir eppendorf tüpe eklendi. Üzerine 1 ml ethanol eklenerek vortekslendi. Elde edilen bu stok çözelti 1000 µg/ml'ik seyreltildikten sonra bu çözeltiden 1, 3, 5, 7, 9 µg/ml'lik seyreltik askorbik asit standartları oluşturuldu.
- **Troloks standart çözeltisi:** Hassas terazide 1.5 mg troloks tartılarak bir eppendorf tüpe eklendi. Üzerine 1 ml ethanol eklenerek vortekslendi. Elde edilen bu stok çözelti 1000 µg/ml'lik seyreltildikten sonra bu çözeltiden 1, 3, 5, 7, 9 µg/ml'lik troloks standartları oluşturuldu.

Yapılan pipetlemeler Tablo 9'da özetlendi. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika tutulduktan sonra mikroplaka okuyucu ile 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Ekstraktların DPPH süpürme aktivitesi, şekil 34 ve 35'deki standart eğri grafikleri göz önüne alınarak askorbik asit ve troloks eşdeğeri olacak şekilde belirlendi. DPPH aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri olarak verildi. Askorbik asit ve troloks için 1-9 (1, 3, 5, 7, 9) µg/ml konsantrasyon aralığında standart grafikleri oluşturuldu. Ekstrelerin 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. Sonuçlar mg/ml olarak verildi.

Tablo 9. DPPH radikali süpürme aktivite tespiti için deney tasarımı

|                         | Miktar, µl |         |          |        |
|-------------------------|------------|---------|----------|--------|
|                         | Kör        | Kontrol | Standart | Numune |
| Etanol                  | 250        | 125     | -        | -      |
| Ekstre                  | -          | -       | -        | 125    |
| Standart                | -          | -       | 125      | -      |
| DPPH radikali çözeltisi | -          | 125     | 125      | 125    |

\*Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

\*\*517 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu ile köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.

### 2.6.3. FRAP Demir İndirgeme Gücü Aktivitesi

Yumru ekstraktlarının demir indirgeme gücü aktivitesi Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yöntemle, spektrofotometrik olarak birkaç değişiklikle belirlenmiştir.

#### FRAP Tayini İçin Gereken Çözeltiler:

- **0.2 Molar fosfat tamponu hazırlanması:** Hazır tablet kullanıldı. 1 adet fosfat tamponu tableti 100 ml saf suda çözülerek pH'si 7.7'ye ayarlandı.
- **%1'lik potasyum ferik siyanür  $[K_3Fe(CN)_6]$  çözeltisi:** 0.1 gram  $[K_3Fe(CN)_6]$  hassas terazide tartılarak 10 ml saf su içinde çözülmesi gerçekleştirildi.
- **%0.1'lik  $FeCl_3$  çözeltisi:** 0.01 gram  $FeCl_3$  hassas terazide tartılarak 10 ml saf suda çözüldü.
- **%10'luk TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi:** 1 gram TCA hassas terazide tartılarak 10 ml saf su içinde çözüldü.
- **Troloks çözeltisi:** 5 mg troloks tartıldı, 1 ml ethanol içinde çözülmesi sağlandı. Elde edilen bu stok çözelti 1000  $\mu g/ml$ 'lik seyreltildikten sonra 50, 100, 150, 200, 250, 300  $\mu g/ml$ 'lik seyreltik troloks standart konsantrasyonları oluşturuldu.

Deney tüplerine sırayla; 40  $\mu l$  ekstre numunesi, 100  $\mu l$  0.2 M pH 7.7 fosfat tamponu, 100  $\mu l$  %1'lik potasyum ferik siyanür  $[K_3Fe(CN)_6]$  çözeltisi eklenerek karışım 50 °C sıcaklıkta termal blokta 20 dakika inkübe edildi ardından soğutuldu. Soğutulan karışıma 100  $\mu l$  %10'luk TCA çözeltisi eklendi. Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerden 100  $\mu l$  mikropalakaya aktarılarak üzerine 100  $\mu l$  saf su eklendi. Son olarak 20  $\mu l$  %0.1'lik  $FeCl_3$  çözeltisi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 700 nm dalgaboyunda ölçüm yapıldı. Demir İndirgeme Gücü Aktivitesi troloks (mg TE/g ekstre) eşdeğeri olarak verildi. Troloks için 250-1.953  $\mu g/ml$  konsantrasyon aralığında (250, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953) standart eğri grafiği oluşturuldu. Ekstrelerin 1 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı.

### 2.7. Ekstraktların Enzim İnhibisyon Aktiviteleri ( $\alpha$ -amilaz ve $\alpha$ -glukozidaz):

Yumru ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon etkileri Özcan vd. (2019) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir,  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivitesinin saptanması için iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi tercih edilmiştir. Her iki yöntemde de reaksiyonlar 96 kuyucuklu plakalarda test edildi. Absorbans değerleri  $\alpha$ -glukozidaz ve  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyon aktiviteleri için sırasıyla 400 nm ve 630

nm’de belirlendi. Sonuçlar, her iki yöntem için akarboz eşdeğeri (mmol ACAE/g ekstre) olarak ifade edildi.

### 2.7.1. Alfa Glukozidaz Enzim İnhibisyon Yöntemi

*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumru ekstrelerinin antidiyabetik etkilerinin araştırılması amacıyla, Palanisamy vd. (2011)’nin yöntemine göre Alfa Glukozidaz Enzim İnhibisyonu yapıldı.

#### Alfa Glukozisaz Enzim İnhibisyon Tayini için Gereken Çözeltiler:

- **3 mM glutatyon çözeltisi:** 1 mg glutatyon hassas terazide tartılarak 1 ml saf suda çözüldü.
- **5 mM PNPG (4-Nitrofenil  $\beta$ -D-glukuronid) çözeltisi:** 45 mg PNPG (4-Nitrofenil  $\beta$ -D-glukuronid) 1 ml fosfat tamponunda çözüldü. PNPG ışığa karşı hassas olduğu için tüpün etrafı folyo ile sarıldı.
- **0.2 Molar sodyum karbonat çözeltisi:** 10 ml çözelti için 0.21 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tartılarak saf suda çözüldü.
- **Glukozidaz enzim çözeltisi:** 1 mg glukozidaz hassas terazide tartılarak 1 ml fosfat tamponuyla çözüldü. Enzimin daha kararlı bir yapıda bulunması için çözeltiye 2 mg BSA (bovine serum albumin) eklendi.
- **Akarboz çözeltisi:** 10 mg akarboz hassas terazide tartılarak 1 ml saf su ile çözüldü. Elde edilen ana stok çözelti 1 mg/ml olacak şekilde seyreltildi. Elde edilen bu 2.stok çözeltiden 10, 5, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 mg/ml konsantrasyon aralığı kullanılarak standart eğrisi oluşturuldu.
- **Fosfat tamponu çözeltisi:** 20 ml fosfat tamponu hazırlamak için 29.1 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 57.4 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 7 mg  $\text{NaCl}$  hassas terazide tartılarak önce bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra son hacim, saf suyla 20 ml’ye tamamlandı.

Bu analiz in vitro ortamda, alfa glukozidaz enziminin akarboz maddesi tarafından yok edilmesi hipotezine dayanmaktadır. Enzim inhibiyon reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla eppendorf tüperine sırasıyla 50  $\mu$ l yumru ekstresi, 50  $\mu$ l glutatyon çözeltisi, 50  $\mu$ l glukozidaz enzimi ve 50  $\mu$ l PNPG substratı eklendi. Elde edilen bu reaksiyon karışımı 15 dakika 37 °C sıcaklıkta su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla tüplere 50  $\mu$ l 0.2 molar sodyum karbonat çözeltisi eklendi. Ardından deney tüplerindeki reaksiyon karışımından 240  $\mu$ l alınarak 96 kuyucuklu mikro plakalara aktarıldı. 415 nm’de suya karşı absorbands ölçümü gerçekleştirildi. Her bir örneğin enzim içermeyen körleri de hazırlandı. Yukarıda

anlatılan reaksiyon karışımında benzer şekilde, enzim yerine saf su eklenerek enzim içermeyen kör grubu oluşturuldu.  $\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktivitesi akarboz eşdeğeri olarak (mmol ACAE/g ekstre) verildi.

### 2.7.2. Alfa Amilaz Enzim İnhibisyon Yöntemi

*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumru ekstraktlarının antidiyabetik enzim inhibisyon etkilerinin araştırılması amacıyla, Caraway-Somogyi iyodin/potasyum iyodid (IKI) yöntemi tercih edildi (Özcan vd., 2019).

#### Alfa Amilaz Enzim İnhibisyon Tayini İçin Gereken Çözeltiler:

- **Amilaz enzim çözeltisinin hazırlanması:** Terazi yardımıyla 10 mg amilaz tartılarak, soğutulmuş 1 ml fosfat tamponunda çözöldü. Hazırlanan çözelti 1 gün buzdolabında bekletildi. Elde edilen bu stok enzim çözeltisi 50 kat seyreltildi ve 50 ml, 2 u/ml konsantrasyon da enzim çözeltisi analizde kullanıldı.
- **Fosfat tamponu çözeltisinin hazırlanması:** 20 ml fosfat tamponu hazırlamak için 29.1 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 57.4 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 7 mg  $\text{NaCl}$  hassas terazide tartılarak önce bir miktar saf suda çözöldü. Daha sonra son hacim saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.
- **Akarboz standart çözeltisinin hazırlanması:** 10 mg akarboz hassas terazide tartılarak 1 ml saf su ile çözöldü. Elde edilen ana stok çözelti 1 mg/ml olacak şekilde seyreltildi. Elde edilen bu 2.stok çözeltiden 10, 5, 3.5, 3, 2.5, 2, 1.5 mg/ml konsantrasyon aralığı kullanılarak standart eğrisi oluşturuldu.
- **Nişasta solüsyonun hazırlanması (%0.05):** 5 mg nişasta tartılarak 10 ml fosfat tamponuyla beraber 40 °C'ye kadar ısıtılarak çözöldü. Berrak bir çözelti elde etmek amacıyla kaba filtre kağıdından geçirildi.
- **İyodin/potasyum iyodid (IKI) çözeltisinin hazırlanması:** %1'lik iyot için 200 mg iyot hassas terazide tartılarak bir erlene eklendi. Üzerine %2'lik potasyum için 400 mg potasyum iyodid tartılarak eklendi. Tartılan kimyasallar 20 ml saf suda aynı anda çözöldü.
- **1 M HCl solüsyonunun hazırlanması:** 1.056 ml HCl ölçölerek son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

Bu yöntem alfa-amilaz enziminin akarboz tarafından inhibe edilmesi teorisini baz alır. Enzim inhibisyon reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla deney tüperine sırasıyla 50  $\mu\text{l}$  yumru ekstresi, 50  $\mu\text{l}$  amilaz enzim çözeltisi eklendi. Ardından deney tüpleri 10 dakika daha önce ısıtılmış 37 °C sıcaklıkta su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon

sonuna tüplere 50 µl %0.05 nişasta substrat çözeltisi eklenerek 10 dakika daha 37 °C sıcaklıkta su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için deney tüplerine 1 molar HCL çözeltisi eklenerek 10 dakika daha 37 °C sıcaklıkta su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda deney tüplerine 200 µl IKI solüsyonu eklendi ve ardından 250 µl hacimde mikropalakalara aktararak 595 nanometrede saf suya karşı absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Her bir örneğin enzim içermeyen negatif körleride hazırlandı. Yukarıda anlatılan reaksiyon karışımında benzer şekilde, enzim yerine saf su eklenerek enzim içermeyen kör grubu oluşturuldu. Ekstrelerin 1 mg/ml konsantrasyonu kullanıldı. α-amilaz analiz sonuçları mmol ACAE/g ekstre olarak verildi.

### 2.7.3. Tirozinaz Enzim İbhibisyon Yöntemi

Tirozinaz inhıbe edici aktivite substrat olarak L-DOPA kullanılarak, Sarıkürkçü ve Zengin (2020)'e göre belirlendi. Öncelikle mikropalakada, 25 µl ekstre, 40 µl tirozinaz solüsyonu ve 100 µl fosfat tamponu ile karıştırıldı. 15 dakika süreyle 25 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 10 mM, 40 µl L-DOPA ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Benzer şekilde, enzim (tirozinaz) çözeltisi içermeyen tüm reaksiyon reaktiflerine numune çözeltisi eklenerek bir kör hazırlandı. Numune ve kör absorbansları, 25 °C'de 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 492 nm'de okundu. Kör numunenin absorbansı numunenin absorbansından çıkarıldı ve tirozinaz inhıbe edici aktivite, baicalein eşdeğeri (mg BAE/g ekstre) olarak ifade edildi.

### 2.8. DNA Koruyucu Aktivitenin Belirlenmesi:

*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumru ekstraktlarının pUC19 plazmiti üzerine koruyucu aktivitesinin varlığı fenton reaktifi kullanılarak %1'lik agaroz jel elektroforezin de belirlendi.

#### DNA Koruyucu Aktivite İçin Gereken Çözeltiler:

- **Fenton reaktifinin hazırlanması:** 129.76 mg FeCl<sub>3</sub> ve 88.06 mg askorbik asit hassas terazide tartılarak bir miktar saf suda çözüldü. Ardından 30 µl hidrojen peroksit otomatik pipet yardımıyla bu karışıma eklenerek son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Elde edilen solüsyon 5 dakika kadar ultrasonik banyoda tutularak tam çözülmesi sağlandı.
- **1 x TAE tampon solüsyonun hazırlanması:** 50x TAE tamponundan 10 ml alınarak 490 ml saf su ile 1x 500 ml TAE tamponu hazırlandı.
- **pUC19 Plazmit DNA'nın çoğaltılması:** Yapılacak olan analizlerde DNA koruma potansiyeli en iyi olan ekstre ve bu ekstrenin en etkili konsantrasyonu

araştırılacağı için yeterli miktarlarda pUC19 plazmit DNA'sı gerekmektedir. Bu amaçla pUC19 plazmit DNA, kompetent hücre ve transformasyon işlemleriyle çoğaltılarak izole edildi.

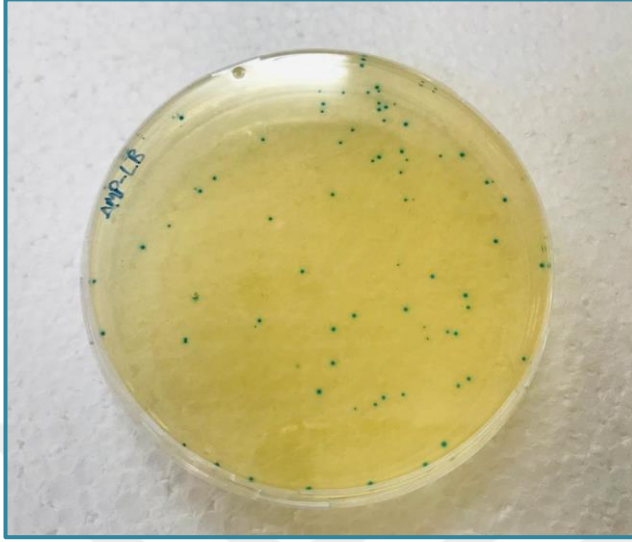
**Kompetent hücre hazırlanması:** Kompetent hücre hazırlamak için kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) metodu tercih edildi.

- Öncelikle *E. coli* DH5 $\alpha$  stoğundan 100  $\mu\text{l}$  alınarak 10 ml LB besiyerine eklendi. Gece kültürü oluşturmak için hücreler 1 gece 37 °C'de 125 rpm'de çalkalayıcıda büyütüldü.
- 0.4\ 0.6 OD değerinin elde edilebilmek için gece kültüründen 500  $\mu\text{L}$  alınarak ampisilinsiz 10 ml LB besiyerine ekim yapıldı. 37 °C'de 125 rpm'de çalkalayıcıda 2 saat inkübe edildi.
- 0.4\ 0.6 OD değeri elde edilen hücre kültürleri, süre sonunda 5 dakika buzda bekletildi.
- Hücre kültürleri falkon tüplerine aktarıldı, 4500 rpm'de ve 4 °C'de 5 dakikasüre ile santrifüjlenerek süpernant atıldı.
- Pellet kısma 10 ml 100 mM soğuk kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) eklendi ve hafif pipetleme ile pellet çözüldü.
- 30 dakika buzda bekletildi.
- Süre sonunda tekrar 4500 rpm'de ve 4 °C sıcaklıkta 5 dakika süre ile santrifüjlenerek süpernatant kısım atıldı.
- Santrifüj sonunda pellet kısma 2 ml soğuk kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) eklenerek hafif pipetleme ile çözüldü. Kullanım için en az 2 saat 4 °C'de bekletildi.

**Transformasyon;** Copur Cicek vd. (2013)'ye göre yapıldı.

- 100  $\mu\text{l}$  kompetent hücre bir tüpe alınarak içerisine 1  $\mu\text{l}$  pUC19 plazmit DNA'sı eklendi. Bu karışım buzda 20 dakika bekletildi.
- Süre sonunda, önceden ısıtılmış termal blokta 42 °C'de 90 saniye ısı şoku uygulandı.
- Tüplere 200  $\mu\text{l}$  hacimde LB besiyeri eklenmesinin ardından 37 °C'de 2 saat süreyle bekletildi.
- Ampisilin antibiyotiği ihtiva eden LB besiyerleri 40  $\mu\text{l}$  IPTG ve 40  $\mu\text{l}$  X-gal steril bir cam baget yardımıyla iyice emdirildi.
- 2 saat sonunda tüplerdeki hücre kültürlerinden 100  $\mu\text{l}$  alınarak ampisilinli petrilere cam baget ile ekildi. Mikrobiyal gelişim için petrilere 37 °C'de etüvde 16 saat bekletildi.

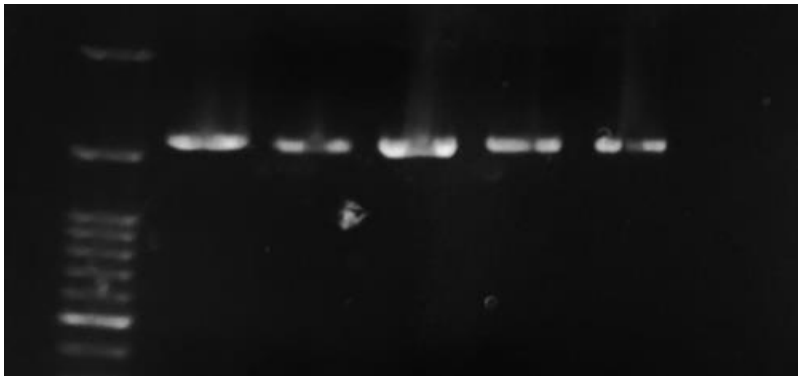
- Süre sonunda Şekil 11'deki petri kabında oluşan mavi kolonilerden birisi steril bir pipet ucuyla alınarak 3 ml, ampisilinli LB besi yeri içeren bir deney tüpüne eklendi. 37 °C'de çalkalayıcıda 16 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 11. Petrilerde transformasyon sonucu oluşan mavi renkli koloniler

- Süre sonunda kültürler plazmit DNA izolasyonu yapmak üzere eppendorf tüplere alınarak santrifüjde çöktürüldü.

**Plazmit DNA izolasyonu:** Transformasyon ile çoğaltılan pUC19 plazmit DNA'sı EZ-10 Spin Column kiti kullanılarak çeşitli hücresel kirliliklerden arındırıldı. İzole edilen plazmit DNA'sı ve 1 kb ladder %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Şekil 12'de transformasyon ve izolasyonun başarılı olduğu görüldü. Elde edilen plazmit çeşitli analizde kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 12. Çoğaltılan pUC19 plazmitine ait jel görüntüsü

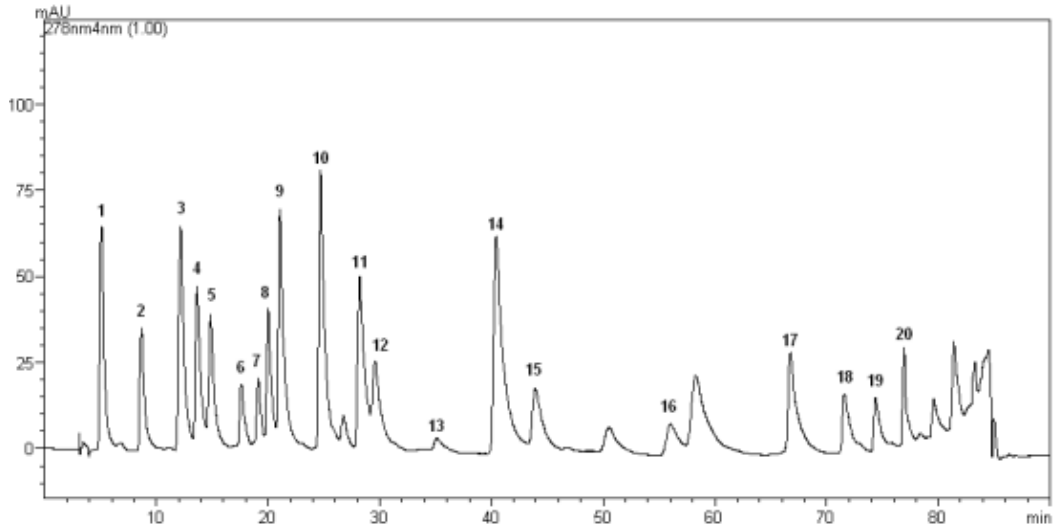
- **%1'lik Agaroz jel çözeltisinin hazırlanması:** 1 g agaroz tartılarak cam erlene alındı. Daha sonra, 100 ml daha önce hazırlanmış 1 x TAE tamponu

eklendi. Elde edilen karışım, agaroz iyice çözülene kadar mikrodalgada ısıtıldı. Tamamen çözölen agaroz jel çözeltisinin 5 dakika kadar ilk sıcaklığının geçmesi beklendi. İlk sıcakğı geçen çözeltiye 3 µl etidyum bromür eklenerek iyice karıştırıldı. Jel karışımı tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına dökölerek 15 dakika kadar jelin sertleşmesi beklendi.

*Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumru ekstraktlarının pUC19 plazmiti üzerine koruyucu aktivitesinin varlığı fenton reaktifi ile %1'lik agaroz jel elektroforezin de belirlendi. Sırasıyla deney tüplerine 6 µl ultra saf su, 5 µl yumru ekstresi, 3 µl pUC19 plazmit DNA ve son olarak 5 µl fenton reaktifi eklendi. 37 °C sıcaklıkta 30 dk inkübe edilen karışım 1 µl yükleme boyasıyla muamele edilmesinin ardından 10 µl hacimde elektroforez kuyucuklarına yüklenerek, 90 Voltta 1 saat süreyle yürütölldü. Jel UV ışık altında görünür hale getirilerek sonuçlar negatif ve pozitif kontrollere kıyasla değeriendirildi. Pozitif kontrol olarak 5 µl fenton reaktifi, 3 µl pUC19 plazmit DNA ve 11 µl ultra saf su ile hazırlanan grup kullanıldı. Negatif kontrol için 3 µl pUC19 plazmit DNA ve 16 µl ultra saf su ile hazırlanan grup kullanıldı.

## **2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Fenolik Madde İeriğinin Belirlenmesi**

Çalışmada yaş ve kuru yumrulara ait 60 dakika ultrasonik banyoda, 24 saat çalkalayıcıda ve 24 saat çalkalayıcı ardından 60 dakika ultrasonik banyoda hazırlanan ekstreler kullanıldı. Shimadzu Marka HPLC cihazı kullanılarak orkidelerde sıkça rastlanılan 20 farklı fenolik bileşik araştırıldı. *Gallik asit, protokateşik asit, kateşin, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, sirinjik asit, vanilin, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapinik asit, benzoik asit, o-kumarik asit, rutin, rosmarinik asit, cinnamik asit, kuersetin, luteolin, kamferol* içeriklerine ilişkin sonuçlar µg/g ekstre olacak şekilde gösterildi. Bu analiz için detektör (DAD,  $\lambda$  max=278), degazör ünitesi (DGu-14A), otosampler (SIL-10 ADvp) ve pompa (LC-10 ADvp), (250×4.60 mm, 5 µm partiköl büyüklüğü) kolonu, CTO-10Avp kolon fırını kullanıldı. Mobil faz %3'lük asetik asit çözeltisi (Mobil faz A) ve metanol (Mobil faz B), faz akış hızı 0.8 ml/dk, akış tipi gradient elüsyonu ve enjeksiyon hacmi ise 20 µl olarak belirlendi. Şekil 13'teki standart kromatogramı baz alınarak değeriendirme gerçekleştirildi. Çalışmadaki bu analiz, Süleyman Demirel Üniversitesi YETEM Uygulamalı Temel Bilimler ve Teknolojileri Araştırma Birimi'nden hizmet satın alınarak gerçekleştirilmiştir.



1: Gallik asit, 2: Protokateşik asit, 3:Kateşin, 4: p-hidroksi benzoik asit, 5: Klorojenik asit, 6: Kafeik asit, 7: Epikateşin, 8: Sirinjik asit, 9: vanilin, 10: p-kumarik asit, 11: Ferulik asit, 12: Sinapinik asit, 13: Benzoik asit, 14: o-kumarik asit, 15: Rutin, 16: Rosmarinik asit, 17: Sinnamik asit, 18: Quersetin, 19: Luteolin, 20: Kamferol

Şekil 13. HPLC analizi için araştırılan standart maddelere ait kromotogram

## 2.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Analizleri

Antimikrobiyal hassasiyet, bir antimikrobiyal maddenin belirli herhangi bir mikroorganizma türüne karşı in vitro işlevini ortaya koymak için test edilmiştir. MİK değeri, mikroorganizmanın mikrodilüsyon kuyucuklarındaki üremesini tamamen yok eden en düşük madde konsantrasyonu olarak değerlendirilir. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerini analiz etmek için mikrodilüsyon yöntemi tercih edildi. Yapılan analizde *Salmonella thyphi*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Proteus vulgaris* mikroorganizmaları kullanıldı. Bu mikroorganizmalar Giresun Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edildi. Testte mikroorganizma konsantrasyonu 0.5 MacFarland standardına göre hazırlandı. Yumru ekstraktlarının antimikrobiyal hassasiyeti 96 kuyucuklu plakalarda belirlendi. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda mikrobiyal üreme gözlenmeyen kuyucuklardaki konsantrasyon MİK değeri olarak kaydedildi.

## 2.11. İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgular SPSS programı (Windows 2000 için sürüm 20, SPSS Inc.) yardımıyla, One-Way Anova tarafından hesaplanmıştır. Önem arzeden değişiklikler Duncan'ın çoklu testleri kullanılarak belirlendi.  $P < 0.05$  değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Ekstrakt Verimi

Bitkileri ekstrakte etmek için etanol kullanıldı. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisinin yaş ve kuru yumrularına ait ekstrakt verimleri Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* yumrularının ekstrakt verimleri

|            | Ekstraktlar | % Verim |
|------------|-------------|---------|
| Kuru Yumru | 30'US       | 2.74    |
|            | 60'US       | 2.97    |
|            | 24h         | 3.1     |
|            | 24h+30'US   | 3.23    |
|            | 24h+60'US   | 3.38    |
| Yaş Yumru  | 30'US       | 1.45    |
|            | 60'US       | 1.41    |
|            | 24h         | 1.44    |
|            | 24h+30'US   | 1.65    |
|            | 24h+60'US   | 2.44    |

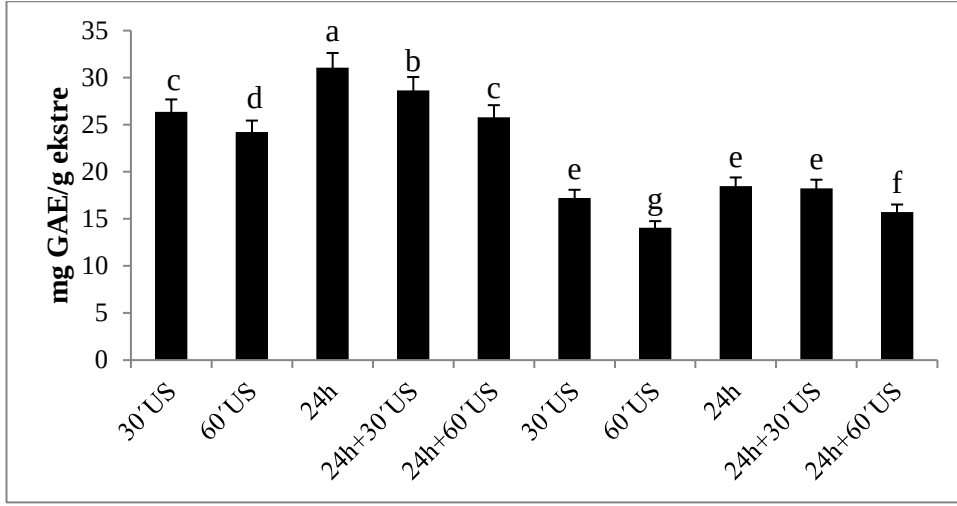
30'US: 30 dk ultrasonik su banyosu, 60'US: 60 dk ultrasonik su banyosu, 24h:24 saat çalkalayıcı, 24h+30'US: 24 saat çalkalayıcı+30 dk ultrasonik su banyosu, 24h+60'US: 24 saat çalkalayıcı+60 dk ultrasonik su banyosu

#### 3.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Folin-Ciocalteu yönteminden yararlanılarak, bitki ekstratlarının toplam fenolik madde miktarı belirlendi. Toplam fenolik madde bulguları Şekil 29'daki standart grafiği baz alınarak gallik asit eşdeğeri olacak şekilde ortaya konuldu (Tablo 11).

Tablo 11. Toplam fenolik madde miktarı bulguları

|            | Ekstraktlar | Toplam Fenolik Madde<br>(mg GAE/g Ekstre) |
|------------|-------------|-------------------------------------------|
| Kuru Yumru | 30'US       | 26.37±0.47 <sup>c</sup>                   |
|            | 60'US       | 24.23±1.06 <sup>d</sup>                   |
|            | 24h         | 31.07±0.70 <sup>a</sup>                   |
|            | 24h+30'US   | 28.64±0.98 <sup>b</sup>                   |
|            | 24h+60'US   | 25.79±0.88 <sup>c</sup>                   |
| Yaş Yumru  | 30'US       | 17.23±1.08 <sup>e</sup>                   |
|            | 60'US       | 14.06±0.34 <sup>g</sup>                   |
|            | 24h         | 18.48±0.22 <sup>e</sup>                   |
|            | 24h+30'US   | 18.25±0.73 <sup>e</sup>                   |
|            | 24h+60'US   | 15.74±0.43 <sup>f</sup>                   |



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

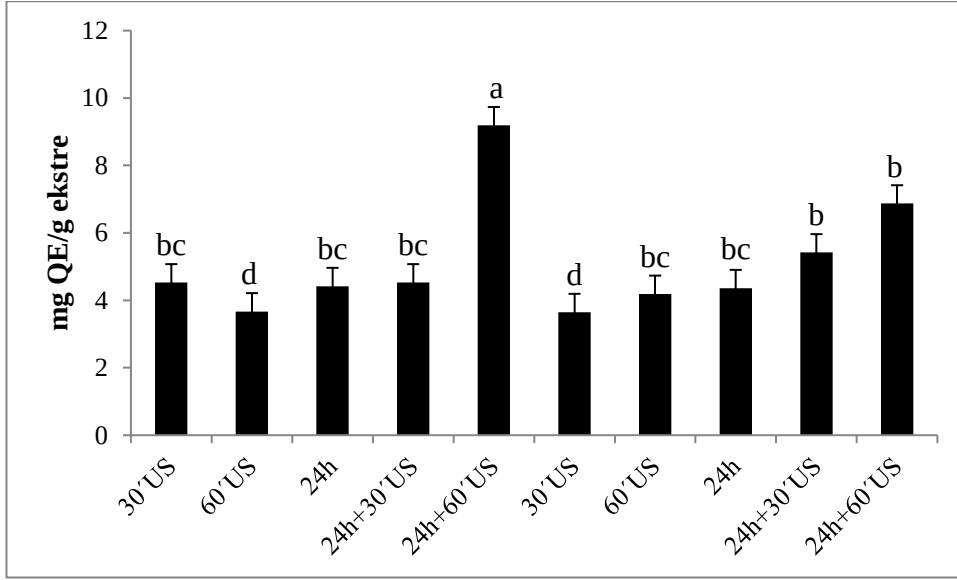
Şekil 14. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstraktlarının gallik asite eşdeğer, fenolik madde miktarları

### 3.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları

Alüminyum nitrat yöntemi kullanılarak ekstraktların toplam flavonoid madde içeriği belirlendi. Toplam flavonoid madde miktarı Şekil 30'daki standart grafiği referans alınarak kuarsetin eşdeğeri olacak şekilde ortaya konuldu (Tablo 12).

Tablo 12. Toplam toplam flavonoid madde miktarı bulguları

| Ekstraktlar |           | Toplam Flavonoid Madde<br>(mg QE/g Ekstre) |
|-------------|-----------|--------------------------------------------|
| Kuru Yumur  | 30'US     | 4.53±0.35 <sup>bc</sup>                    |
|             | 60'US     | 3.67±0.40 <sup>d</sup>                     |
|             | 24h       | 4.42±0.44 <sup>bc</sup>                    |
|             | 24h+30'US | 4.53±0.01 <sup>bc</sup>                    |
|             | 24h+60'US | 9.19±0.31 <sup>a</sup>                     |
| Yaş Yumur   | 30'US     | 3.65±0.19 <sup>d</sup>                     |
|             | 60'US     | 4.19±0.55 <sup>bc</sup>                    |
|             | 24h       | 4.36±0.30 <sup>bc</sup>                    |
|             | 24h+30'US | 5.42±1.46 <sup>b</sup>                     |
|             | 24h+60'US | 6.87±2.16 <sup>b</sup>                     |



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 15. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin kuersetine eşdeğer flavonoid madde miktarları

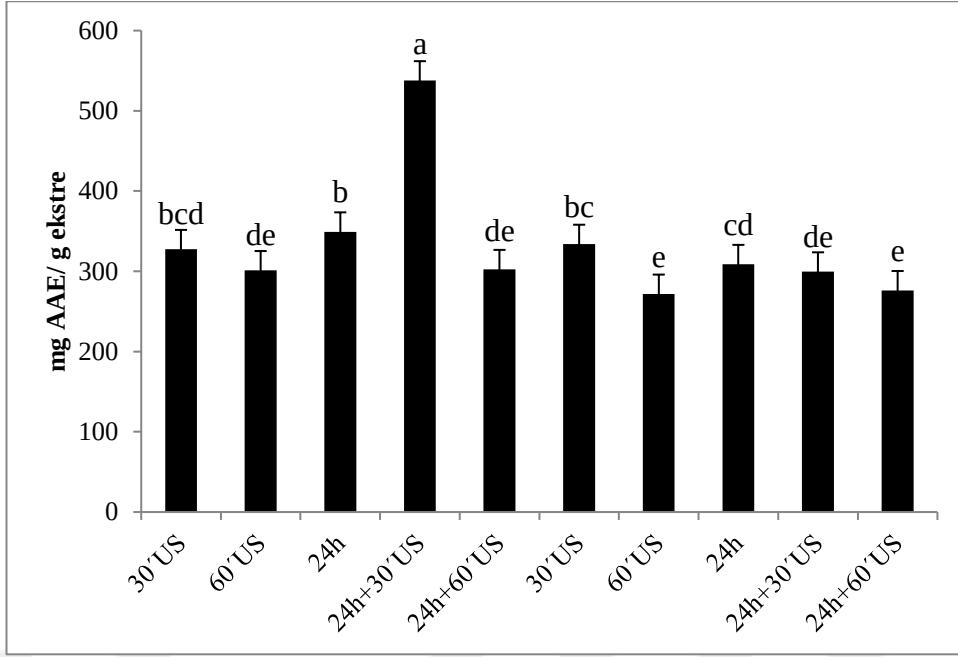
### 3.4. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları

#### 3.4.1. Fosfomolibdat Yöntemi Tayini Sonuçları

Fosfomolibdat yöntemi ile beraber bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitesi tayin edildi. Toplam antioksidan kapasite Şekil 31 ve 32'deki standart grafikleri göz önünde bulundurularak troloks eşdeğeri ve askorbik asit eşdeğeri olarak belirlendi (Tablo 13).

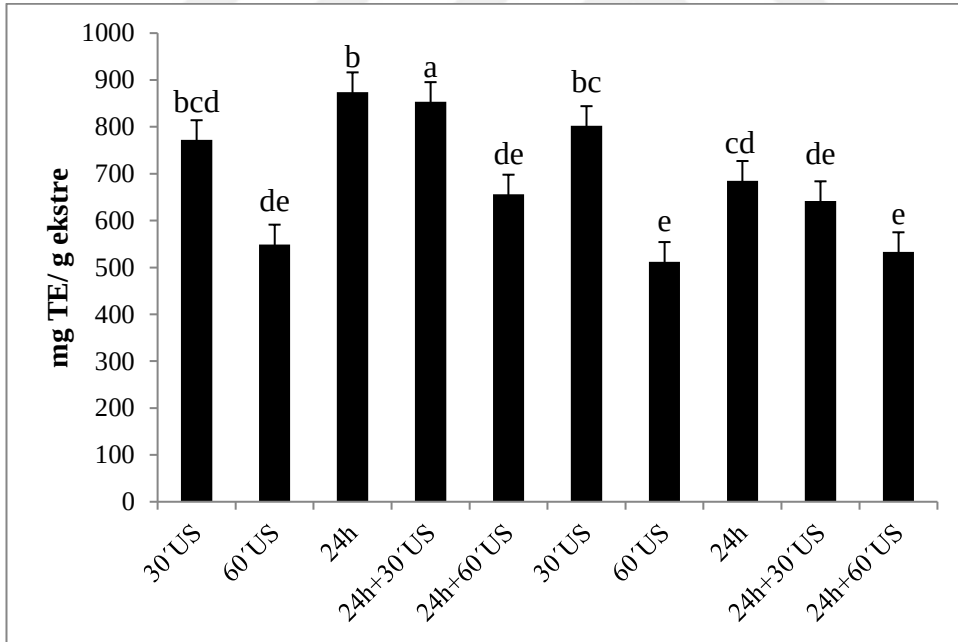
Tablo 13. Toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat) bulguları

|            | Ekstraktlar | mg AAE/g Ekstre                  | mg TE/g Ekstre                   |
|------------|-------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Kuru Yumru | 30'US       | 327.41 $\pm$ 1.34 <sup>bcd</sup> | 772.08 $\pm$ 6.25 <sup>bcd</sup> |
|            | 60'US       | 301.07 $\pm$ 11.60 <sup>de</sup> | 549.17 $\pm$ 24.16 <sup>de</sup> |
|            | 24h         | 349.29 $\pm$ 4.28 <sup>b</sup>   | 874.17 $\pm$ 20.00 <sup>b</sup>  |
|            | 24h+30'US   | 537.68 $\pm$ 5.89 <sup>a</sup>   | 853.33 $\pm$ 17.50 <sup>a</sup>  |
|            | 24h+60'US   | 302.50 $\pm$ 13.75 <sup>de</sup> | 655.83 $\pm$ 14.16 <sup>de</sup> |
| Yaş Yumru  | 30'US       | 333.84 $\pm$ 9.55 <sup>bc</sup>  | 802.08 $\pm$ 14.58 <sup>bc</sup> |
|            | 60'US       | 271.70 $\pm$ 5.89 <sup>e</sup>   | 512.08 $\pm$ 13.75 <sup>c</sup>  |
|            | 24h         | 308.75 $\pm$ 9.10 <sup>cd</sup>  | 685.00 $\pm$ 12.50 <sup>cd</sup> |
|            | 24h+30'US   | 299.46 $\pm$ 7.32 <sup>de</sup>  | 641.67 $\pm$ 14.16 <sup>de</sup> |
|            | 24h+60'US   | 276.16 $\pm$ 17.76 <sup>e</sup>  | 532.92 $\pm$ 19.58 <sup>c</sup>  |



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 16. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstraktlarının askorbik asite eşdeğer fosfomolibdat bulguları



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 17. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstraktlarının troloksa eşdeğer fosfomolibdat bulguları

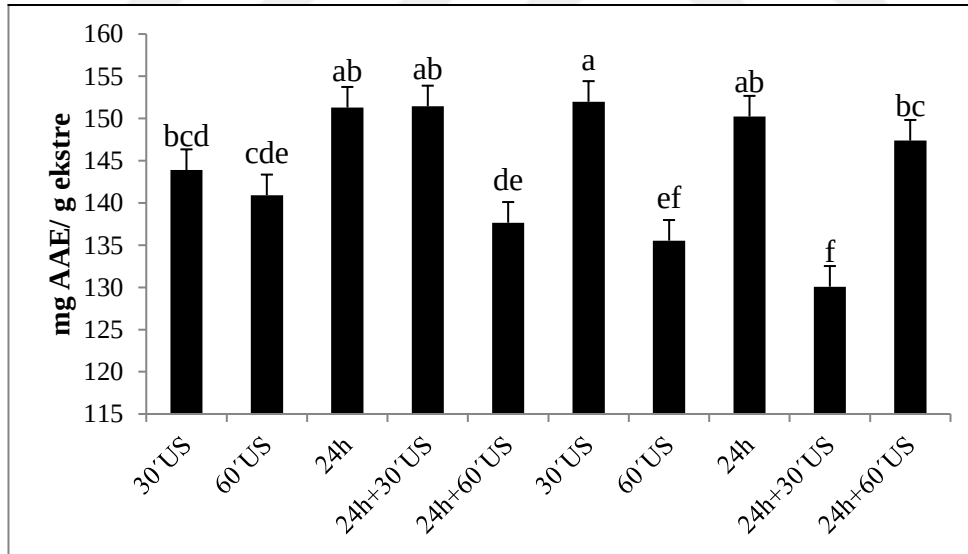
### 3.5. Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

#### 3.5.1. ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini Sonuçları

Ekstrelerin ABTS aktiviteleri Şekil 33 ve 34'deki standart grafikleri baz alınarak askorbik asit ve troloks eşdeğeri olarak verildi. Aynı zamanda ekstrelerin ABTS aktivitesi IC<sub>50</sub> (mg/ml) olarak ortaya koyuldu (Tablo 14).

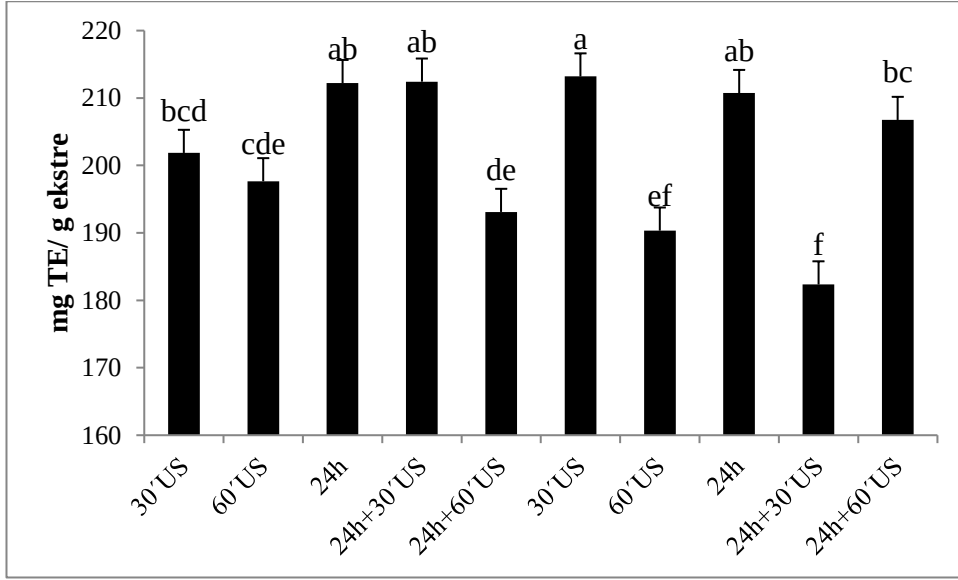
Tablo 14. Antioksidan aktivite (ABTS) bulguları ve IC<sub>50</sub> değerleri

|              | Ekstraktlar   | mg AAE/g Ekstre            | mg TE/g Ekstre             | IC <sub>50</sub> mg/ml  |
|--------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Kuru Yumurru | 30'US         | 143.90±3.87 <sup>bcd</sup> | 201.86±2.03 <sup>bcd</sup> | 0.020±0.00 <sup>f</sup> |
|              | 60'US         | 140.91±0.82 <sup>cde</sup> | 197.66±1.15 <sup>cde</sup> | 0.020±0.00 <sup>f</sup> |
|              | 24h           | 151.29±0.10 <sup>ab</sup>  | 212.22±0.15 <sup>ab</sup>  | 0.017±0.01 <sup>g</sup> |
|              | 24h+30'US     | 151.44±0.25 <sup>ab</sup>  | 212.43±0.35 <sup>ab</sup>  | 0.03±0.00 <sup>d</sup>  |
|              | 24h+60'US     | 137.66±0.86 <sup>de</sup>  | 193.11±1.21 <sup>de</sup>  | 0.03±0.00 <sup>d</sup>  |
| Yaş Yumurru  | 30'US         | 151.98±0.63 <sup>a</sup>   | 213.20±0.89 <sup>a</sup>   | 0.024±0.00 <sup>c</sup> |
|              | 60'US         | 135.53±9.91 <sup>ef</sup>  | 190.34±4.57 <sup>ef</sup>  | 0.027±0.01 <sup>d</sup> |
|              | 24h           | 150.23±1.07 <sup>ab</sup>  | 210.74±1.50 <sup>ab</sup>  | 0.022±0.00 <sup>c</sup> |
|              | 24h+30'US     | 130.08±1.85 <sup>f</sup>   | 182.36±2.61 <sup>f</sup>   | 0.030±0.02 <sup>m</sup> |
|              | 24h+60'US     | 147.38±0.46 <sup>bc</sup>  | 206.75±0.65 <sup>bc</sup>  | 0.03±0.00 <sup>l</sup>  |
|              | Askorbik asit | -                          | -                          | 0.01±0.00 <sup>a</sup>  |
|              | Trolox        | -                          | -                          | 0.01±0.00 <sup>b</sup>  |



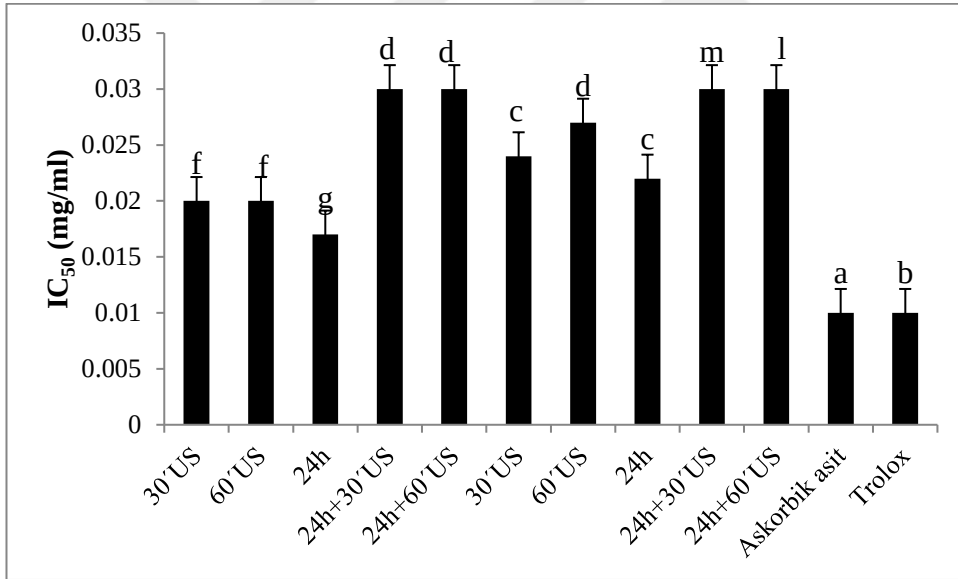
a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 18. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrlerinin askorbik asite eşdeğer ABTS bulguları



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 19. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin troloksa eşdeğer ABTS bulguları



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

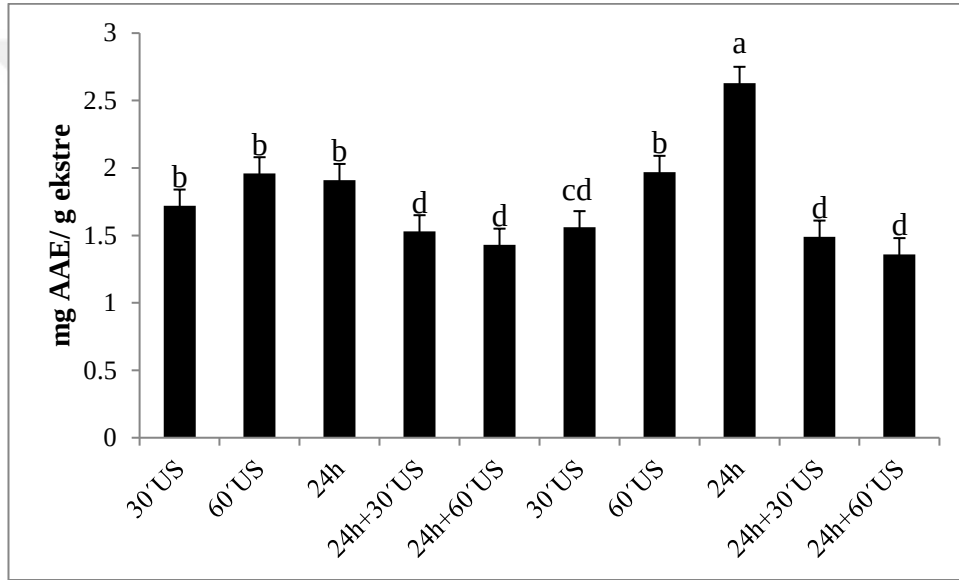
Şekil 20. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin ve standartların ABTS aktivitesine ilişkin IC<sub>50</sub> değerleri

### 3.5.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini Sonuçları

DPPH süpürücü etkileri, Şekil 35 ve 36'daki standart grafikleri göz önünde bulundurularak troloks ve askorbik asit eşdeğeri olarak hesaplandı (Tablo 15). Aynı zamanda ekstrelerin DPPH aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri (mg/ml) olarak ortaya konuldu.

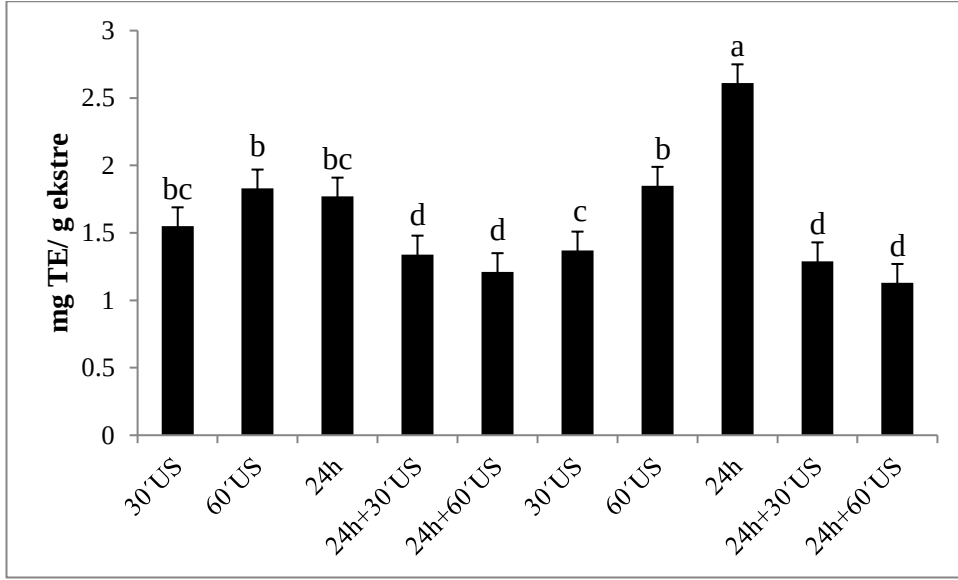
Tablo 15. Antioksidan aktivite (DPPH) bulguları ve IC<sub>50</sub> değerleri

|            | Ekstreler ve standartlar | mg AAE/g Ekstre         | mg TE/g Ekstre          | IC <sub>50</sub> mg/ml  |
|------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Kuru Yumur | 30'US                    | 1.72±0.26 <sup>b</sup>  | 1.55±0.31 <sup>bc</sup> | 2.89±0.61 <sup>bc</sup> |
|            | 60'US                    | 1.96±0.05 <sup>b</sup>  | 1.83±0.06 <sup>b</sup>  | 2.72±0.05 <sup>c</sup>  |
|            | 24h                      | 1.91±0.29 <sup>b</sup>  | 1.77±0.33 <sup>bc</sup> | 2.29±0.46 <sup>c</sup>  |
|            | 24h+30'US                | 1.53±0.19 <sup>d</sup>  | 1.34±0.21 <sup>d</sup>  | 2.55±0.29 <sup>c</sup>  |
|            | 24h+60'US                | 1.43±0.06 <sup>d</sup>  | 1.21±0.08 <sup>d</sup>  | 3.40±0.48 <sup>b</sup>  |
| Yaş Yumur  | 30'US                    | 1.56±0.38 <sup>cd</sup> | 1.37±0.45 <sup>c</sup>  | 2.36±0.22 <sup>c</sup>  |
|            | 60'US                    | 1.97±0.06 <sup>b</sup>  | 1.85±0.07 <sup>b</sup>  | 2.36±0.05 <sup>c</sup>  |
|            | 24h                      | 2.63±0.14 <sup>a</sup>  | 2.61±0.16 <sup>a</sup>  | 1.68±0.08 <sup>d</sup>  |
|            | 24h+30'US                | 1.49±0.17 <sup>d</sup>  | 1.29±0.20 <sup>d</sup>  | 2.48±0.29 <sup>c</sup>  |
|            | 24h+60'US                | 1.36±0.03 <sup>d</sup>  | 1.13±0.04 <sup>d</sup>  | 2.83±0.12 <sup>bc</sup> |
|            | Askorbik asit            | -                       | -                       | 0.05±0.08 <sup>a</sup>  |
|            | Trolox                   | -                       | -                       | 0.06±0.40 <sup>a</sup>  |



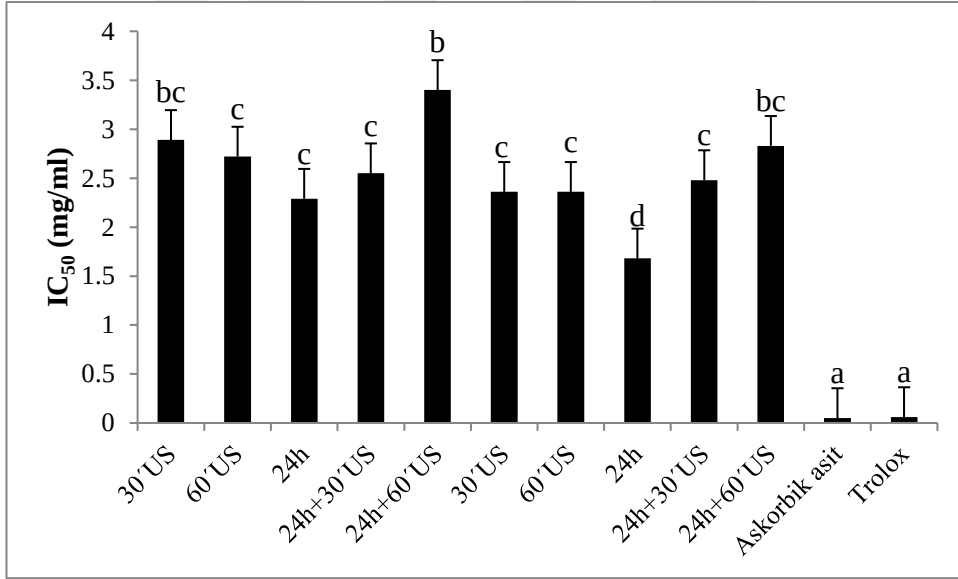
a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir (p<0.05). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak ± standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 21. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin askorbik asite eşdeğer DPPH bulguları



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 22. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin troloksa eşdeğer DPPH bulguları



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

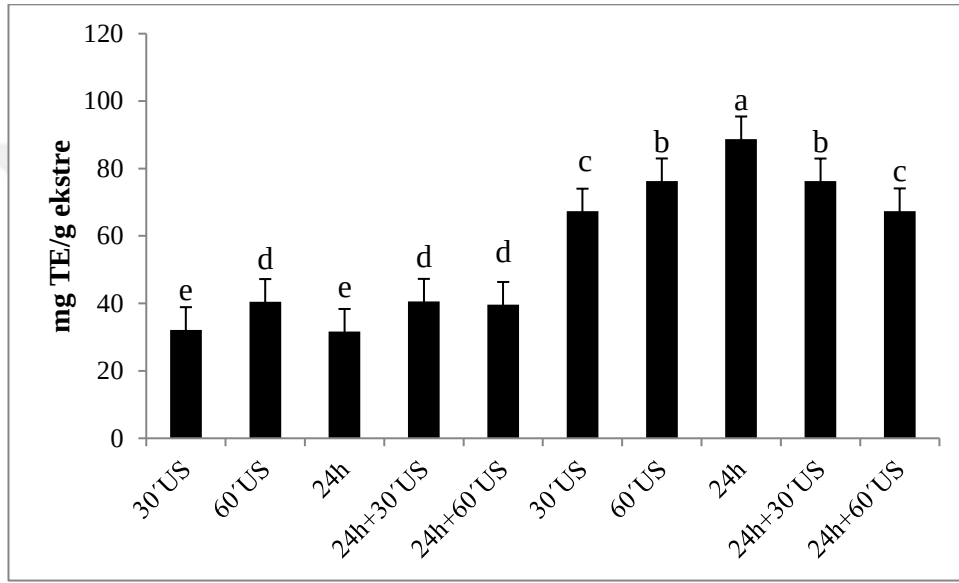
Şekil 23. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin ve standartların DPPH aktivitesine ilişkin IC<sub>50</sub> bulguları

### 3.6. FRAP (Demir(III) İndirgeyici) Tayini

Yumru ekstraktlarının demir indirgeme gücü aktivitesi Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yöntemle belirlendi. Sonuçlar Tablo 16'da gösterildi.

Tablo 16. Antioksidan aktivite (FRAP) bulguları

|              | Ekstraklar | mg TE/g Ekstre           |
|--------------|------------|--------------------------|
| Kuru Yumurru | 30'US      | 32.17±1.25 <sup>e</sup>  |
|              | 60'US      | 40.50±0.25 <sup>d</sup>  |
|              | 24h        | 31.63±1.45 <sup>e</sup>  |
|              | 24h+30'US  | 40.56±1.44 <sup>d</sup>  |
|              | 24h+60'US  | 39.64±2.18 <sup>d</sup>  |
| Yaş Yumurru  | 30'US      | 67.31±0.06 <sup>c</sup>  |
|              | 60'US      | 76.27±1.06 <sup>b</sup>  |
|              | 24h        | 88.72±11.56 <sup>a</sup> |
|              | 24h+30'US  | 76.25±1.92 <sup>b</sup>  |
|              | 24h+60'US  | 67.39±0.44 <sup>c</sup>  |



a, b, c, d ifadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 24. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstraktlarının troloksa eşdeğer FRAP bulguları

### 3.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları

#### 3.7.1. Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

Yumurru ekstraktlarının MİK değerleri mikrodilüsyon metodu ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar mg/ml olarak Tablo 17'de gösterildi.

Tablo 17. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (MİK) bulguları

| Ekstraktlar                | Kuru Yumru |       |       |           |           | Yaş Yumru |       |       |           |           |
|----------------------------|------------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|-----------|-----------|
|                            | 30'US      | 60'US | 24h   | 24h+30'US | 24h+60'US | 30'US     | 60'US | 24h   | 24h+30'US | 24h+60'US |
| <b>Mikroorganizmalar</b>   |            |       |       |           |           |           |       |       |           |           |
| <i>S. thyphi</i>           | 4.096      | 4.096 | 4.096 | 4.096     | 4.096     | 2.048     | 2.048 | 4.096 | 4.096     | 4.096     |
| <i>E. coli</i>             | 1.024      | 2.048 | 2.048 | 0.512     | 0.512     | 0.512     | 0.512 | 2.048 | 0.512     | 0.512     |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 4.096      | 4.096 | 4.096 | 4.096     | 4.096     | 4.096     | 4.096 | 4.096 | 4.096     | 4.096     |
| <i>L. monocytogenes</i>    | 0.256      | 0.256 | 0.256 | 0.256     | 0.256     | 2.048     | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     |
| <i>B. cereus</i>           | 0.256      | 0.256 | 0.256 | 0.256     | 0.256     | 2.048     | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     |
| <i>K.pneumoniae</i>        | 0.256      | 0.256 | 0.256 | 0.064     | 0.064     | 4.096     | 2.048 | 4.096 | 4.096     | 4.096     |
| <i>P.aeruginosa</i>        | 1.024      | 1.024 | 1.024 | 4.096     | 4.096     | 4.096     | 4.096 | 4.096 | 4.096     | 4.096     |
| <i>S. aureus</i>           | 0.256      | 0.256 | 0.256 | 0.256     | 0.256     | 4.096     | 4.096 | 4.096 | 4.096     | 4.096     |
| <i>P. vulgaris</i>         | 0.256      | 0.256 | 0.256 | 0.128     | 0.128     | 2.048     | 2.048 | 2.048 | 4.096     | 4.096     |
| <i>C. albicans</i>         | 2.048      | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     | 2.048     | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     |
| <i>C. tropicalis</i>       | 2.048      | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     | 2.048     | 2.048 | 2.048 | 2.048     | 2.048     |

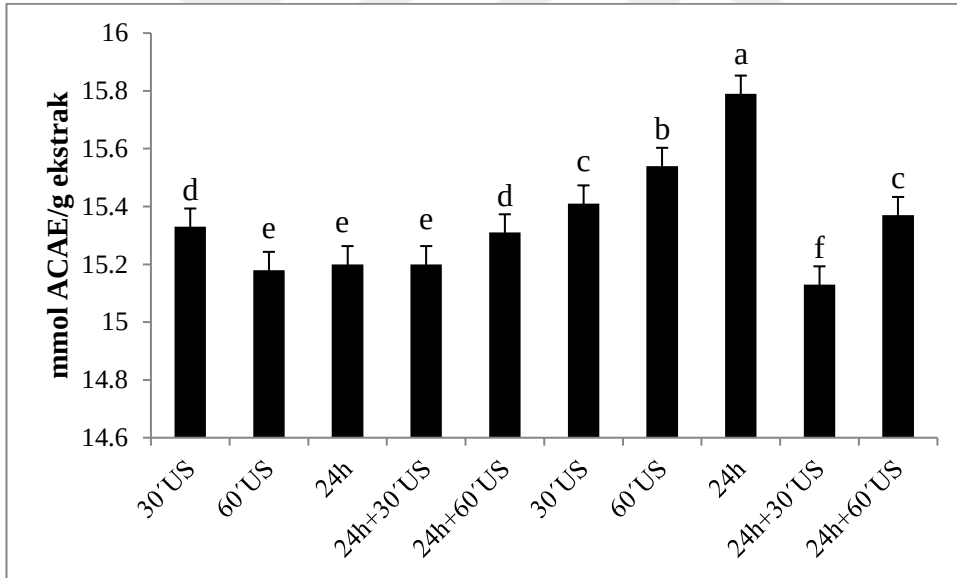
### 3.8. Enzim İnhibisyon Tayini Sonuçları

#### 3.8.1. Alfa Glukozidaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları

Yumru ekstraktlarının  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibitör aktivitesinin sonuçları Tablo 18’de gösterildi.

Tablo 18. Ekstrelerin enzim inhibitör ( $\alpha$ -glukozidaz) aktiviteleri

| Ekstraktlar |           | $\alpha$ -glukozidaz<br>mmol ACAE/g Ekstre |
|-------------|-----------|--------------------------------------------|
| Kuru Yumru  | 30’US     | 15.33±0.02 <sup>d</sup>                    |
|             | 60’US     | 15.18±0.02 <sup>e</sup>                    |
|             | 24h       | 15.20±0.02 <sup>e</sup>                    |
|             | 24h+30’US | 15.20±0.04 <sup>e</sup>                    |
|             | 24h+60’US | 15.31±0.05 <sup>d</sup>                    |
| Yaş Yumru   | 30’US     | 15.41±0.01 <sup>c</sup>                    |
|             | 60’US     | 15.54±0.01 <sup>b</sup>                    |
|             | 24h       | 15.79±0.01 <sup>a</sup>                    |
|             | 24h+30’US | 15.13±0.02 <sup>f</sup>                    |
|             | 24h+60’US | 15.37±0.01 <sup>c</sup>                    |



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

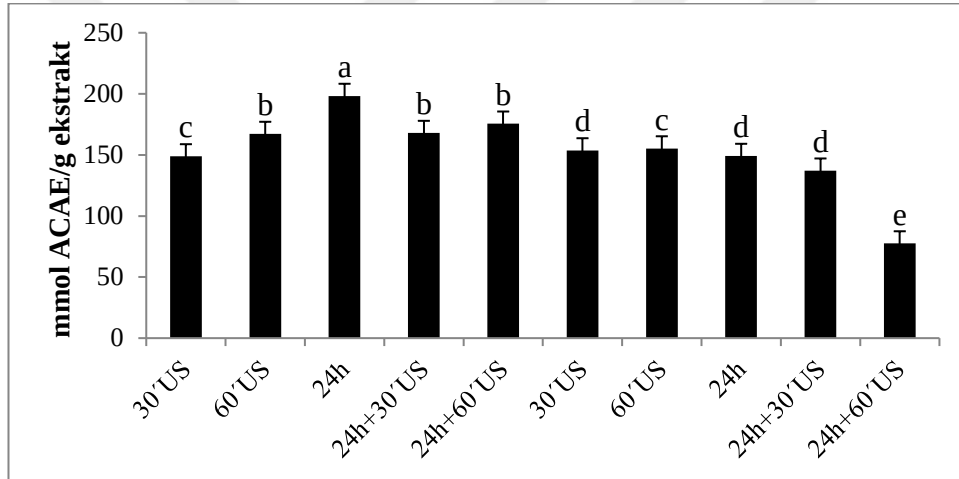
Şekil 25. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstraktlarının enzim inhibitör ( $\alpha$ -glukozidaz) aktiviteleri

### 3.8.2. Alfa Amilaz Enzim İnhibisyonu Sonuçları

Yumru ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivitesinin saptanması için iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemi tercih edildi. Sonuçlar Tablo 19’da gösterildi.

Tablo 19. Ekstrelerin enzim inhibitör ( $\alpha$ -amilaz) aktiviteleri

| Ekstraktlar |           | $\alpha$ -amilaz mmol ACAE/g Ekstre |
|-------------|-----------|-------------------------------------|
| Kuru Yumru  | 30’US     | 148.79 $\pm$ 1.10 <sup>c</sup>      |
|             | 60’US     | 167.13 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>      |
|             | 24h       | 198.26 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>      |
|             | 24h+30’US | 167.92 $\pm$ 2.84 <sup>b</sup>      |
|             | 24h+60’US | 175.55 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>      |
| Yaş Yumru   | 30’US     | 153.69 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>     |
|             | 60’US     | 155.27 $\pm$ 1.26 <sup>c</sup>      |
|             | 24h       | 149.11 $\pm$ 1.10 <sup>d</sup>      |
|             | 24h+30’US | 137.10 $\pm$ 1.10 <sup>d</sup>      |
|             | 24h+60’US | 77.51 $\pm$ 2.84 <sup>e</sup>       |



a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

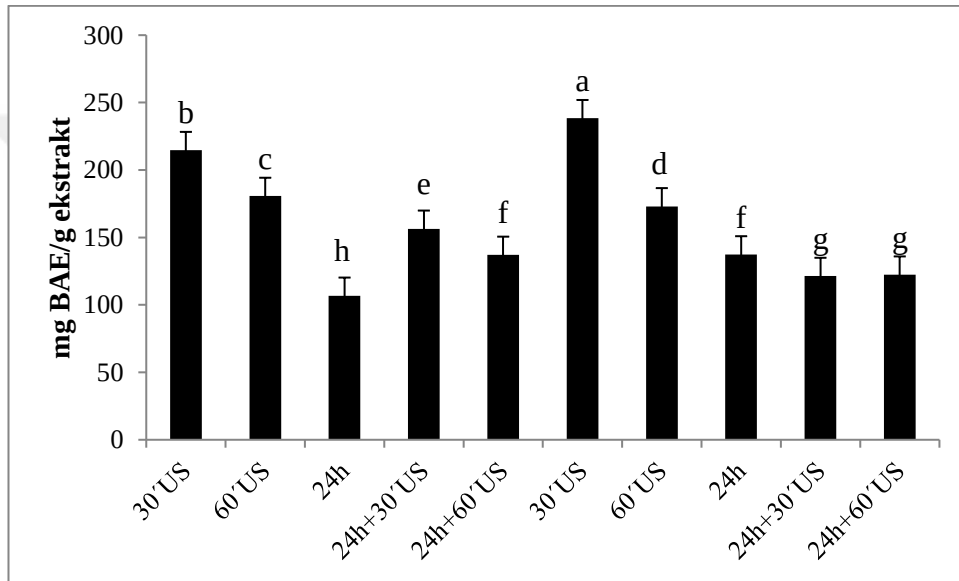
Şekil 26. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin enzim inhibitör ( $\alpha$ -amilaz) aktiviteleri

### 3.8.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyon Sonuçları

Yumru ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivitesinin saptanması için Sarıkürkçü ve Zengin (2020)’nin metodu tercih edildi. Sonuçlar Tablo 20’de gösterildi.

Tablo 20. Ekstrelerin enzim inhibitör (Tirozinaz) aktiviteleri

| Ekstraktlar  |           | Tirozinaz<br>mg BAE/g Ekstre |
|--------------|-----------|------------------------------|
| Kuru Yumurru | 30'US     | 214.73±0.6 <sup>b</sup>      |
|              | 60'US     | 180.73±0.5 <sup>c</sup>      |
|              | 24h       | 106.73±0.07 <sup>h</sup>     |
|              | 24h+30'US | 156.40±0.55 <sup>e</sup>     |
|              | 24h+60'US | 137.07±0.3 <sup>f</sup>      |
| Yaş Yumurru  | 30'US     | 238.40±0.7 <sup>a</sup>      |
|              | 60'US     | 173.06±0.45 <sup>d</sup>     |
|              | 24h       | 137.40±0.5 <sup>f</sup>      |
|              | 24h+30'US | 121.40±0.5 <sup>g</sup>      |
|              | 24h+60'US | 122.40±0.25 <sup>g</sup>     |



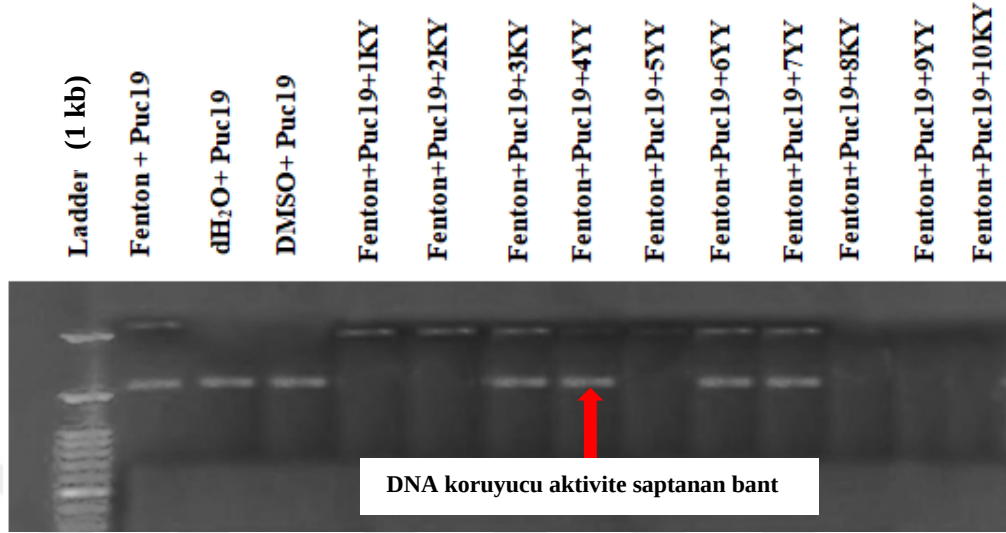
a, b, c, d İfadeleri Duncan analizine göre istatistiksel olarak, sonuçların birbirinden farklı olduğunu belirtmektedir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar 3 paralel değerlerin ortalaması alınarak  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterildi.

Şekil 27. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica* ekstrelerinin enzim inhibitör (tirozinaz) aktiviteleri

### 3.9. DNA Koruyucu Aktivite Sonuçları

*D. romana* subsp. *georgica* yumru ekstraktlarının pUC19 plazmiti üzerine koruyucu aktivitesinin varlığı fenton reaktifi ile %1'lik agaroz jel elektroforezin de belirlenmiştir. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanmış *D. romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin 5, 10, 20 ve 40 mg/ml konsantrasyonları ile DNA koruyucu aktiviteleri araştırıldı. 20 mg/ml konsantrasyonda ki taze yumruların 24 saat 37 °C sıcaklıkta, 125 rpm'de hazırlanan ekstraktının en etkili DNA koruyucu aktiviteye sahip olduğu görüldü. Diğer taraftan, kuru yumrulara ait 24 saat 37 °C 125 rpm'de hazırlanan ekstrenin, yaş yumrulara ait 60 dakika ultrasonik banyoda hazırlanan ekstrenin ve yaş yumrulara ait 24 saat çalkalayıcı ardından 60 dakika ultrasonik banyoda hazırlanan

ekstenin de kısmen koruyucu aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Elde edilen sonuçlar Şekil 28’de gösterildi.



1: 30 dk ultrasonik su banyosu kuru yumru, 2: 60 dk ultrasonik su banyosu kuru yumru; 3: 24 h çalkalayıcı kuru yumru, 4: 24 h çalkalayıcı yaş yumru; 5: 30 dk ultrasonik su banyosu yaş yumru, 6: 60 dk ultrasonik su banyosu yaş yumru, 7: 24h çalkalayıcı+60 dk ultrasonik su banyosu yaş yumru, 8: 24h çalkalayıcı+60 dk ultrasonik su banyosu kuru yumru, 9: 24h çalkalayıcı+30 dk ultrasonik su banyosu yaş yumru, 10: 24h çalkalayıcı+30 dk ultrasonik su banyosu kuru yumru, (KY: Kuru yumru, YY: Yaş yumru)

Şekil 28. Farklı ekstraksiyon metodlarıyla hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*’ya ait ekstrelerin (20 mg/ml) DNA koruyucu aktiviteleri

### 3.10. HPLC Analizi ile Fenolik Madde İçeriği Sonuçları

Ekstrelerin fenolik içeriği, yaş ve kuru yumrulara ait 60 dakika ultrasonik banyo, 24 saat çalkalayıcı ve 24 saat çalkalayıcı ardından 60 dakika ultrasonik banyoda hazırlanan ekstreler kullanılarak HPLC ile analiz edildi. Şekil 13’deki standart kromotogramına göre okumalar yapıldı. Sonuçlar Tablo 21’de gösterildi.

Tablo 21. Ekstrelerin fenolik bileşen içeriği

| No | Fenolik Bileşenler      | Miktar (mg/g ekstrakt) |      |              |           |      |              |
|----|-------------------------|------------------------|------|--------------|-----------|------|--------------|
|    |                         | Kuru Yumru             |      |              | Yaş Yumru |      |              |
|    |                         | 60' USB                | 24 h | 24 h+60' USB | 60' USB   | 24 h | 24 h+60' USB |
| 1  | Gallik aist             | *                      | *    | *            | *         | *    | *            |
| 2  | Protokateşik asit       | 0.9                    | 1.1  | 0.9          | 1.9       | 2.0  | 1.4          |
| 3  | Kateşin                 | *                      | *    | *            | 0.1       | *    | *            |
| 4  | p-hidroksi benzoik asit | 0.6                    | 0.6  | 0.7          | 2.0       | 3.3  | 4.3          |
| 5  | Klorojenik asit         | 0.2                    | 0.2  | 0.1          | 0.4       | 0.3  | 0.7          |
| 6  | Kafeik asit             | 0.6                    | 0.7  | 0.5          | 0.5       | 0.3  | 0.4          |
| 7  | Epikateşin              | 0.2                    | 0.3  | 0.2          | *         | *    | 0.1          |
| 8  | Sirinjik asit           | *                      | *    | *            | 0.02      | 0.04 | *            |
| 9  | Vanillin                | 0.04                   | 0.06 | 0.04         | *         | *    | 0.02         |
| 10 | p-kumarik asit          | 0.1                    | 0.2  | 0.1          | 0.1       | 0.1  | 0.1          |
| 11 | Ferulik asit            | 0.2                    | 0.2  | 0.2          | 0.1       | 0.1  | 0.1          |
| 12 | Sinapinik asit          | *                      | *    | *            | *         | *    | *            |
| 13 | Benzoik asit            | *                      | *    | 0.5          | *         | *    | *            |
| 14 | o-kumarik asit          | 0.2                    | 0.2  | 0.1          | 0.1       | 0.1  | 0.2          |
| 15 | Rutin                   | *                      | *    | *            | *         | *    | *            |
| 16 | Rosmarinik asit         | 1.2                    | 1.2  | 1.1          | *         | *    | 0.1          |
| 17 | Sinnamik asit           | 0.09                   | 0.12 | 0.12         | 0.02      | 0.05 | 0.04         |
| 18 | Kuarsetin               | 0.3                    | 0.3  | 0.3          | 0.3       | 0.2  | 0.3          |
| 19 | Luteolin                | 0.2                    | 0.3  | *            | *         | 0.1  | *            |
| 20 | Kaempferol              | 2.9                    | 3.0  | 2.6          | 0.3       | 0.4  | 0.6          |

\*Tespit edilemedi.

#### 4. TARTIŞMA

Orkide (*D. romana* subsp. *georgica*), Karadeniz bölgesinde, özellikle Zigana Dağı, Gümüşhane'ye yakın bölgelerde yaygın olarak yayılış göstermektedir. Bu bitki, dondurma, sıcak içecek (salep), kıvam arttırıcı gibi özelliklerinin yanı sıra bazı hastalıkları (yara ve çıban tedavisinde, ishal önleyici olarak ve balgam söktürücü/göğüs yumuşatıcı) ortadan kaldırması nedeniyle yöre halkı tarafından geleneksel olarak kullanılmaktadır (Kreutz, 2009). Bu bitkinin yumrularının çeşitli biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstraksiyon işleminden önce sütte yüksek sıcaklıkta kaynatma, gibi yerel kullanıma (geleneksel yol) uygun işlemler uygulanmıştır (Kotiloğlu vd., 2020). Ancak bu süreçlerin bitkilerdeki birçok biyolojik aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen fenolik bileşikler olumsuz etkilemesi olasıdır. Bu nedenle bu çalışmada, bitkinin biyoaktif bileşenlerinin korunarak bilimsel veriler ışığında etkili ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi ve çeşitli biyolojik aktivitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda bitkinin taze ve kuru yumruları yüksek polariteli (0.95) etanol ile ultrasonik banyo ve çalkalayıcı yardımıyla farklı sürelerde, birbirleriyle kombinasyon halinde ekstrakte edilmiştir. Analizde farklı yöntemlerle hazırlanmış 10 ekstrakt kullanılmıştır. Elde edilen ekstrelerin toplam fenolik/flavonoid içeriğine ek olarak, antimikrobiyal etkileri, total antioksidan kapasitesi, enzim inhibisyon özellikleri (alfa amilaz, alfa glukozidaz ve tirozinaz), antioksidan aktivitesi, HPLC ile fenolik madde içeriği, ve ayrıca bitkinin kuru ve taze yumru ekstrelerinin DNA koruyucu potansiyeli belirlendi. Çalışmada tartışılan orkide türünün DNA koruyucu aktivitesi ve tirozinaz enzim inhibisyon yeteneği ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu araştırma, *D. romana* subsp. *georgica*, DNA koruyucu özellikleri ve sergilediği diğer biyolojik aktiviteler araştırılmıştır.

##### 4.1. Toplam Fenolik İçerik (TPC)

Ekstrelerin toplam fenolik içeriği, Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Buna göre in vitro koşullarda inkübasyon sonrası reaksiyon sonucu oluşan mavi-yeşil rengin absorbansı ölçülerek hesaplama yapılır. Oluşan kompleksin renk yoğunluğu, ekstredeki fenolik bileşen yoğunluğu ile doğru orantıya sahiptir (Slinkard ve Singleton, 1977). Toplam fenolik içerik analizi sonuçları değerlendirildiğinde, en yüksek fenolik içeriğin 24 saatlik kuru yumru ekstresinde ( $31.07 \pm 0.70$  mg GAE/g ekstre), en düşük fenolik madde içeriğinin ise 60' US taze

yumru ekstresinde ( $14.06 \pm 0.34$  mg GAE/g esktre) (Tablo 11) olduğu belirlendi. Daha önce Kotiloğlu vd. (2020)'nin *D. romana* subsp. *georgica* yumruları ile yaptıkları bir çalışmada, en yüksek fenolik içeriğin etanol ekstresinde ( $24.15 \pm 0.24$  mg GAE/g esktre) ve en düşük içeriğin ise heksan ekstresinde ( $14.56 \pm 0.63$  mg GAE/g esktre) olduğu belirlenmiştir. Orchidaceae ailesine ait bitkiler üzerinde yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde; Rykaczewski vd. (2019)'nin çalışmasında, *Braselia Cattleya*, *Elleanthus oliganthus* ve *Sobralia powellii* orkidelerinin taze yapraklarına ait metanol ekstralarının toplam fenolik içerikleri incelenmiş ve en yüksek değer *S. powellii* ( $10.2$  mg GAE /ml), en düşük ise *B. Cattleya* ( $5.39$  mg GAE /ml) ve *E. oliganthus* ( $6.56$  mg GAE /ml) ekstralarında olduğu belirlendi. Athipornchai ve Jullapo (2018)'deki çalışmalarında *Dendrobium spp.*'nin Sonia, Sonia Pink, Snow Rabbit ve Shavin White isimli orkide çiçeklerinin etanol ekstralarını incelenmiş ve en yüksek fenolik içerik Shavin White'da ( $5.34 \pm 0.30$  mg GAE /ml) gözlemlenirken, en düşük fenolik içerik Snow Rabbit ekstresinde ( $1.15 \pm 0.34$  mg GAE /ml) kaydedilmiştir. Öte yandan, Singh vd. (2022), en yüksek fenolik içeriğin *Dactylorhiza hatagireia* yumru etanol ekstesinde ( $11.42 \pm 0.48$  mg GAE/g DW) olduğu tespit edilmiştir. Bose vd. (2017), *Malaxis acuminata* orkidesinin yabani tip ve in vitro ortamda yetiştirilen bitki ekstraları değerlendirildiğinde, in vitro türevli bitkilerin ekstraktlarında ( $44.34 \pm 0.7$  mg GAE/g DW) en yüksek toplam fenolik içeriğin sahip olduğu belirlenmiştir. Yabani bitkilerin gövde ekstraları en düşük fenolik içeriğe ( $7.82 \pm 0.2$  mg GAE/g DW) sahipti. Aynı çalışmada, bazı kimyasal maddeler ile muamele edilmiş tohumlardan yetiştirilen in vitro bitkilerin toplam fenolik içeriği, bitkinin doğadan toplanan yabani formları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen bulgulara göre, metatopolin uygulanarak yetiştirilen in vitro bitkilerin fenolik madde miktarını ve çeşitli fitobileşen düzeylerini iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, mevcut çalışmada değerlendirilen orkide türlerinin fenolik madde içeriğinin bitki biyoteknolojisi uygulamaları ile kolaylıkla artırılacağı ve böylece doğal bitki kaynaklarının korunmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.2. Toplam Flavonoid İçerik (TFC)

*D. romana* subsp. *georgica* yumru ekstralarının toplam flavonoid madde miktarı, spektrofotometre yardımıyla alüminyum nitrat kolorimetrik yöntemle analiz edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek içeriğin 24h+60'US ekstresinde ( $9.19 \pm 0.31$ mg QE/g esktre) olduğu, en düşük içeriğin ise 30' US' da hazırlanan taze yumru ekstresinde olduğu görüldü ( $3.65 \pm 0.19$  mg/QE g esktre) (Tablo 12). Kotiloğlu vd. (2020)

çalışmasında, en yüksek flavonoid içeriğinin etil asetat (6.97±0.25 mg QE/g ekstre) ve en düşük içeriğin metanol ekstresinde (1.31±0.02 mg/QE g ekstre) olduğu bildirilmiştir. Sonuçlara göre, bu çalışmada gerçekleştirilen farklı ekstraksiyon yöntemlerinin toplam flavonoid madde miktarındaki artışı iyileştirdiği söylenebilir. Öte yandan, Păltinean vd. (2017), *Dactylorhiza maculata*'nın %70 etanol ile hazırlanan yumru ekstresinde en yüksek flavonoid içeriğine sahip olduğunu bulmuştur. Bu bağlamda *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait flavonoid madde miktarının daha fazla olduğu söylenebilir.

#### 4.3. Toplam Antioksidan Kapasitesi

Ekstrelerin toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibdat yöntemi ile belirlendi. Çalışmada en yüksek toplam antioksidan kapasitesi 24h+30'US kurutulmuş yumru ekstresinde bulunmuştur (537.679±5.89 mg AAE/g ekstre, 853.333±27.50 mg TE/g ekstre) (Tablo 13). Kotiloğlu vd. (2020), *D. romana* subsp. *georgica* yumruları ile toplam antioksidan kapasitenin etanol ekstresinde (472±3.78 mg AAE/g ekstre) olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon yönteminin toplam antioksidan kapasiteyi arttırdığı görülmektedir. Kumar vd. (2013)'ye göre, *Eulophia nuda* Lindl yumrularından farklı çözücüler ile hazırlanan ekstreler arasında metanol ekstresinin en yüksek antioksidan kapasiteyi gösterdiği bildirilmiştir. Farklı çözücülerin ve farklı orkide türlerinin toplam antioksidan kapasitesini etkilediği düşünülmektedir.

#### 4.4. Antioksidan aktivite

Yumru ekstrelerinin antioksidan aktivitesi, ABTS, DPPH ve FRAP tahlilleri ile analiz edildi. Bu çalışmada ABTS radikal süpürme aktivitesi en yüksek taze yumru 30'US ekstresinde, en düşük ise taze yumru 24h+60'US ekstresinde belirlendi (Tablo 14); en yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesi taze yumru 24h ekstresinde ve en düşük taze yumru 24h+60'US ekstresinde tespit edildi (Tablo 15). Ekstrelerin ABTS ve DPPH radikal süpürücü aktiviteleri de IC<sub>50</sub> değeri olarak verildi. Düşük bir IC<sub>50</sub> değeri, ekstrenin ABTS ve DPPH radikal süpürme aktivitelerinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bu çalışmada ABTS ve DPPH IC<sub>50</sub> değerleri en düşük ve dolayısıyla en yüksek verimliliğe sahip ekstreler sırasıyla kuru yumru 24h (0.017±0.01 mg/ml) ve taze yumru 24h (1.68±0.08 mg/ml) olmuştur. Bir önceki çalışmada, Kotiloğlu vd. (2020), yumru köklerin ABTS ve DPPH IC<sub>50</sub> değerlerini sırasıyla 0.64±0.05 mg/ml ve 1.53±0.004 mg/ml olarak bildirmiştir. ABTS sonuçları değerlendirildiğinde, mevcut çalışmada elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerin daha düşük olduğu ve bu nedenle kuru yumru 24

saat ekstresinin önceki çalışmaya göre daha etkili olduğu söylenebilir. Bu farklılığa, Kotiloğlu vd. (2020) bir önceki çalışmada geleneksel yöntemi tercih etmiş ve yumruları sütle yüksek sıcaklıkta kaynatmış olması neden olabilir.

Bitki özlerinin indirgeme gücü, antioksidan aktiviteleriyle yakından ilişkilidir (Blois, 1958). FRAP testinde elde edilen yüksek değer, bitki ekstraktının  $Fe^{+3}$  indirgeme kapasitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bu çalışmada *D. romana* subsp. *georgica* taze yumru 24 saat ekstresi diğer ekstrelerden daha yüksekti (Tablo 16). Dalar vd. (2015), *Dactylorhiza chuhensis*' in çeşitli kısımlarının (yumru, gövde, yaprak ve çiçek) etanol ekstrelerinin  $Fe^{+3}$  indirgeme kapasitesini araştırmış ve en yüksek FRAP değerini yaprak ekstresinde bulmuştur. Paul ve Kumaria (2020), in vitro olarak farklı dozlarda çeşitli elisitörlerin eklenmesiyle elde edilen *Dendrobium fimbriatum* bitki ekstrelerinin doza bağlı olarak artan  $Fe^{+3}$  indirgeme özellikleri gösterdiğini bildirmiştir. Bu artışın bitkilerin sekonder metabolitlerinin (fenolik içerik) pozitif uyarılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.5. Enzim İnhibisyon Aktivitesi

Diyabet çağımızın en yaygın hastalıklarından biridir. Bu bozukluğun tedavisinde şeker metabolizmasında anahtar rol oynayan alfa amilaz ve alfa glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu kan şekerini normalleştirmek için kullanılan uygulamalardan biridir (Acet, 2021; Jaradat vd., 2022). Bu amaçla kullanılan sentetik inhibitörlerin olası yan etkileri göz önüne alındığında, doğal inhibitör madde arayışları önem kazanmıştır. Bu açıdan bitkiler doğal ve alternatif enzim inhibitörleri kaynağı olarak öne çıkmaktadır (Özcan, 2021). Bu çalışmada, *D. romana* subsp. *georgica* yumru ekstrelerinin dikkat çekici bir diyabetik enzim inhibisyon aktivitesi sergilediği ortaya konmuştur (Tablo 18 ve 19). Kotiloğlu vd. (2020) aynı orkide türünün antidiyabetik aktivitesini farklı ekstraksiyon yöntemi ile araştırmış ve orkidenin etanol ekstrelerinde, alfa amilaz (76.5 mmol ACAE/g ekstre) ve alfa glukozidazın (4.368 mmol ACAE/g ekstre) enzim inhibisyon aktivitesini belirlemiştir. Mevcut çalışmada, amilaz inhibisyon aktivitesinin 77.51 ile 198.26 ACAE/g ekstre arasında olduğu bulunmuştur. En yüksek aktivite 24 saat kuru yumruda ve en düşük 24 saat + 60'US taze yumru ekstresinde bulundu. Alfa glukozidaz enzim inhibisyonu ise 15.79 ila 15.13 ACAE/g ekstre olarak belirlendi. En yüksek 24 saat taze yumru ekstresinde ve en düşük 24 saat + 30 US taze yumru ekstresinde gözlemlendi. Değerler dikkate alındığında bu çalışmada kullanılan örneklerin ve ekstraksiyon yönteminin antidiyabetik aktivite üzerine olumlu etkisinin olduğu söylenebilir. Buna ek olarak, amilaz inhibitörü için kuru yumrular ve glukozidaz inhibitörü için taze yumrular

çalışması ileri saflaştırma çalışmaları için düşünülebilir. Zaten farklı orkide türlerinin antidiyabetik etkileri olduğunu gösteren veriler mevcuttur. Dalar vd. (2015) *Dactylorhiza chuhensis* yapraklarının su ekstraktının amilaz ve glukozidaz üzerinde inhibitör etkisi olduğunu ancak yumru, gövde ve çiçeğin su ekstraktının böyle bir inhibitör etkisinin olmadığını bildirmiştir. Mahomoodally vd. (2020) *Anacamptis pyramidalis* orkidesinin kuru yumru metanol ve su ekstraktlarının amilaz ve glukozidaz inhibisyon özelliklerini araştırmış ve etkili bir inhibisyon sergilediğini belirlemişlerdir. Ayrıca orkide metanol ekstrelerinin sudan daha yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğunu bildirdirmişlerdir.

Öte yandan UV ışınları aşırı tirozinaz aktivitesine ve dolayısıyla cildin bazal tabakasındaki melanositlerin normalden daha fazla melanin sentezlemesine neden olur. Melanin, cilt hücrelerindeki DNA'yı UV'nin zararlı etkilerinden korur (Brenner ve Hearing, 2008). Ancak aşırı melanin sentezi ve birikimi (hiperpigmentasyon) tehlikeli cilt problemlerine neden olur. Bu nedenle melanin pigment artışı önlemek için yeni ve etkili tirozinaz inhibitörlerinin keşfedilmesine ihtiyaç vardır (Pillaiyar vd., 2017). Bu çalışmada, bu bitkinin tirozinaz aktivitesi ilk kez analiz edildi. Buna göre tirozinaz aktiviteleri 106.73 ile 238.40 mg BAE/g ekstre arasında kaydedildi. En yüksek aktivite 30'US taze yumruda ve en düşük 24 saatlik kuru yumruda gözlemlendi (Tablo 20). Bununla birlikte, Athipornchai ve Jullapo (2018), *Dendrobium* çiçeklerinin etanol ekstrelerinin konsantrasyona bağlı tirozinaz inhibe edici aktivite sergilediğini bildirilmiştir. Bose vd. (2017), *Malaxis acuminata* ekstrelerinin güçlü tirozinaz inhibisyonu sergilediğini bildirilmiştir. Ayrıca Kanlayavattanakul vd. (2018), *Dendrobium* etanol ekstrelerinin zayıf tirozinaz inhibisyonu sergilediğini ortaya koymuşlardır. Axiotis vd. (2014), *Cymbidium* ekstrelerinin doza bağlı tirozinaz inhibe edici aktiviteye sahip olduğunu bildirilmiştir. Öte yandan, Mahomoodally vd. (2020) *Anacamptis* orkidesinin kuru yumru, metanol ve su ekstraktlarının tirozinaz enzim inhibisyon aktivitelerini incelemiş ve metanolün sudan daha güçlü inhibisyon özelliklerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların literatürle uyumlu olduğu söylenebilir. Bu farklılıklar bitkinin farklı kısımların ekstraksiyonundan veya farklı ekstraksiyon koşullarından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca *D. romana* subsp. *georgica*'nın enzim inhibisyon aktivitesinin yüksek antioksidan kapasitesi ve içerdiği fitokimyasallar ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.6. Antimikrobiyal Etkinlik

Tüm ekstreler en az 1 mikroorganizmaya karşı aktivite sergilemiştir (Tablo 17). Ayrıca kuru yumruların aynı organizmalar (*P. vulgaris*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*) üzerinde taze yumrulara kıyasla daha yüksek aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite, 24h+30'US kuru yumru ekstresinde 0.064 mg/ml MİK değeri ile *K. pneumoniae* üzerinde gözlemlendi. *K. pneumoniae*, pnömoniye neden olan ve antibiyotiklere dirençli, gram negatif bir bakteridir. *D. romana* subsp. *georgica* yumruları, yöresel olarak balgam söktürücü ve göğüs yumuşatıcı özelliklerinden dolayı kullanıldığı bilinmektedir. Ekstrelerin bu organizma üzerindeki etkisi bu açıdan önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada kullanılan bitkinin, ağır akciğer enfeksiyonuna neden olan *K. pneumoniae*'ye karşı güçlü inhibisyon özellik göstermiş ve bitkinin halk arasındaki kullanımı bilimsel verilerle doğrulanarak ortaya konulmuştur. Özellikle bu çalışmada kullanılan ekstrelerin antimikrobiyal etkinliği, Kotiloğlu vd. (2020) geleneksel olarak kaynatma yöntemiyle hazırlanan yumru ekstrelerine göre (MİK değerleri 0.512-8.2 mg/ml) arttığı tespit edilmiştir. Bu farkın sütle kaynatma işleminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bilindiği gibi birçok antimikrobiyal madde yüksek sıcaklıklarda etkinliğini kaybederek bozulur. Orkidelerle yapılan çalışmalarda genellikle orta düzeyde antimikrobiyal aktivite sergiledikleri bildirilmiştir (Sandrasagaran vd., 2014; Wati vd., 2021). Bunlara ek olarak kurutulmuş orkide yumru ekstrelerinin etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiğine dair bilgiler de bulunmaktadır (Jiang vd., 2021). Paltinean vd. (2017) ise *D. Maculata*'nın kuru yumru ve toprak üstü kısımlarının etanol ekstrelerinin 5 organizmaya (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ve *E. coli*) karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmış ve yumruların test edilen tüm mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite (MİK değerleri 7.8-15 µg/ml) belirlemiştir.

#### 4.7. Fenolik Bileşen Analizi

Bu çalışmada, diğer ekstrelerden daha yüksek aktiviteye sahip olan 60' US, 24h, 24h+60' US kuru ve taze yumru etanol ekstreleri, orkidelerde sıklıkla bulunan 20 fenolik bileşiğin varlığı açısından HPLC ile analiz edilmiştir (Tablo 21). Buna göre gallik asit, sinapik asit ve rutin hiçbir ekstrede tespit edilememiştir. Kuru yumru ekstrelerinde kateşin ve siringik asit bulunmazken, taze yumru ekstrelerinde benzoik asit tespit edilmemiştir. Bunların dışında fenolik bileşenlerin miktarı değişmekle birlikte taze ve kuru yumru ekstrelerinde bulunmuştur. Ayrıca en yüksek fenolik bileşen miktarı 24 saatlik ekstrede bulunmuştur. Ek olarak, kuru yumru 24 saat ekstresinin ana bileşeni

*kaempferol*, *rosmarinik asit* ve *protokateşik asit*'tir. Taze yumru 24 saat ekstresinin ana bileşenleri *p-hidroksi benzoik asit* ve *protokateşik asit*'tir. Kotiloğlu vd. (2020), aynı bitki yumrularının sütte kaynatılıp kurutulan etil asetat ekstresini bu çalışmada taranan 20 fenolik bileşen açısından analiz etmiş ve sadece 9'unun bulunduğunu ve ana bileşenlerin protokateşik asit ve benzoik asit olduğunu bildirmiştir. Farklılıkların ön işleme aşaması ve ekstraksiyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü bu çalışmada ekstraksiyon yöntemi ile belirlenen fenolik bileşen miktarının değiştiği gözlemlenmiştir. Sukhikh vd. (2021), farklı bölgelerde yetişen *D. maculata* toprak üstü kısımlarının fitokimyasal özelliklerini araştırmış ve ana bileşeninin gallik asit olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada, farklı bölgelerde yetişen bitkilerin benzer fenolikleri farklı miktarlarda içerdiği tespit edilmiştir. Păltinean vd. (2017), *D. Maculata*'nın kurutulmuş yumru ve toprak üstü kısımlarının etanol ekstraktlarında kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, izokersitrin, kuersitrin ve kaempferol'ün varlığını araştırmış ve yumru köklerin bu fenolikleri içermediğini, ancak toprak üstü kısımlarda bulunduğunu belirlemiştir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşenlerin aktiviteleri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Aktivitelerden majör bileşenlerin sorumlu olduğu düşünülse de, minör bileşiklerin kendi aralarında ve majör bileşenlerle etkileşimi de aktivite ile ilgilidir. Aslında ana bileşenlerden biri olan *kaempferol*, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal ve antikanserojenik aktivitelere sahip bir fenolik bileşendir (Wang vd., 2018). *Rosmarinik asit* ise UV koruyucu, antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antianjiyogenik ve antifibrotik gibi aktivitelere sahip fenolik bir bileşendir (Bulgakov vd., 2012; Petersen, 2013).

#### 4.8. DNA Koruyucu Aktivite

Ekstrelerin DNA koruyucu aktivitesi, fenton solüsyonu ile pUC19 plazmitinde hasar indüklenerek belirlendi. Bu çalışmada 5, 10, 20 ve 40 mg/ml gibi farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerin DNA koruyucu aktiviteleri araştırıldı ve en etkili DNA koruyucu aktivite, 20 mg/ml konsantrasyonda 24 saatlik taze yumru ekstresinde bulundu. Ayrıca aynı konsantrasyon da 24 saatlik kuru yumru, 60'US taze yumru ve 24h+60'US taze yumru ekstrelerinin kısmi DNA koruyucu aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Bu bağlamda, Singh vd. (2022), *Dactylorhiza hatagirea* kuru yumru ekstrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile pBR322 plazmit DNA'sına zarar vererek antimitojenik aktivitesini belirledi. Çalışmada 20-40-80-160 µg/ml ekstre kullanılmış ve tüm konsantrasyonlarda DNA koruyucu aktivite saptanmasına rağmen en etkili koruma 160 µg/mL ile sağlanmıştır. Öte yandan Giri vd. (2012) 8 Ashtvarga türünün metanol

ekstrelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılarak hasar gören pBR322 plazmit DNA üzerinde koruyucu aktivite sergilediğini bildirmiştir. DNA koruyucu aktivitesinin rosmarinik asit ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Petersen, 2013). Bu nedenle kuru yumrulara tespit edilen koruyucu aktivitenin kaynağının rosmarinik asit olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak bitkinin güçlü bir DNA koruyucu aktiviteye sahip olmadığı söylenebilir.



## 5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Sonuç olarak, Türkiye’de yetişen ve hem yöre halkı tarafından gıda olarak tüketilen hem de birçok rahatsızlığın giderilmesinde kullanılan ve ticari öneme sahip olan *D. romana* subsp. *georgica* ‘nın yumrularının ekstraksiyonu farklı yöntemlerle yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre bu ekstraktların biyolojik aktivitelerinin geleneksel yöntemle (sütte kaynatma) elde edilen ekstraktlara göre önemli ölçüde arttığı belirlendi. Bu durum bitkinin en etkin kullanımını ortaya koyması açısından oldukça değerlidir. Kurutulmuş yumru 24h+30’ US hazırlanan ekstrenin yüksek antibiyotik direncine sahip ve ciddi akciğer enfeksiyonuna neden olan *K. pneumoniae*’ya karşı 0.064 mg/ml MİK değeri ile yüksek antimikrobiyal aktivite sergilemesi dikkat çekicidir. Öte yandan söz konusu orkide türlerinin taze ve kuru yumrularından farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilen ekstraktların biyolojik aktivitelerinin içerdikleri majör ve minör fenolik bileşenlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, bu orkide türünün tirozinaz ve DNA koruyucu aktiviteleri de ilk kez ortaya konulmuş olup, bu çalışmanın literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, söz konusu bitkinin gıda ve sağlık alanında kullanım için güçlü bir potansiyele sahip olduğu söylenebilir. Ancak mevcut biyolojik aktivitelerin daha iyi anlaşılabilmesi için ekstraktların etken maddelerinin daha ileri tekniklerle saflaştırılması ve in vivo çalışmalarla test edilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Acet, T. (2020). Determining the phenolic components by using HPLC and biological activity of *Centaurea triumfetti*. *Plant Biosystems*, 155(1), 159-164.
- Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S.A. ve Tareen, R. B. (2009). Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in Quetta. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2129–2135.
- Ahmed, A. M. A., Rahman, M. A., Hossen, M. A., Reza, A., Islam, M. S., Rashid, M. M., ...Uddin, M. N. (2021). Epiphytic *Acampe ochracea* orchid relieves paracetamol-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and upregulating antioxidant genes in in vivo and virtual screening. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 143, 112215.
- Akhgari, A., Oksman Caldentey, K. M. ve Rischer, H. (2017). Biotechnology of the medicinal plant *Rhazya stricta*: A little investigated member of the Apocynaceae family. *Biotechnology Letters*, 6(39), 829-840.
- Akhigbe, R. ve Ajayi, A. (2021). The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: A review. *Lipids in Health and Disease*, 20(1), 1-18.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M. ve Arif, M. S. (2018). *Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview*. United Kingdom: Elsevier.
- Athipornchai, N. J. (2018). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of Orchid (*Dendrobium*). *South African Journal of Botany*, 119, 188-192.
- Atmaca, M. ve Ecemiş G. (2012). Oral antidiyabetik ajanlar. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(1), 23-29.
- Axiotis, E. A., Angelis, L., Antoniadis, E. A. ve Petrakis, L. A. S. (2014). Phytochemical analysis and antimicrobial evaluation of cymbidium cultivation by-products. *Antioxidants*, 11(1), 101.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Beckman, K. B. ve Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78, 547-581.

- Berlett, B. S. ve Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.
- Bhagavathy, S., Sumathi, P. ve Bell, I. J. S. (2011). Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S1-S7.
- Bhuiyan, A. K. M., Sakib, N., Pakpour, A. H., Griffiths, M. D. ve Mamun, M. A. (2021). COVID-19-related suicides in Bangladesh due to lockdown and economic factors: case study evidence from media reports. *International Journal of Mental Health and Addiction*, 19(6), 2110-2115.
- Bischoff, H. (1995). The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clinical and Investigative Medicine*, 18(4), 303-311.
- Blinova, I. V. ve Uotila, P. (2012). *Dactylorhiza traunsteineri* (Orchidaceae) in murmansk region (Russia). *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica*, 88, 67-79.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bose, B., Choudhury, H., Tandon, P. ve Kumaria, S. (2017). Studies on secondary metabolite profiling, anti-inflammatory potential, in vitro photoprotective and skin-aging related enzyme inhibitory activities of *Malaxis acuminata*, a threatened orchid of nutraceutical importance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173, 686-695.
- Breen, A. P. ve Murphy, J. A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 1033-1077.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. ve Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2465- 2467.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247.
- Bulgakov, V. P., Inyushkina, Y. V. ve Fedoreyev, S. A. (2012). Rosmarinic acid and its derivatives: Biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 203-217.
- Büyükuslu, N. ve Yiğitbaşı, T. (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 5(3), 197-203.
- Casas-Grajales, S. ve Muriel, P. (2015). Antioxidants in liver health. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 6, 59-72.

- Cejas, D., Francisco, M., Alan, E., Micaela, F., Cecilia, O., María, V., ... Marcela, R. (2022). *Emergence and Clonal Expansion of Klebsiella Pneumoniae ST307, Simultaneously Producing KPC-3 and NDM-1*. Revista Argentina de Microbiología. doi: 10.1016/j.ram.2022.04.002
- Chai, L. Y. A., Denning, D. W. ve Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(4), 282-298.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K. ve Vivanco, J.M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS One*, 8(2), e55731.
- Ciccia, A. ve Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular Cell*, 40(2), 179-204.
- Cicek, A. C., Duzgun, A. O., Saral, A. ve Sandalli, C. (2014). Determination of a novel integron-located variant (blaOXA-320) of Class D  $\beta$ -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10), 1030-1035.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. ve Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17, 1195-1214.
- Cooksey, C. J., Garratt, P. J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. ...Smit, N. P. (1997). Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26226-26235.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Review*, 12(4), 564-582.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M., Martí Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.F. ...Basilio, A. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372-382
- Çalışkan, Ö. (2018). *Salep Orkideleri*. Samsun: Erol Ofset Yayınları.
- Çolak, Ö. (2014). *Sakkaroz tayini için biyosensör hazırlanması*. Yayımlanmamış doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Dalar, A., Guo, Y., Esim, N., Bengu, A. S. ve Konczak, I. (2015). Health attributes of an endemic orchid from Eastern Anatolia, *Dactylorhiza chuhensis* Renz&Taub. - in vitro investigations. *Journal of Herbal Medicine*, 5, 77-85.
- Daniels, N. A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R. M. ... Slutsker, L. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1661-1666.

- Dawson, F.A. (1994). The amazing terpenes. *Naval Stores*, 6-12.
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H. ve Güngör, H. (2019). Nar (*Punica granatum* L.) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antienflamatuar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, 17(1), 61-71.
- Dik, B. (2013). Metabolik sendromun tedavisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(3), 259-269
- Dinçer, Y. ve Akçay, T. (2000). DNA hasarı. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(2), 73-79.
- Dressler, R. L. (1993). Phylogeny and classification of the orchid family. USA: Cambridge University Press.
- Eliopoulos, G. M. (1992). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs. *The Journal of Infectious Diseases*, 280, 6.
- Erb, M. ve Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39-52.
- Erdoğan, A. ve Everest, A., (2013). Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2, 27-32.
- Eric, P. ve Baron, D. O. (2018). Medicinal properties of cannabinoids, terpenes, and flavonoids in Cannabis, and benefits in migraine, headache, and pain: An update on current evidence and Cannabis science. *Headache The Journal of Head and Face Pain*, 58(7), 1139-1186.
- Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P. ...Jula, A. (2008). Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 323-331.
- Evans, M.D. ve Cooke, M.S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, 26, 533-542.
- Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H. C. ve Wieler L. H. (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104, 91-101.
- Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 29-66.
- Farhoosh, R. ve Riazi, A. (2007). A compositional study on two currents types of salep in Iran and their reological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21, 660-666.

- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. (2014). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 233-265.
- Fisher, L., Ianiro, T., Lau, F., Wang, H. ve Daggy, B. (2015). Synergistic effects of phenolic mixtures in human cell models of aging. *The FASEB Journal*, 29, 608-36.
- Gantait, S., Das, A., Mitra, M. ve Chen, J. T. (2021). Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology. *South African Journal of Botany*, 139, 338-351.
- Ghisalbertie, E. L. (1979) Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84.
- Gholamhoseinian, A. ve Zohre Razmi, Z. (2012). Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity. *Toxicol Environ Chem*, 94, 310-318.
- Giménez, M. J., Valverde, J. M., Valero, D., Guillén, F., Martínez, Romero, D. ve Castillo, S. (2014). Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. *Food Chemistry*, 160, 226–232.
- Giri, N. Y., Mohan, A. R., Rao, L. V. ve Rao, C. P. (1990). Immobilization of amylase complex in detection of higher oligosaccharides on paper. *Curr Science*, 59, 1339-1340.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. ve Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P. ve Pandey, D.K. (2021). Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition. *South African Journal of Botany*, doi: 10.1016/j.sajb.2021.10.014
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9, 1-32.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 253-265.
- Harborne J. B. ve Williams C. A. (2002). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B. ve Ames B. N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*, 300, 156-166.

- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances-an overview. *Fitoterapia*, 82, 102-140.
- Iwu, M. M., Duncan, A. R. ve Okunji, C. O. (1999). *New antimicrobials of plant origin*. J. Janick (Ed.), Perspectives on new crops and new uses içinde (ss. 457-462). Alexandria, VA: ASHS Press.
- Jaganjac, M., Milkovic, J., Zarkovic, N. ve Zarkovic, K. (2022). Oxidative stress and regeneration. *Free Radical Biology and Medicine*, 891-5849.
- Jaradat, N., Khasati, A., Hawi, M., Hawash, M., Shekfeh, S., Qneibi, M., ...Qaoud, M.T. (2022). Antidiabetic, antioxidant, and anti-obesity effects of phenylthioethyl benzoate derivatives, and molecular docking study regarding a-amylase enzyme. *Scientific Reports*, 12, 1-9.
- Jeppesen, D. K., Bohr, V. A. ve Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 94(2), 166-200.
- Jiang, S., Wang, M., Jiang, L., Xie, Q., Yuan, H., Yang, Y. ve Wang, W. (2021). The medicinal uses of the genus Bletilla in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114263.
- Jung, M., Park, M., Lee, H.C., Kang, Y.H., Kang, E. S. ve Kim, S. K. (2006). Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*, 13(10), 1203-1218.
- Kahraman, A., Serteser, M. ve Köken, T. (2002). Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3, 1-8.
- Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke, A. ve Merk H. (2000). Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13, 143-149.
- Kan, A., Ozcelik, B. ve Kartal, M. (2009). In vitro antiviral activities under cytotoxic doses against herpes simples type-1 and parainfluenza-3 viruses of *Cicer arietinum* L. (Chickpea). *Africa J. Pharm. Pharmacol*, 3(12), 627-631.
- Kanlayavattanukul, M., Lourith, N. ve Chaikul, P. (2018). Biological activity and phytochemical profiles of Dendrobium: a new source for specialty cosmetic materials. *Industrial Crops and Products*, 120, 61-70.
- Karou, D., Nadembega, W.M.C., Ouattara, L., Ilboudo, D. P., Canini, A., Nikiema, J. B. ve Traore, A. S. (2007). African ethnopharmacology and new drug discovery. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 61-69.

- Kınık, Ö., Gönç, S. ve Akalın S. (1998). *Çiğ Sütte Patojen Mikroorganizmalar*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Kim, Y. J. ve Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1707-1723.
- Kotiloğlu, D., Acet, T. ve Özcan, K. (2020). Phytochemical profile and biological activity of a therapeutic orchid from Anatolia: *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 3310-3318.
- Kreutz, K. (2009). *Türkiye Orkideleri*. İstanbul: Rota Yayınları.
- Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D. ve Witztum, J. L. (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation*, 110(5), 637- 641.
- Kruzai, O., El Barkani, A. ve Mühlschlegel F. A. (2002). Adaptation of fungi to alterations in ambient ph. R. A. Calderone ve R. L. Cihlar (Ed.), *Fungal pathogenesis principles and clinical applications* içinde (10. Baskı). USA: Marcel Dekker.
- Kumar, A. N., Aruna, P., Naidu, J. N., Kumar, R. ve Srivastava, A. K. (2015). Review of concepts and controversies of uric acid as antioxidant and pro-oxidant. *Archives Medical Review Journal*, 24(1), 19-40.
- Kumar, V., Lemos, M., Sharma, M. ve Shriram, V. (2013). Antioxidant and DNA damage protecting activities of *Eulophia nuda* Lindl. *Free Radicals and Antioxidants*, 3, 55-60.
- Kuyucu, N. (2007). Antibiyotik direnci. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 1, 33-38.
- Kürek, N. (2007). *Denizli ve çevresinde yayılış gösteren Eryngium cinsine ait saf ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi*. Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- Lai, P. K. ve Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11), 1451-1460.
- Liu, L. ve Gerson, S. L. (2006). Targeted modulation of MGMT: Clinical implications. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 328-331.
- Longo, R. (2010). Diabetes under control: Understanding oral antidiabetic agents. *The American Journal of Nursing*, 110(2), 49-52.
- Louro, R. O. ve Crichton, R. R. (2013). *Practical Approaches To Biological Inorganic Chemistry*. Amsterdam, Oxford: Elsevier.

- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164-175.
- Maeda, K. ve Fukuda M. (1991) In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 42, 361-368.
- Mahomoodally, M. F., Marie Carene, M. C. N., Zengin, G., Eulogio, E. J., Abdullah, H. H., Ak, G., ...Ferrante, C. (2020). Phytochemical analysis, network pharmacology and in silico investigations on anacamptis pyramidalis tuber extracts. *Molecules*, 25.
- Marshall, M. R., Kim, J. ve Wei, C. (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. 1 Mayıs 2010 tarihinde <http://www.fao.org/ag/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.html> adresinden erişildi.
- McAllister, M. J., Basham, S. A., Waldman, H. S., Smith, J. W., Mettler, J. A., Butawan, M. B. ...Bloomer, R. J. (2019). Effects of psychological stress during exercise on markers of oxidative stress in young healthy, trained men. *Physiology & Behavior*, 198, 90-95.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W. J. ve Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 15-33.
- Memişlioğlu, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Merinos, S., Camprubi, S., Alberti, S., Benedi, V. J. ve Tomas, J. M. (1992). Kompleman aracılı öldürmeye karşı *Klebsiella pneumoniae* direncinin mekanizmaları. *Bağışıklığı Bulaştır*, 60, 2529-2535.
- Meyrand, A., Atrache, V., Bavai, C., Montet, M. P. ve Vernozy-Rozand, C. (1999). Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 28(6), 411-415.
- Milligan, J. R. ve Ward, J. F. (1994). Yield of single-strand breaks due to attack on DNA by scavenger-derived radicals. *Radiation Research*, 137, 295-299.
- Mohanty, P., Das, M. C., Kumaria, S. ve Tandon, P. (2012). High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 109, 297-305.

- Mohanty, P., Das, M.C., Kumaria, S. ve Tandon, P. (2013). Cryopreservation of pharmaceutically important orchid *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. using vitrification based method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1373-1379.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J. ve Dominguez, H. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
- Musumeci, T. G. (2013). *Antimicrobial agents, University of Catania*. Italy: Woodhead Publishing Limited.
- Naczki, M. ve Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Naveen, Y. P., Urooj, A. ve Byrappa, K. (2021). A review on medicinal plants evaluated for anti diabetic potential in clinical trials: Present status and future perspective. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100436.
- Nawar, W. W. (1996). *Lipids. Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (N. Kılıç, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Noori, M., Rastak, M., Halimi, M., Mollazadeh, M., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Rezaei, Z., ...Mahdavi, M. (2022). Design, synthesis, in vitro, and in silico enzymatic evaluations of thieno[2,3-b]quinoline-hydrazones as novel inhibitors for  $\alpha$ -glucosidase. *Bioorganic Chemistry*, 2045-2068.
- Orhan, D., Özçelik, B., Hoşbaş, S. ve Vural, M. (2012). Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish Journal of Biology*, 36, 672-686.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. ve Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

- Özcan, K. (2021). Determination of biological activity of *Carduus lanuginosus*: An endemic 500 plant in Turkey. *International Journal of Environmental Health Research*, 31, 45–53.
- Özcan, O., Erdal H., Cakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6, 331- 336.
- Özden, S. (2006). *Bazı pestisidlerin oksidatif stres oluşturma potansiyellerinin ve antioksidan sistemler üzerine etkilerinin sıçanlarda araştırılması*. Yayımlanmamış doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Paech, K. (1950). *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Păltinean, R., Ielciu, I., Vlase, L., Mocan, A., Gheldiu, A., Babotă, M., ... Crişan, G. (2017). Histo-anatomical researches, polyphenolic profile and biological activities of the aerial parts and tubers of *Dactylorhiza maculata* L. SOÓ. (Orchidaceae). *Digital Camera*, 15, 19.
- Pasternak, J. J. (2005). *An Introduction to Human Molecular Genetic* (2. Baskı). Wiley-IEEE.
- Paul, P. ve Kumaria, S. (2020). Precursor- induced bioaccumulation of secondary metabolites and antioxidant activity in suspension cultures of *Dendrobium fimbriatum*, an orchid of therapeutic importance. *South African Journal of Botany*, 135, 137-143.
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: New aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12, 207-227.
- Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6, 1–5.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. ve Jung, S. H. (2017). Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal*, 40, 99-115.
- Pisoschi, A. M. ve Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Polat, R. ve Çakılcıoğlu, U. (2018). Ethnobotanical study on medicinal plants in Bingöl (Turkey). *Journal of Herbal Medicine*, 16, 100211.
- Price, N. ve Stevens, L. (1982). *Fundamentals of Enzymology*. Oxford: Oxford University
- Ramakrishna, A. ve Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6, 1720-1731.

- Ramesh, C. H. ve Pattar, M. G. (2010). Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research*, 2(2), 107.
- Rao, S., Linke, L., Magnuson, R., Jauch, L. ve Hyatt, D. (2022). Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* collected from livestock, poultry and humans. *One Health*, 15, 2352-7714.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Richardson, M. D. ve Warnock, D. W. (2003). *Fungal Infection Diagnosis and Management: Superficial Candidosis* (3. Baskı). UK: Blackwell Publishing.
- Riso, P., Visioli, F., Erba, D., Testolin, G. ve Porrini, M. (2004). Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(10), 1350-1358.
- Rykaczewski, M., Krauze-Baranowska, M., Żuchowski, J., Krychowiak-Maśnicka, M., Fikowicz-Krośko, J. ve Królicka, A. (2019). Phytochemical analysis of *Brasolia*, *Elleanthus*, and *Sobralia*. Three genera of orchids with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry Letters*, 30, 245-253.
- Sandrasagaran, U. M., Subramaniam, S. ve Murugaiyah, V. (2014). New perspective of *dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 719-724.
- Sarikürkçü, C. ve Zengin, G. (2020). Polyphenol profile and biological activity comparisons of different parts of *astragalus macrocephalus* subsp. *Finitimus* from Turkey. *Biology (Basel)*, 9, 1-15.
- Seigler, D. S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. US: Springer.
- Sergelidis, D. ve Abraham, A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control* 20, 1-10.
- Sezik, E. (2002). Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44(3), 151-157.
- Shinde, A., Ganu, J. ve Naik, P. (2012). Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Science*, 1(2), 63- 66.
- Shinji, M. (1993). Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *Actinomycetol*, 7, 100-106.

- Shipunov, A. B., Fay, M. F., Pillon, Y., Bateman, R. M. ve Chase, W. (2004). Dactylorhiza (Orchidaceae) in European, Russia: combinet molecular and morphological analysis. *American Journal of Botany*, 91(9), 1419-1426.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.
- Silva, N. C. C. ve Fernandes, J. A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 16(3), 402-413.
- Singh, D. K., Pathak, P., Sehgal, R. N., Shekhar, N., Sharma, M. ve Sood, A. (2001). *Orchids: Science And Commerce*. New Delhi.
- Singh, L., Singh, B., Kewlani, P., Belwal, T., Bhatt, I. D., Nandi, S. K. ...Bisht, A.K. (2022). Process optimization and bioactive compounds quantification from Dactylorhiza hatagirea tuber for alleviating glycemic and oxidative stress. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 26, 100352.
- Sivanandham, V. (2011). Free radicals in the health and disease a mini review. *Pharmacologyonline*, 1, 1062-1077.
- Skulachev, V. P. (2012). Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(2), 283-289.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49- 55.
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J. ve Petrović, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205-3208.
- Strateva, T. ve Yordanov, D. (2009). Pseudomonas aeruginosa—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Stringfixer (2022). PUC19. 15 Nisan 2022 tarihinde <https://stringfixer.com/tr/PUC19> adresinden erişildi.
- Sugumaran, M. (1991) Molecular mechanism for cuticular sclerotization. *Advances in Insect Physiology*, 21, 179–231.
- Sukhikh, S., Noskova, S., Ivanova, S., Skrypnik, L., Pungin, A., Ulrikh, E., ...Babich, O. (2021). Study of the properties of in vitro dactylorhiza maculata (L.) soo (family orchidaceae) extracts. *Plants* 10, 1–12.

- Sun, Y., Anwar, A., Razzaq, A., Liang, X. ve Siddique, M. (2022). Asymmetric role of renewable energy, green innovation, and globalization in deriving environmental sustainability: Evidence from top-10 polluted countries. *Renewable Energy*, 185, 280-290.
- Sun, Y., Feng, J., Tan, Y., Zhou, L., Lan, T. ve Ma, J. (2022). Genomic and biological characterization of, a novel lytic bacteriophage that infects *Proteus vulgaris*. *Genomics*, 888-7543.
- Suzuki, T., Miyamae, Y. ve Ishida, I. (1991). Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. *Journal of General Microbiology*, 137(1), 161-167.
- Swanson, S. J., Snider, C., Braden, C. R., Boxrud, D., Wünschmann, A., Rudroff, J. A. ...Smith, K. E. (2007). Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. *New England Journal of Medicine*, 356(1), 21-28.
- Şahin, D. Y., Elbasan, Z., Gür, M., Türkoğlu, C., Özaltun, B., Sümbül, Z. ...Çaylı, M. (2012). Relationship between oxidative stress markers and cardiac syndrome X. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 3(2), 174-180.
- Şen, M. A. (2016). *Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanılan orkidelerden elde edilen saleplerin özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel yöntemle Maraş usulü dondurma yapımında ürün kalitesine etkilerinin araştırılması*. Yayınlanmamış doktora tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Taslimi, P. ve Gülçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on  $\alpha$ -glycosidase and  $\alpha$ -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31, e21956.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), 3-10.
- Thangapazham, R. L., Sharma, A. ve Maheshwari, R. K. (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS Journal*, 8(3), E443.
- Tükel, Ç. ve Doğan, H. B. (2000). *Staphylococcus Aureus*. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara: Sim Matbaacılık.
- Ustaçelebi, İ. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. ve Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.

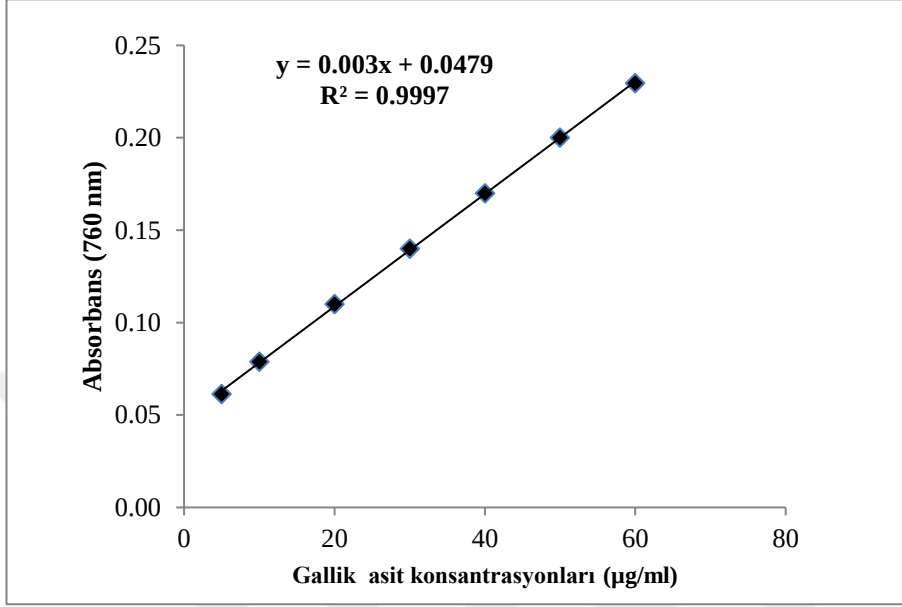
- Verma, N. ve Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Verma, S., Singh, A. ve Mishra, A. (2016). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, 473-485.
- Wang, J., Fang, X., Ge, L., Cao, F., Zhao, L., Wang, Z. ...Xiao, W. (2018). Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS One* 13, 1-12.
- Wang, N. S. (2017). *Summary of Sites on pUC19*. Department of Chemical & Biomolecular Engineering University of Maryland.
- Wati, R. K., Graaf, E. F., Bogarín, D., Heijungs, R., van Vugt, R., Smets, E.F. ...Gravendeel, B. (2021). Antimicrobial activity of necklace orchids is phylogenetically clustered and can be predicted with a biological response method. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1-14.
- Wu, X. Q., Li, W., Chen, J. X., Zhai, J. W., Xu, H. Y., Ni, L. ...Wu, S. S. (2019). Chemical constituents and biological activity profiles on Pleione (Orchidaceae). *Molecules*, 24(17), 3195.
- Xiao, Z., Storms, R. ve Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351, 146-148.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V. ve Gómez Cadenas, A. (2017). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zengin, G., Sarikürkçü, C., Aktümsek, A. ve Ceylan, R. (2014). Sideritis galatica Bornm.: A source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer and diabetes mellitus. *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.
- Zheng, G., Lv, H. P., Gao, S. ve Wang, S. R. (2010). Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in Glycyrrhiza uralensis seedlings. *Plant, Soil and Environment*, 56(11), 508-515.
- Zilberberg, M. D., Chen, J., Mody, S. H., Ramsey, A. M. ve Shorr, A. F. (2010). Imipenem resistance of Pseudomonas in pneumonia: A systematic literature review. *BMC Pulmonary Medicine*, 10(1), 1-11.

- Zinkel, D. F. ve Russell, J. (1989). *Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization*. New York: Pulp Chemicals Association.
- Zuza Alves, D. Z., Silva Rocha, W. P. ve Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in Microbiology*, 13(8), 1927.

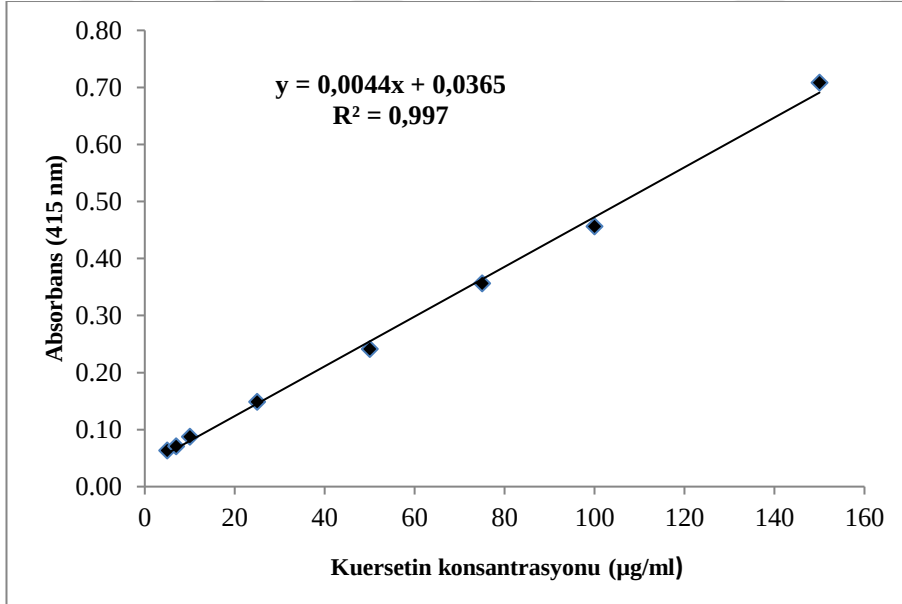


## EKLER

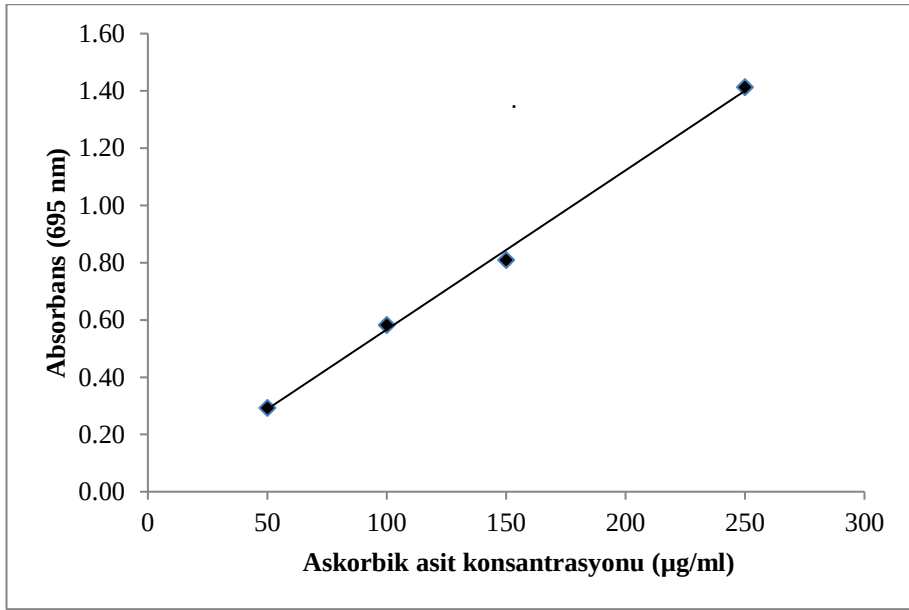
### Ek 1. Şekiller



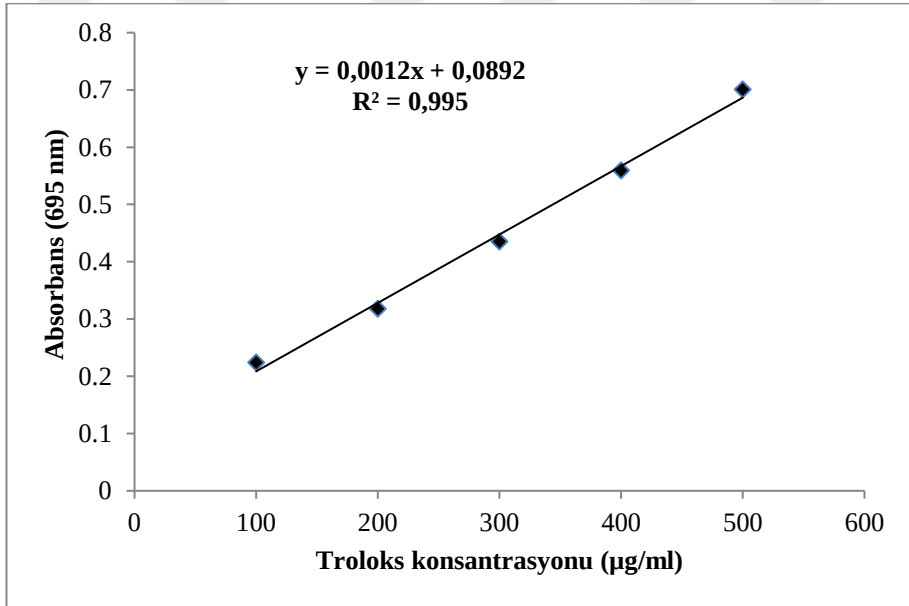
Şekil 29. Fenolik madde tayini için gallik asit standart grafiği



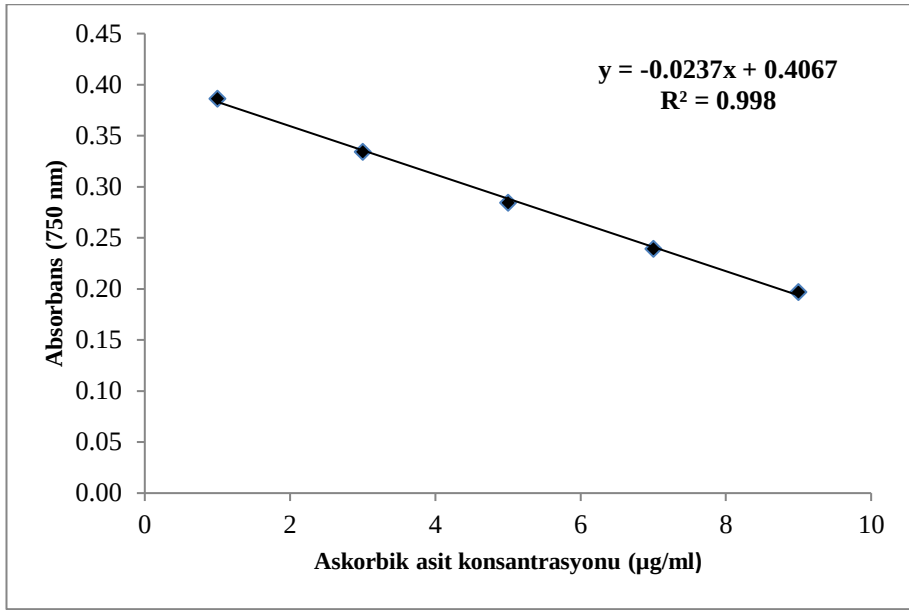
Şekil 30. Flavonoid madde tayini için kuersetin standart grafiği



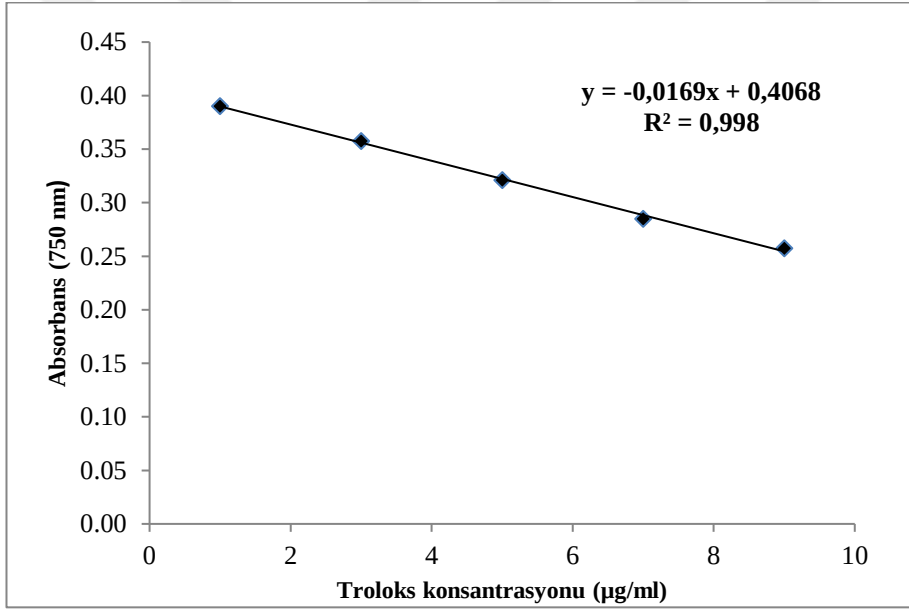
Şekil 31. Fosfomolibdat testi için askorbik asit standart grafiği



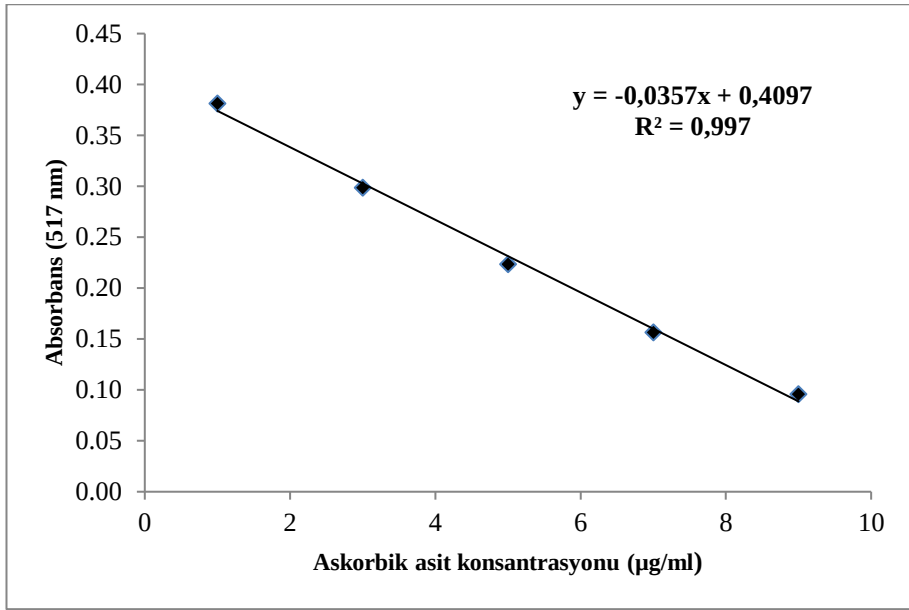
Şekil 32. Fosfomolibdat testi için troloks standart grafiği



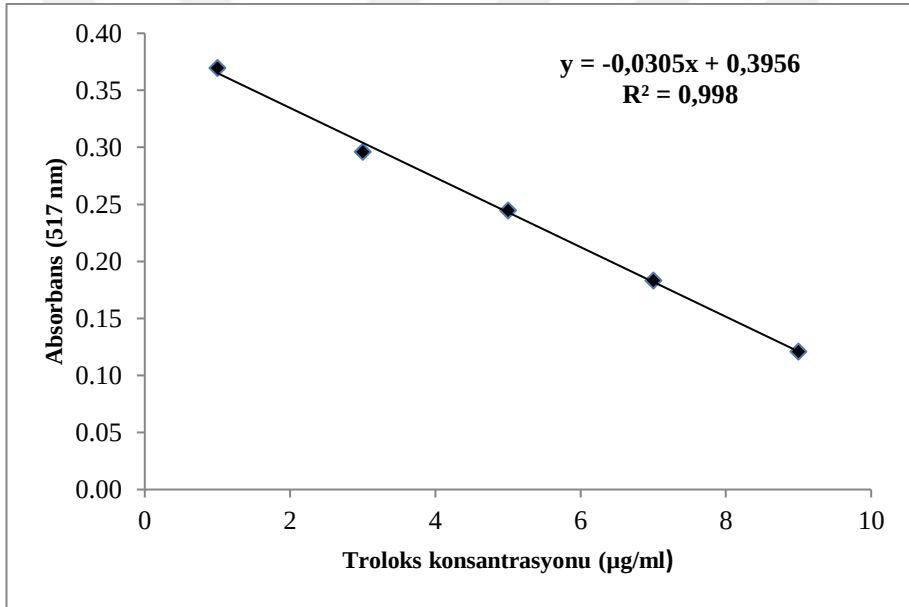
Şekil 33. ABTS için askorbik asit standart grafiği



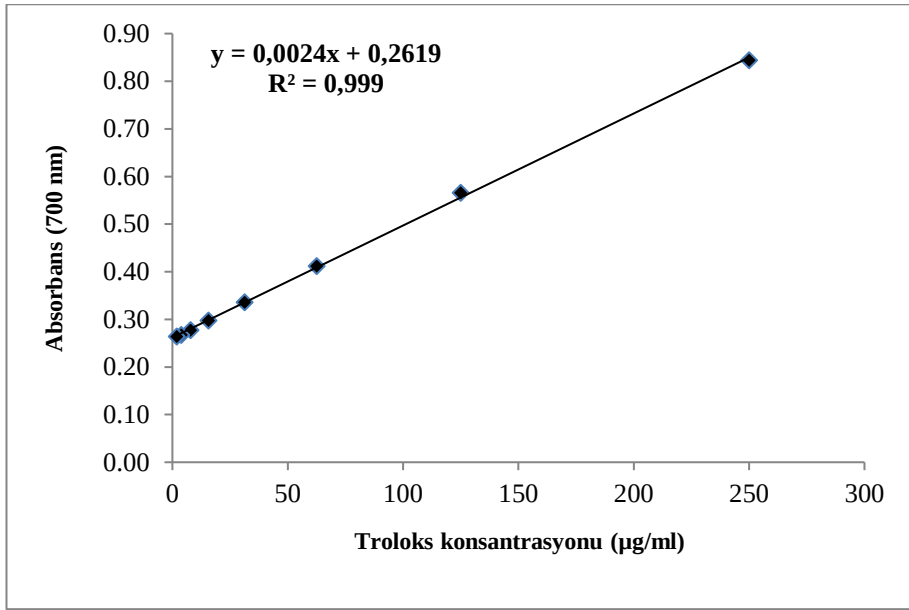
Şekil 34. ABTS için troloks standart grafiği



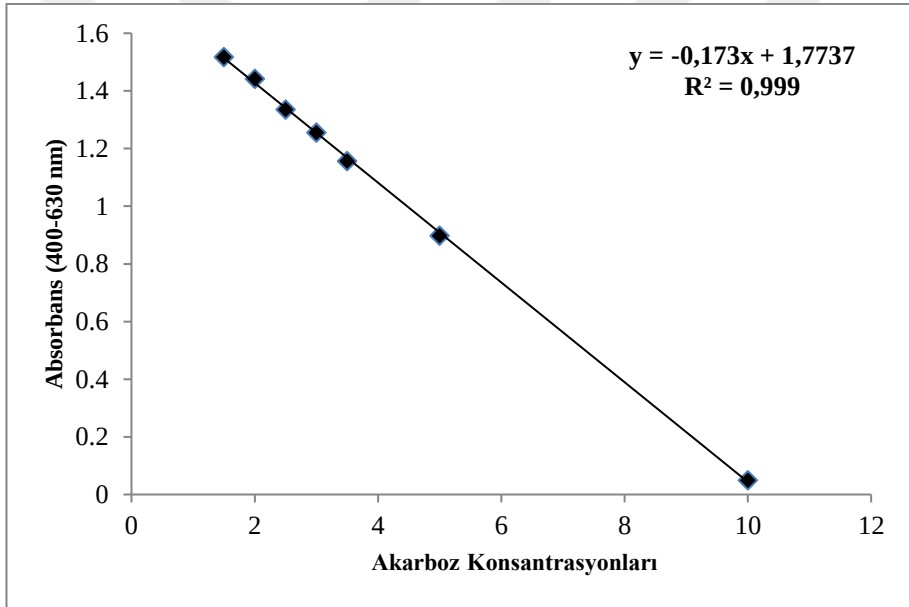
Şekil 35. DPPH için askorbik asit standart grafiği



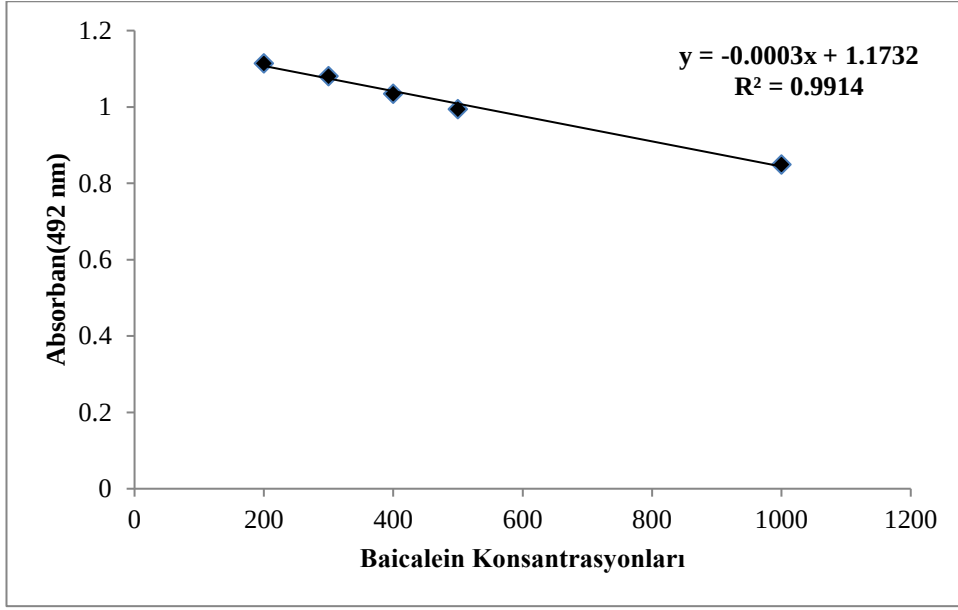
Şekil 36. DPPH için troluks standart grafiği



Şekil 37. FRAP için troloks standart grafiği



Şekil 38. Alfa amilaz ve alfa glukozidas için akarboz standart grafiği



Şekil 39. Trozinaz için baicalein standart grafiği

## ÖZGEÇMİŞ

Buğra BOZKIR 2014 senesinde Gümüşhane Ticaret Meslek Lisesi'nden mezun olarak orta öğretimini tamamladı. 2018 yılında Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden mezun oldu. 2019 senesinde Gümüşhane Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nde Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

### Yayınlar:

Bozkir, B., Acet, T. ve Özcan, K. (2022). Investigation of the effects of different extraction methods on some biological activities of *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taubenheim. *South African Journal of Botany*, 149, 347-354, ISSN 0254-6299, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.017>.