



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GÜMÜŞHANE İLİNDE DOĞAL OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN
DACTYLORHIZA ROMANA SUBSP. *GEORGICA* ALT TÜRÜNE AİT
YUMRULARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FENOLİK İÇERİĞİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz KOTİLOĞLU

MAYIS 2019
GÜMÜŞHANE

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GÜMÜŞHANE İLİNDE DOĞAL OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN
DACTYLORHIZA ROMANA SUBSP. *GEORGICA* ALT TÜRÜNE AİT
YUMRULARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FENOLİK İÇERİĞİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz KOTİLOĞLU

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
“Biyoteknoloji Anabilim Dalı”

Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08.05.2019

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 28.05.2019

MAYIS 2019



KABUL ve ONAY



Dr. Öğr. Üyesi Tuba ACET ve Dr. Öğr. Üyesi Kadriye ÖZCAN (2. danışman) danışmanlığında **Deniz KOTİLOĞLU** tarafından hazırlanan “**GÜMÜŞHANE İLİNDE DOĞAL OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN *DACTYLORHIZA ROMANA* SUBSP. *GEORGICA* ALT TÜRÜNE AİT YUMRULARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FENOLİK İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ**” isimli bu çalışma jürimiz tarafından Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak Oy Birliği ile kabul edilmiştir.

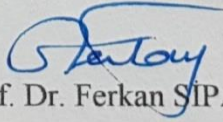
Başkan : Doç. Dr. İbrahim TURAN

Üye (Danışman) : Dr. Öğr. Üyesi Tuba ACET

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Cengiz ÇORBACI

ONAY

Bu tez **03.07.2019** tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ferkan SİPAHİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlamış olduğum "GÜMÜŞHANE İLİNDE DOĞAL OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN *DACTYLORHIZA ROMANA* SUBSP. *GEORGICA* ALT TÜRÜNE AİT YUMRULARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FENOLİK İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ" isimli tez çalışmasında; bütün bilgi ve belgeleri genel akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 08/05/2019

Deniz KOTİLOĞLU

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÜMÜŞHANE İLİNDE DOĞAL OLARAK YAYILIŞ GÖSTEREN
DACTYLORHIZA ROMANA SUBSP. GEORGICA ALT TÜRÜNE AİT
YUMRULARIN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FENOLİK İÇERİĞİNİN
BELİRLENMESİ**

Deniz KOTİLOĞLU

Gümüşhane Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuba ACET
İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kadriye ÖZCAN
2019, 96 sayfa

Gümüşhane İli Kelkit İlçesi, göstermiş olduğu bitki çeşitliliği nedeniyle önemli bitki alanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Orchidaceae familyasına ait farklı bitki türleri bu bölgede yoğun bir yayılış göstermektedir. Özellikle, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesinin yumruları geleneksel yöntemler ile pek çok hastalığın hafifletilmesinde yerel halk tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, yerel halk tarafından kullanılan bu bitkinin biyolojik aktivitelerinin ve fenolik içeriğinin aydınlatılması ve böylece geleneksel kullanımının biyoteknolojik bir bakış açısıyla değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için, farklı polaritelere sahip çözümlerle (kloroform, etil asetat, metanol, etanol ve hekzan) hazırlanan yumru ekstraktlarının toplam

fenolik ve flavonoid madde miktarları, toplam antioksidan kapasitesi ve antioksidan aktivitesi spektrofotometrik yöntemler kullanılarak; fenolik madde içeriği ise HPLC analizi ile belirlendi. Ayrıca, ekstrelerin 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) bakteri ve 7 adet fungus (2 maya, 5 küf) olmak üzere toplam 13 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. En yüksek toplam fenolik madde miktarına (29.15 ± 0.24 mg GAE/g ekstre), toplam flavonoid madde miktarına (6.97 ± 0.25 mg QE/g ekstre), ABTS radikali giderme aktivitesine (89.49 ± 0.83 mg AAE/g ekstre, 50.17 ± 0.96 mg TE/g ekstre), DPPH radikali giderme aktivitesine (9.02 ± 0.01 mg AAE/g ekstre, 12.58 ± 0.08 mg TE/g ekstre) etil asetat ekstresinde rastlandı. Yumru ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ile antioksidan kapasite sonuçları arasında korelasyon bulundu. En yüksek fenolik içeriğe sahip olan etil asetat ekstresinde taranan yirmi fenolik bileşenden dokuz tanesi tespit edildi. En fazla bulunan fenolik bileşenin antimikrobiyal etkinliğiyle iyi bilinen benzoik asit ($1455.3 \mu\text{g/g}$ ekstre) olduğu görüldü. Antimikrobiyal aktivite tayinlerinde ekstrelerin çalışmada kullanılan küflere karşı herhangi bir inhibisyon göstermediği tespit edildi. Disk difüzyon yönteminde çalışmada kullanılan ekstrelerin bazı bakteri ve mayalara karşı inhibisyon zonu oluşturduğu, öte yandan ekstrelerin bakterilerden ziyade daha çok maya türlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi. En düşük MİK değeri kloroform ekstresinde mayalardan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için 0.5125 mg/ml ve etil asetat ekstresinde *C. albicans* için 0.5125 mg/ml olarak tespit edildi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesinin yumru ekstrelerinin yüksek biyolojik aktiviteleri nedeniyle, biyoteknoloji alanında gıda ve ilaç endüstrilerinde doğal ve alternatif bir kaynak olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Antioksidan aktivite, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*, Toplam fenolik, Toplam flavonoid

ABSTRACT

MS THESIS

**DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHENOLIC CONTENT
OF *DACTYLORHIZA ROMANA* SUBSP. *GEORGICA* TUBERS SPREADED IN
THE NATURAL FLORA OF GÜMÜŞHANE**

Deniz KOTİLOĞLU

Gümüşhane University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Tuba ACET

Co-Supervisor: Asst. Prof. Kadriye ÖZCAN

2019, 96 pages

Kelkit District of Gümüşhane Province is considered to be one of the important plant areas due to the variety of plants present in the district. Different plant species belonging to the Orchidaceae family show intense distribution in this region. In particular, the tubers of *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* commonly used by the local population to alleviate many diseases by conventional methods. In this study, it is aimed to enlighten the biological activities and phenolic content of this plant used by local people and thus to evaluate its traditional use from a biotechnological point of view. For this purpose, total phenolic and flavonoid content, total antioxidant capacity, antioxidant activity of the tuber extracts prepared with solvents with different polarities (chloroform, ethyl acetate,

methanol, ethanol and hexane) were determined by spectrophotometric methods and phenolic content by HPLC analysis. In addition, the antimicrobial activity of the extracts against 13 microorganisms including 3 Gram (+), 3 Gram (-) bacteria and 7 fungi (2 yeast, 5 mold) were determined by disk diffusion and microdilution methods. To the highest total phenolic content (29.15 ± 0.24 mg GAE/g extract), total flavonoid content (6.97 ± 0.25 mg QE/g extract), ABTS radical scavenging activity (89.49 ± 0.83 mg AAE/g extract, 50.17 ± 0.96 mg TE/g extracts), DPPH radical scavenging activity (9.02 ± 0.01 mg AAE/g extract, 12.58 ± 0.08 mg TE/g extract) were observed in the ethyl acetate extracts. There was a correlation between total phenolic and flavanoids of the tuber extracts and antioxidant capacity results. Nine of the twenty phenolic components scanned were detected in the ethyl acetate extract that has the highest phenolic content. The highest phenolic component amount was detected as benzoic acid (1455.3 μ g/g extract), well known for its antimicrobial activity. In the antimicrobial activity assays, the extracts did not show any inhibition against the molds used in the study. In the disc diffusion method, it was determined that the extracts used in the study formed a zone of inhibition against some bacteria and yeasts, whereas the extracts showed more antimicrobial activity than yeast species rather than bacteria. The lowest MIC value was found to be 0.5125 mg/ml for *C. albicans* and *C. tropicalis* in the chloroform extract and 0.5125 mg/ml for *C. albicans* in ethyl acetate extract.

According to the results of this study, the tuber extracts of *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* are thought to have the potential to be used as a natural and alternative source in the food and pharmaceutical industries in the field of biotechnology due to their high biological activities.

Key words: Antimicrobial activity, Antioxidant activity, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*, Total phenolic, Total flavonoid

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmalarım boyunca değerli katkıları, yol gösterici fikirleri ve beni sürekli ayakta tutmak adına sağladıkları moral ve motivasyon için sevgili Tez Danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi Tuba ACET ve Dr. Öğr. Üyesi Kadriye ÖZCAN'a şükranlarımı sunarım.

Bitkilerimin tür teşhisinde bana yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'nda görev yapan Doç. Dr. İ. Gökhan DENİZ'e nezaketi ve değerli bilgi paylaşımı için teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında ve özellikle laboratuvar analizlerinde aktardığı değerli gözlemleri ile bana destek olan yüksek lisans arkadaşım Biyolog Osman AKMEŞE'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca gösterdiği sabır ve manevi desteği için Müdürüm Bahadır NASUHBEOĞLU'na, her koşulda arkamda duran çalışma arkadaşım Ziraat Mühendisi Haluk AYDEMİR'e, değerli arkadaşlarım Ayşe ARSLAN, Aycan KOCABEOĞLU, Mehtap KARAGÖL, Seniha AGDAŞ, Dilek UÇAR, Cihan YILMAZ'a ve ayrıca Daştan ÇELİK'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan değerli annem ve ablam Hamiyet KOTİLOĞLU ve Rahşan KOTİLOĞLU TOPTAŞ'a, elimi asla bırakmayan ablam Ceyda KOTİLOĞLU'na, desteği için eniştem Salih TOPTAŞ'a ve zamanını, emeğini tüm içtenliğiyle benimle paylaşan, kardeşim kadar candan sevdiğim Sevinç Sevim KAHYA KELEŞ'e en derin teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatta olsaydı tüm tez sürecinde bir çocuk gibi heyecanla hedefe ulaşmamı bekleyecek olan rahmetli babam Feti KOTİLOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Deniz KOTİLOĞLU
Gümüşhane, 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Çalışmanın Amacı	4
1.3. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> Bitkisine İlişkin Genel Bilgiler	5
1.4. Bitki Seçimi	7
1.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	7
1.6. Oksidatif Stres	9
1.7. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları	11
1.7.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	12
1.7.1.1. Endojen Antioksidanlar	13
1.7.1.2. Eksojen Antioksidanlar.....	15
1.8. Bitkisel Sekonder Metabolitler	15
1.8.1. Fenolik Bileşikler.....	16
1.8.1.1. Flavonoidler	18
1.8.1.2. Fenolik Asitler	20

1.9.	Mikroorganizmalar	22
1.10.	Antimikrobiyal Ajanlar.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1.	Materyal.....	29
2.1.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	29
2.1.2.	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler.....	30
2.2.	Metot.....	30
2.2.1.	Bitkilerin Toplanması	30
2.2.2.	Bitki Yumrularının Ekstraksiyona Hazırlanması ve Ekstraksiyon İşlemi	31
2.2.3.	Çözeltilerin Hazırlanması	34
2.2.4.	Antimikrobiyal Aktivite Tayinleri için Gerekli Hazırlıkların Yapılması.....	36
2.2.5.	Toplam Fenolik Madde Tayini	38
2.2.6.	Toplam Flavonoid Madde Tayini	39
2.2.7.	Toplam Antioksidan Kapasite Tayini.....	40
2.2.7.1.	Fosfomolibdat Yöntemi	40
2.2.8.	Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemleri.....	42
2.2.8.1.	ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini	42
2.2.8.2.	DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini	45
2.2.9.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi	47
2.2.10.	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	48
2.2.10.1.	Disk Difüzyon Yöntemi.....	49
2.2.10.2.	Mikrodilüsyon Yöntemi	51
2.3.	İstatistiksel Analizler	52
3.	BULGULAR.....	53
3.1.	Ekstre Verimi.....	53

3.2.	Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları.....	53
3.3.	Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları.....	54
3.4.	Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları	56
3.4.1.	Fosfomolibdat Yöntemi Tayini Sonuçları	56
3.5.	Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları.....	57
3.5.1.	ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini Sonuçları.....	57
3.5.2.	DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini Sonuçları	60
3.6.	HPLC Analizi ile Fenolik Madde İçeriği Sonuçları	62
3.7.	Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları.....	64
3.7.1.	Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları	64
3.7.2.	Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları	65
4.	TARTIŞMA.....	66
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
6.	KAYNAKLAR	78
7.	EKLER	97
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisinin Türkiye'deki doğal yayılış alanı (www.tubives.com).....	5
Şekil 1.2. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisine ait bir görünüm (Aşağıözlüce Köyü, Kelkit, Gümüşhane, 19.05.2017)	6
Şekil 1.3. Moleküler oksijenin dört- ve bir- elektron mekanizmasıyla indirgenmesi (Lushchak, 2014).....	8
Şekil 1.4. Biyolojik sistemlerde değişken ROT düzeyi (Lushchak, 2014)	10
Şekil 1.5. Oksidatif stres hasarı (Özcan vd., 2015)	11
Şekil 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması (Pisoschi ve Pop, 2015).....	13
Şekil 1.7. Fenol yapısı	17
Şekil 1.8. Flavonoid molekülünün temel yapısı	18
Şekil 1.9. Fenolik asitlerin temel yapısı (hidroksi benzoik asit ve sinnamik asit)	20
Şekil 2.1. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisine ait herbaryum örneği	31
Şekil 2.2. Ekstraksiyon öncesi hazırlık çalışmaları	32
Şekil 2.3. Ekstraksiyon işlemi	33
Şekil 2.4. İnkübasyon sonrası bakteri ve maya bulunan petrilerin son durumu.....	37
Şekil 2.5. İnkübasyon sonrası küf bulunan petrilerin son durumu	37
Şekil 2.6. Toplam fenolik madde miktarı için gallik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği	39
Şekil 2.7. Toplam flavonoid madde miktarı için kuersetin ile hazırlanan standart eğri grafiği	40
Şekil 2.8. Toplam antioksidan kapasite için askorbik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği	41
Şekil 2.9. Toplam antioksidan kapasite için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği	42
Şekil 2.10. ABTS radikali giderme aktivite tayini için askorbik asit ile hazırlanan standart grafiği.....	43

Şekil 2.11.	ABTS radikali giderme aktivite tayini için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği.....	44
Şekil 2.12.	Kloroform ekstresi konsantrasyonları % inhibisyon grafik eğrisi	45
Şekil 2.13.	DPPH radikali süpürme aktivite tayini için askorbik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği	46
Şekil 2.14.	DPPH radikali süpürme aktivite tayini için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği.....	47
Şekil 2.15.	HPLC analizinde kullanılan standart kromotogramı.....	48
Şekil 2.16.	Disk difüzyon yöntemi aşamaları.....	50
Şekil 2.17.	Seri dilüsyon işlemi.....	51
Şekil 3.1.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin gallik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları	54
Şekil 3.2.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin kuersetine eşdeğer toplam flavonoid madde miktarları	55
Şekil 3.3.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin askorbik asite eşdeğer toplam antioksidan kapasite sonuçları	56
Şekil 3.4.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer toplam antioksidan kapasite sonuçları.....	57
Şekil 3.5.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin askorbik asite eşdeğer antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları	58
Şekil 3.6.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları.....	59
Şekil 3.7.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin ve standartların ABTS radikali giderme aktivitesine ilişkin IC ₅₀ değerleri	59
Şekil 3.8.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin askorbik aside eşdeğer antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları	61
Şekil 3.9.	Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları.....	61

Şekil 3.10. Farklı çözücülerle hazırlanmış <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait ekstrelerin ve standartların DPPH radikali süpürme aktivitesine ilişkin IC ₅₀ değerleri.....	62
Şekil 3.11. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> 'ya ait etil asetat ekstresinin HPLC kromotogramı	63



TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar.....	23
Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve gereçler.....	29
Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarf malzemeler	30
Tablo 2.3. Yumru ekstralarında toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler.....	38
Tablo 2.4. Yumru ekstralarında toplam flavonoid madde tayini için yapılan pipetlemeler.....	39
Tablo 2.5. Yumru ekstralarında toplam antioksidan kapasite tayini (fosfomolibdat) için yapılan pipetlemeler	41
Tablo 2.6. Yumru ekstralarında ABTS radikali giderme aktivite tayini için yapılan pipetlemeler.....	43
Tablo 2.7. Kloroform ekstresine (K) ait absorbans ve % inhibisyon değerleri.....	45
Tablo 2.8. Yumru ekstralarında DPPH radikali süpürme aktivite tayini için yapılan pipetlemeler.....	46
Tablo 3.1. <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisi yumrularının ekstre verimleri ve çözümlerin polarite dereceleri.....	53
Tablo 3.2. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı sonuçları.....	54
Tablo 3.3. Ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları	55
Tablo 3.4. Ekstrelerin toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat) sonuçları	56
Tablo 3.5. Ekstrelerin antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları ve IC ₅₀ değerleri.....	58
Tablo 3.6. Ekstrelerin antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları ve IC ₅₀ değerleri.....	60
Tablo 3.7. Etil asetat ekstresinin fenolik bileşen içeriği.....	63
Tablo 3.8. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon) sonuçları.....	64
Tablo 3.9. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (MİK) sonuçları.....	65

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAE	: Askorbik asit eşdeğeri
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
A _{Ekstre}	: Yumru ekstresinin absorbans değeri
A _{Kontrol}	: Kontrol absorbans değeri
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BSM	: Bitkisel sekonder metabolitler
CAT	: Katalaz
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
EA	: Etilasetat ekstresi
ETZ	: Elektron transport sistemi
EÜ	: Ege Üniversitesi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GÜ	: Giresun Üniversitesi
H	: Hekzan ekstresi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO•	: Hidroksil radikali
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
K	: Kloroform ekstresi
KF	: Kloramfenikol antibiyotiği
M	: Metanol ekstresi
MHA	: Müller Hinton Agar
MHB	: Müller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NO ⁻	: Nitrik oksit
NRRL	: Kuzey Bölgesel Araştırma Laboratuvarı
O ₂ ⁻	: Süper oksit anyon radikali / Singlet oksijen
OH ⁻	: Hidroksil anyonu
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
PDA	: Potato Dekstroz Agar
QE	: Kuersetin eşdeğeri
RNA	: Ribo Nükleik asit
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri

ROT : Reaktif Oksijen Türleri
RP : Relative polarity, Göreceli polarite
RP-HPLC : Ters Faz Kromatografisi
RSKK : Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu
SM : Sekonder metabolitler
SOD : Süperoksit dismutaz
spp. : Türler
subsp. : Alt tür
TE : Troloks eşdeğeri
UV : Ultra viyole
YETEM : Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Dünyada kapalı tohumlu bitkilere ait tür sayısının yaklaşık 422 bin civarında olduğu, bu bitkilerden 72 bin tanesinin de tedavi edici amaçlarla kullanıldığı ifade edilmektedir. Dünya çapında popüler olan tıbbi bitki sayısının 4-6 bin, ticareti yapılan tür sayısının ise 3 bin olduğu belirtilmektedir (Schippmann vd., 2006). Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre farklılık göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i tedavi amaçlı olarak doğrudan bitkisel ürünlerden faydalanmakta, bu oran Asya, Afrika ve Orta Doğu'nun bazı ülkelerinde %95'e kadar çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bu oranın daha az olduğu görülmekle birlikte tıbbi bitkilerin en önemli ticaret merkezleri de Almanya, ABD, Japonya ve İngiltere'de bulunmaktadır (Titz, 2004). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre günümüzde kullanılan farmasötik ilaçların %25'i tıbbi bitkilerden imal edilmektedir. Dolayısıyla gelişmiş ülkeler bitkisel kökenli ilaçları geleneksel tıp uygulamalarına dahil ederken, gelişmekte olan ülkeler halen bitkileri doğrudan kullanmaktadır (Acıbuca ve Budak., 2018).

Ülkemiz farklı coğrafik, ekolojik ve iklimsel özelliklere sahip olması nedeniyle bitki çeşitliliği açısından oldukça zengindir (Tan, 2010). Nitekim Avrupa'da görülen 11.6 bin kadar bitki türünün %75'i Türkiye'de 9.5 binin üzerinde taksa ile temsil edilmekte ve bunların 3 bininin endemik olduğu bilinmektedir (Ekim vd., 2000). Ülkemizde tıbbi olarak kullanılan bitkilerin neredeyse tamamı doğadan temin edilmekte olup, sayısının 500 civarında olduğu tahmin edilmektedir (Sarı ve Oğuz 2000; Karik ve Öztürk, 2009).

Orchidaceae (Orkidegiller), kapalı tohumlu bitkiler içinde 750-800 cins ve 25-35 bin tür sayısı ile en geniş familyaya sahip gruplardan biridir. Antarktika ve sıcak çöller hariç dünyanın hemen hemen her bölgesinde orkidelere rastlanılmakla birlikte orkideler, tropik ve subtropik bölgelerde çeşitlilik ve sayıca üstünlük göstermektedir. Orkideler şüphesiz dikkat çekici ve eşsiz çiçeklere sahip süs bitkileridir (Das ve Bhattacharjee, 2006). Tıbbi kullanımlarından ziyade daha çok bu özellikleri ile bilinmektedir. Ancak orkidelerin farklı kısımlarından tedavi edici niteliklere sahip bileşikler elde edildiği raporlanmıştır (Jahromi vd., 2018, Diengdoh vd., 2019; Rykaczewski vd., 2019). Bu bileşiklerin antimikrobiyal antioksidan, antitümör, antienflamatuar, antidiyabetik, nöroprotektif, antialerjik

özelliklerinden bahsedilmektedir (Maridass ve GhanthiKumar 2008; Hossain, 2009; Kala ve Senthilkumar, 2010; Marasini ve Joshi, 2012; Bhattacharjee ve Islam, 2015; Biswas vd., 2016; Schuster vd., 2016; Bose vd., 2017; Auberon vd., 2018). Elde edilen bilimsel veriler, başta Asya ülkelerinde olmak üzere çok sayıda farklı orkide türünün terapötik amaçlarla geleneksel kullanımlarını desteklemektedir. Dünya genelinde orkidelerin kök, gövde, rizom, yalancı yumru (pseudobulb), yumru, yaprak, çiçek gibi farklı bitki kısımlarının veya tümünün tüberküloz, göğüs ağrısı, astım, ishal, çıban, iltihap gibi çok farklı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı görülmektedir (Hossain, 2011). Fakat bilimsel anlamda orkidelerin tıbbi etkilerini ortaya koyan ve orkidelerde bulunan bileşenler hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle orkidelerle tıbbi uygulamaların kabul görmesi için içeriğinde bulunan bileşenlere ilişkin daha çok çalışma yapılması gerekmektedir (Cribb vd., 2009).

Bitkiler, yapı ve fonksiyonları farklı olan çok sayıda kimyasal madde üretmektedir. Primer metabolitlerin yanı sıra, bitkilerde temel büyüme ve gelişme için doğrudan gerekli olmayan fakat biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı çevresel uyumda görev alan sekonder metabolitler (SM), faydalı bileşiklerin eldesinde kullanılmakta ve biyoteknolojinin yeni bir alanını oluşturmaktadır (Oskay ve Oskay, 2009; Nascimento ve Fett-Neto, 2010; Efferth, 2019). Bu kapsamda çok sayıda bilim insanı, çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere bitkilerden izole edilen SM'nin yapı ve biyolojik aktivitelerini ortaya koyan çalışmalara yönelmektedir (Oskay D. ve Oskay M., 2009; Singh vd., 2018; Khan vd., 2019). Günümüz teknolojisi ile bitkilerdeki SM'nin bilimsel olarak tanımlanması ve içeriklerinin belirlenmesi, özellikle sağlık ve gıda endüstrisinde talep gören ham madde ihtiyacının karşılanması için önem arz etmektedir. Bunun yanında biyoteknolojinin başka bir alanı olan sekonder metabolitlerin bioreaktörler aracılığıyla, in vitro bitki doku kültürü çalışmaları ile endüstriyel ölçekte üretilmesine odaklanılmaktadır. Dolayısıyla bitkilerdeki SM'nin tanımlanması, bitki biyoteknolojisinde hücre ve doku kültürü uygulamalarının temel alanlarından biri olan sekonder metabolit üretimi çalışmalarına ışık tutmakta ve yeni biyoteknolojik çalışmalara öncülük etmektedir (Topçu ve Çölgeçen, 2015; Efferth, 2019; Thakur vd., 2019).

Vücudumuzda doğal süreçte çeşitli reaksiyonlar sonucunda toksik etkileri olan serbest radikaller meydana gelmektedir. Bu radikaller, canlı dokularda doku bütünlüğünün ve fonksiyonlarının normal düzeylerde sürdürülmesi için çeşitli enzimler, endojen maddeler ve A, C, E vitaminleri gibi diğer antioksidan savunma sistemlerince nötralize

edilmektedir (Urso ve Clarkson, 2003). Ancak bunun yanında tüketilen gıda maddeleri, hava kirliliği, tütün ürünleri, iyonize radyasyon, kızılötesi ışınlar, ilaçlar ve zararlı kimyasallar gibi eksojen kaynakların da serbest radikal üretimini önemli ölçüde tetiklediği bilinmektedir (de Zwart vd., 1999; Singh vd., 2004; Vinson, 2006). Normal şartlarda vücudumuzda oksidan ve antioksidanlar arasında bir denge bulunmaktadır. Fakat sayılan sebepler nedeniyle belirli bir düzeyin üzerine çıkan serbest radikaller mevcut dengeyi bozarak antioksidan savunma sistemlerini yetersiz kılmakta ve oksidatif strese sebep olmaktadır. Oksidatif stres, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimleri bozarak olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu etkileri bertaraf etmek için vücuda dışarıdan antioksidanların alınması gerekmektedir (Valko vd., 2006). Bu kapsamda yeterli miktarda antioksidan alımı ile serbest radikallerin artışıyla doğrudan ilişkili olan hastalıklardan kurtulmak mümkün olabilir. Dolayısı ile oksidan kaynaklı hastalıkların görülme riskini azaltmak, daha kaliteli ve uzun yaşam için antioksidanlar önemli bir savunma mekanizması olarak tavsiye edilmektedir (Kasapçopur ve Birdane, 2014; Karabulut ve Gülay, 2016). Bilimsel çalışmalar, sentetik antioksidanların toksik etkileri nedeniyle özellikle fenolik bileşikler içeren bitkisel kaynaklı antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Okan vd., 2014).

Son yıllarda mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve bunları yeni üyelerine aktarmaktadırlar. Bu durum, bir yandan kullanılan antibiyotiklerin kullanım ömrünü sınırlarken, öte yandan da enfeksiyonel hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejiler geliştirme zorunluluğunu gündeme getirmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Bu arayış içerisinde, bitki temelli antimikrobiyal bileşenler, terapötik potansiyel ile zengin bir alternatif sunmaktadır (Iwu vd., 1999). Bitkilerin ürettiği sekonder metabolitler, çoğunlukla fenolik ve onların oksijen bağlı türevlerinden oluşmaktadır (Cowan, 1999). Dünya genelinde çok sayıda metabolit yaklaşık 400 binden fazla bitki türünden elde edilmektedir (Zhong, 2011). Şimdiye kadar tanımlanan 100 bin adet bitkisel sekonder metabolit doğada bulunanların tahminen sadece %10'unu teşkil etmektedir (Zhong, 2011; Ashraf vd., 2018). Bu nedenle, antimikrobiyal etkinliğe sahip bitkisel sekonder metabolitlerin keşfedilmesine yönelik çalışmalar bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur (Jamwal vd., 2018; Takshak ve Agrawal, 2019).

Gümüşhane İli Kelkit İlçesi Ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunmasına rağmen Doğu Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleri arasında geçiş iklimine sahiptir. Her

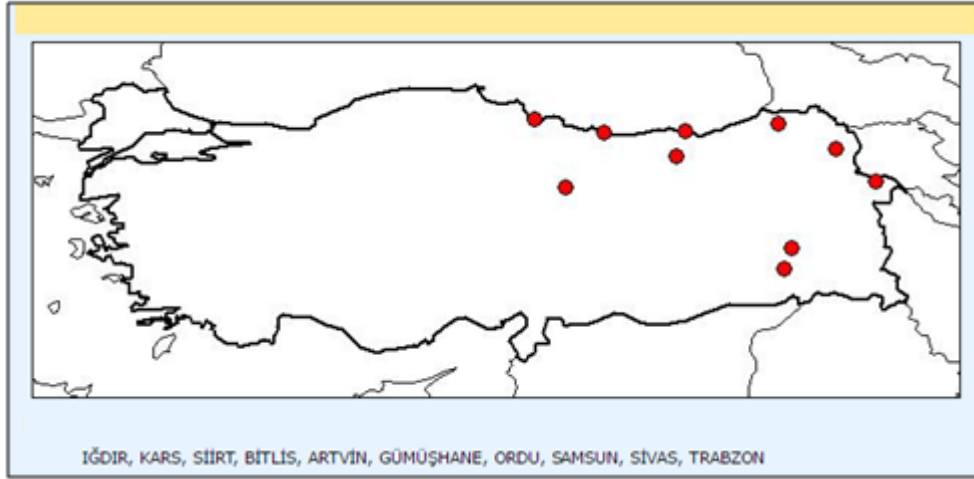
iki bölgenin iklim özelliğini taşıyan Kelkit'te yaz ayları sıcak ve kurak, kış ayları soğuk, ilkbahar ve sonbahar ayları oldukça yağışlı geçmektedir. İlçenin denizden yüksekliği 1150-2746 m aralığındadır. İlçenin coğrafi konumu ve iklimsel özellikleri nedeniyle bitki çeşitliliği oldukça fazladır (Korkmaz ve Karakurt, 2014). Öyle ki Ülkemizde bulunan 144 "Önemli Bitki Alanı" ndan üçü (Sipikor Dağı, Pöske Dağı, Karadağ) Kelkit çevresinde yer almaktadır. Kelkit'te yapılan floristik çalışmalarda 137'si endemik olan 1010 farklı bitkinin yayılış gösterdiği belirtilmektedir (Kandemir vd., 2012). Bitkilerin ekstrem koşullarda sekonder metabolit ürettiği bilinmektedir (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Bu nedenle çalışmamızda kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesine ait yumruların sekonder metabolit içeriğinin yüksek olabileceği düşünülmektedir.

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, halk arasında geleneksel yöntemlerle kaynatılıp kurutulmuş tedavi amacıyla kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesine ait yumruların; toplam fenolik ve flavonoid madde miktarının tespiti, toplam antioksidan kapasitesi, antioksidan aktivitesi, fenolik madde içeriği ve ayrıca antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde 'Salepgiller' olarak bilinen orkidelerin daha çok salep kalitesini belirleyen glikomannan içeriği ve salep eldesi için kültüre alınması çalışmalarına rastlanmaktadır. Ancak, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren çok sayıda orkide türü olmasına rağmen, orkidelerin biyolojik aktiviteleri üzerine çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu bakımdan, elde ettiğimiz bulgular, literatürdeki boşluğun giderilmesi ve yerel halkın geleneksel kullanımının biyoteknolojik bir bakış açısıyla ele alınması oldukça değerli görülmektedir. Bu çalışma ile ayrıca, bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle, alternatif ve doğal bir kaynak olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma, bitkiye ait yumruların, faydalı etkilerinin gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilmesi için yeni ve ileri çalışmalara da öncülük edebilecektir.

1.3. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* Bitkisine İlişkin Genel Bilgiler

Ülkemizde bulunan orkideler, kökleri ile toprağa bağlı olan “Orta Kuşak Orkideleri” veya karasal (terrestrial) orkideler olarak adlandırılmaktadır. Tubives 2017 yılı kayıtlarına göre Türkiye, Orkidegiller ailesine ait 24 cins ve 187 adet takson barındırmaktadır. *Dactylorhiza* cinsi ise ülkemizde tür sayısı bakımından 26 adet ile üçüncü sırada yayılış göstermektedir (Çalışkan, 2018). Çalışmada kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* ince, orta boylu ve yumrulu bir bitkidir (Kreutz, 2009). Yumrularının alt tarafında bulunan parmaklı çıkıntılar nedeniyle halk arasında “Çatal Salep” olarak adlandırılmaktadır (Çalışkan, 2018). Çiçeklenme Mart ayı sonu itibariyle başlamakta, Mayıs ayı sonuna kadar devam etmektedir. Bitkiye ait yumrular Haziran-Temmuz aylarında olgunlaşmakta ve hasat edilmektedir. Ülkemizde *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisi, Karadeniz Dağları’nda, özellikle Zigana Geçidi-Gümüşhane yakınlarında yoğun bir yayılış göstermektedir (Kreutz, 2009). Bunun yanında Iğdır, Kars, Siirt, Bitlis, Artvin Ordu, Samsun, Sivas, Trabzon, Hakkari, Van Gölü’nün çevresi ve Yozgat Akdağmadeni’nde görülmektedir (Şekil 1.1.) (Kreutz, 2009).



Şekil 1.1. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisinin Türkiye’deki doğal yayılış alanı (www.tubives.com)

Dactylorhiza romana subsp. *georgica* alt türünün yayılışı düşük rakımlı bölgelerde azalmakta, 700-2100 m rakım aralığında yoğunluk göstermektedir. *Dactylorhiza romana* türü 1600 m rakımdan sonra kaybolurken, alt türü olan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bu yüksekliklerde en geniş yayılışa sahiptir (Altındağ vd., 2012). Bu orkideler,

seyrek çam ve köknar ormanları, çalılışmış meşelikler gibi gölgeli yetişme ortamlarını tercih etmektedir. Genellikle nemli bölgelerde çam ormanları içerisinde aynı alt türe ait sarı ve mor bireyler dağınık halde yaşamaktadır (Şekil 1.2.) (Kreutz, 2009).



Şekil 1.2. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisine ait bir görünüm (Aşağıözlüce Köyü, Kelkit, Gümüşhane, 19.05.2017)

Farklı kaynaklara göre değişmekle birlikte ülkemizde *Dactylorhiza* cinsinin de aralarında bulunduğu 154 adet orkide taksonunun ürettiği yumrular halk tarafından salep olarak kullanılmaktadır (Çalışkan, 2018). Ticari anlamda kaliteli bir salebin glikomannan oranının %40 olması beklenmektedir. Bu bitkiye ait yumruların %48.54 glikomannan içeriği ile ülkemizin farklı yörelerinden toplanılan 20 adet salep orkidesine göre en yüksek orana sahip olduğu bildirilmektedir (Şen, 2016). Bu nedenle çalışmada kullanılan bitkiye ait salep yumrularının ticari değeri oldukça yüksektir.

1.4. Bitki Seçimi

Bitkinin toplum tarafından nasıl kullanıldığıнын bilinmesi son derece önemlidir. Bir farmakolojik çalışmada bitki seçiminde kullanılan en yaygın yöntem etnobotanik olarak adlandırılan farklı kültürlerdeki doğal kaynakların kullanımının dikkatle incelenmesidir (Güder, 2008).

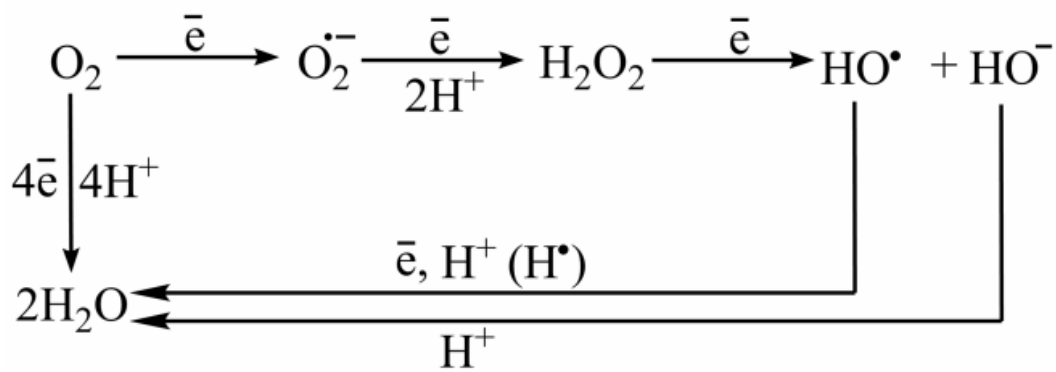
Orkidelere ait yumrular yara, çıban ve iltihap iyileştirici olarak kullanılmakta; tüberküloz, kanser, Parkinson ve bağırsak hastalıklarının tedavisinde yumruların faydalanılmaktadır (Kashani vd., 2012; Korkmaz ve Karakurt, 2015). Bunun yanında yumruların vücuda kuvvet verici, kalbi kuvvetlendirici, zihin yorgunluğunu giderici özelliklerinden bahsedilmektedir (Sezik, 2002; Giri vd., 2012). Bu çalışmada kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisine ait yumrular Gümüşhane Kelkit yöresindeki yerel halktan edinilen bilgiye göre; balgam söktürücü, göğüs yumuşatıcı özellikleri nedeniyle soğuk algınlıklarına karşı sıcak bir içecek olan salep yapımında, toz halinde ishali önleyici olarak, yara ve çıban tedavisinde kullanılmaktadır. Yukarıda bahsedilen kullanımları nedeniyle, bu çalışmada incelenen yumruların, vücuttaki oksidatif stresi, dokularda ve üst solunum yollarında enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların etkinliğini azaltabileceği düşünülmüştür. Bu durum *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisinden antioksidan ve antimikrobiyal özellikteki maddelerin elde edilebileceği yönünde fikir edindirmiştir. Öte yandan salep kalitesi açısından ticari değeri yüksek olan yumruların antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin ortaya konulması bu bitkiye ilave katma değer sağlayacaktır.

1.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran, yüksek enerjiye sahip atom veya moleküller olarak tanımlanırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1985; Bast vd., 1991; Nawar, 1996). Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurmaları nedeniyle diğer bileşenlerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Elektronlarını çiftler halinde bulunduran atomlar veya moleküller ise kararlı bir yapıya sahip olduklarından, başka moleküller ile reaksiyonlara girme eğilimleri serbest radikaller kadar yüksek değildir (Halliwell, 1999; Valko vd., 2007). Çoğu durumda serbest radikaller

ve reaktif oksijen türleri (ROT) terimleri birbirlerinin yerine kullanılır. Ancak bu kullanım her zaman doğru değildir. Bu iki kullanım arasındaki fark aşağıda açıklanmıştır.

Aerobik koşullar altında canlı organizmalarda tüketilen oksijenin %90'dan daha fazlası elektron transport zincirinde (ETZ) sitokromoksidaz aracılığıyla doğrudan suya dönüşür. Bu durum ROT salınımı olmadan dört-elektron mekanizması yardımıyla gerçekleşir (Ott vd., 2007; Skulachev, 2012). Ökaryot canlılarda ETZ bileşenleri mitokondriyal membranda bulunur. ETZ operasyonuna ATP formunda enerji üretimi için oksidatif fosforilasyon eşlik eder. Tüketilen oksijenin %10'undan daha azı, moleküler oksijenin bir elektron alması ile indirgenerek süper oksit anyon radikallerine (O_2^-) dönüşür. Bunu takiben (O_2^-) 'nin iki proton kabul etmesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Bu bileşik serbest radikal değildir, ancak kimyasal olarak moleküler oksijenden çok daha aktiftir. Bundan dolayı ROT grubundandır. Hidrojen peroksit molekülü bir elektron daha kabul ettiğinde hidroksil radikaline (HO^\bullet) ve hidroksil anyonuna (HO^-) ayrılır. Son olarak HO^\bullet bir elektron ve bir proton daha aldığında su oluşur (Lushchak, 2014). Bu oksidatif türler normal metabolik yan ürünlerdir (Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015). Biyolojik sistemlerde bu reaksiyon, protein ve lipid gibi farklı bileşenlerden hidrojen atomunu ayırması nedeniyle zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Özetlemek gerekirse; O_2^- , H_2O_2 ve HO^\bullet reaktif oksijen türleri olarak adlandırılırlar. Fakat H_2O_2 serbest radikal değilken, sadece O_2^- ve HO^\bullet serbest radikallerdir. Yukarıda anlatılan tüm reaksiyonlar Şekil 1.3'te şematize edilmiştir (Lushchak, 2014).



Şekil 1.3. Moleküler oksijenin dört- ve bir- elektron mekanizmasıyla indirgenmesi (Lushchak, 2014)

Reaktif oksijen türlerinin yanısıra lipid, protein ve nükleik asit peroksidleri gibi çeşitli peroksidler de vardır. Ayrıca nitrik oksit, peroksinitrit ve ilgili bileşikler gibi nitrojen içeren reaktif türler (RNT) de bulunmaktadır (Lushchak, 2014). Biyolojik sistemlerde oluşan RNT'nin en önemlisi nitrik oksittir (NO^\cdot). NO^\cdot damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. Nitrik oksitin vücuttaki reaktif oksijen türleri ile tepkime vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOO^\cdot) oluşturduğu ve bunun da ilerleyen tepkimelerle HO^\cdot radikali oluşturduğu ifade edilmektedir (Rayner vd., 2009). ROT ve RNT'nin düşük düzeyleri, patojen mikroorganizmalara karşı savunma mekanizması ve hücreler arası haberleşme gibi biyolojik etkiler gösterirken, yüksek derişimleri DNA, lipid ve proteinlerde hasara, hatta hücre ölümlerine neden olur (Brown ve Borutaite, 2001).

1.6. Oksidatif Stres

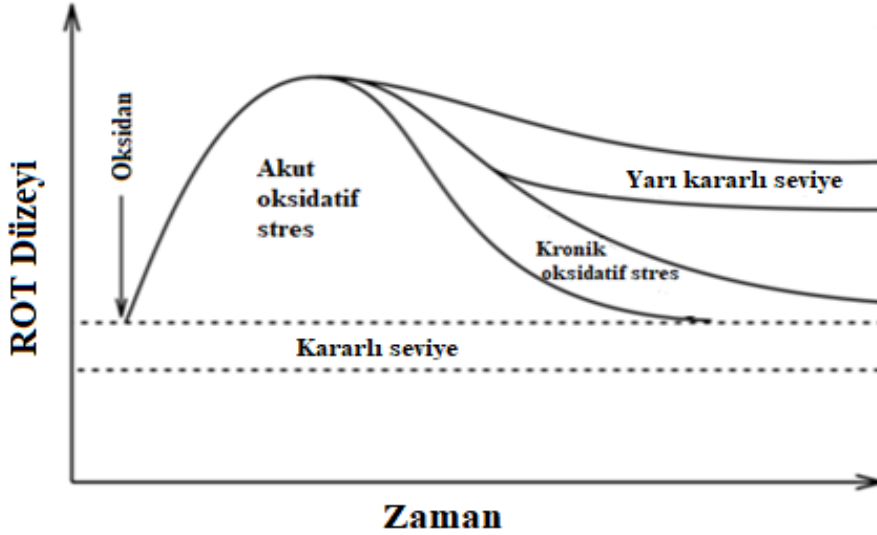
Yaşayan organizmalar reaktif oksijen türlerini bünyelerinde regüle eden sistemlere sahiptir. Bu sistemler reaktif oksijen türlerini çok düşük düzeylerde tutarak bir denge sağlar. Ancak bu denge aşağıdaki koşulların birinde veya daha fazlasının kombinasyonlarında bozulabilir.

- Endojen ve eksojen bileşenlerin artışıyla otooksidasyonun başlaması ve ona eşlik eden ROT üretimi,
- Düşük molekül ağırlıklı antioksidan rezervlerinin tükenmesi,
- Antioksidan etki gösteren enzimlerin inaktivasyonu,
- Antioksidan etki gösteren enzimlerin ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanların üretiminin azalması.

ROT üretimi ve eliminasyonu arasındaki dengesizlik sonucu ROT seviyesindeki artış, tümünü olmasa bile birçok yaşam prosesini etkileyebilir. Bu artışın sonuçları, ROT seviyesine ve üretiminin gerçekleştiği yere, antioksidan sistemlerin etkinliğine, enerji kaynaklarının kullanılabilirliğine ve etkileşimde bulunduğu hücrel hedeflere bağlı olarak değişir (Sies, 1985; Sies, 1997).

ROT seviyesi, normal şartlar altında ROT üretimi ve eliminasyonu arasındaki uyum ile birlikte belli bir aralıkta (kararlı hal seviyesi “steady state level”) dalgalanma gösterir. Oksidanların girişi gibi bazı nedenlerden dolayı ROT seviyesi hızlı bir şekilde artabilir ve

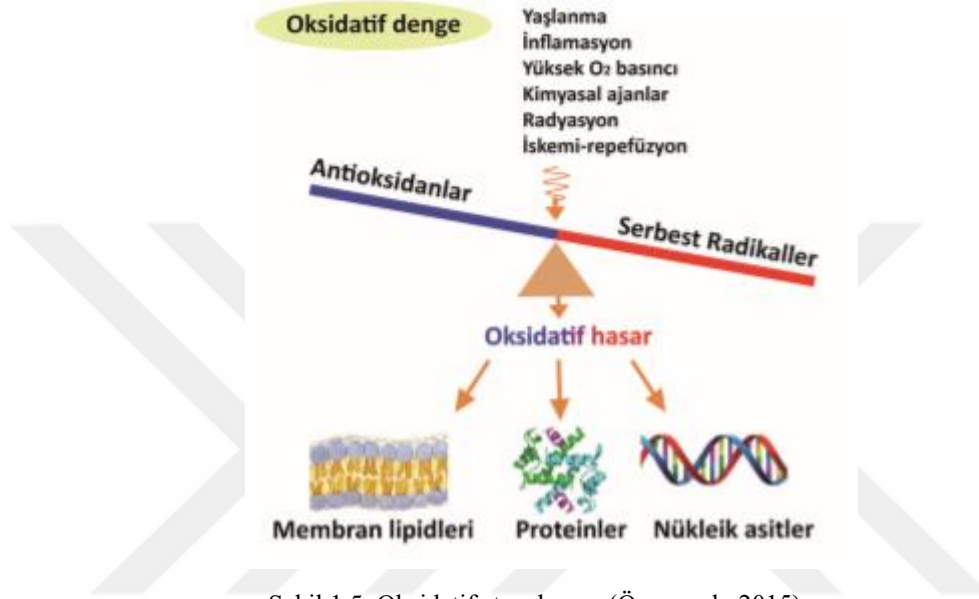
kararlı hal seviyesinden ayrılabilir. Eğer antioksidan sistemler, artan ROT miktarını elimine edebilirse, bu seviye başlangıçtaki seviyeye geri döner. Bu olay ‘akut oksidatif stres’olarak tanımlanır. Burada şunun altı çizilmelidir ki; ROT seviyesinin belli bir süre yüksek kalması oksidatif stresin gelişimi için yeterli değildir. Ancak bazı fizyolojik değişikliklere neden olabilir. Oksidatif stresin gelişimini engelleyen; antioksidanlar ve süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz gibi enzimlerin ekspresyonundaki artıştır. (Dempfle, 1991; Lushchak, 2011a). Bazı durumlarda hücre, antioksidanların ve ilgili enzimlerin artan ekspresyonu ile dahi ROT miktarını nötralize edemez ve başlangıçtaki kararlı hal seviyesine çekemez. Böylece, artan ROT seviyesi kararlı hale gelebilir ve farklı hücrenel komponentlerin modifikasyonunu artırarak homeostaziyi önemli derecede bozabilir. Bu durum ‘kronik oksidatif stres’olarak adlandırılır. Son olarak organizmadaki fizyolojik durum değişiklikleri ile birlikte ROT seviyesi başlangıç seviyesine dönemez ve yarı kararlı seviyede “quasi-stationary level” sabitlenir. Bu durumda reaktif oksijen türleri de dahil olmak üzere tüm homeostazinin yeniden düzenlenmesi gerekir (Lushchak, 2011a, 2011b). Oksidatif strese ilişkin süreç Şekil 1.4’te şematize edilmiştir (Lushchak, 2014).



Şekil 1.4. Biyolojik sistemlerde değişken ROT düzeyi (Lushchak, 2014)

Oksidatif stresteki artış sonucunda oluşan ROT, hücre içi lipid ve protein yapılarının çift bağ içeren gruplarına ve DNA’daki bazların çift bağlarına saldırır ve bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Böylece hücre içi lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllerin hasarlanarak hücre zedelenmesi veya hücre

ölümlerine neden olur. Şekil 1.5'te oksidatif stres hasarı şematize edilmiştir (Özcan vd., 2015). Kronik oksidatif stres; kanser (Leinonen vd., 2014; Townsend vd., 2014), diyabet (Drel vd., 2010; Yan, 2014), kardiyovasküler (Feoli vd., 2014; Mei vd., 2014), ve nörodejeneratif (Ahmad vd., 2014; Zhang ve Tian, 2014) hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinden sorumludur.



1.7. Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile DNA, protein ve lipid gibi substratların oksidasyonunu önleyebilen veya geciktirebilen moleküllerdir (Halliwell, 1990). Antioksidanlar serbest radikallere olan yüksek afiniteleri nedeniyle, serbest radikallerin sayılarını azaltır. Böylece hücre içi oksidan/antioksidan dengenin sürdürülebilmesini sağlarlar (Casas-Grales ve Muriel, 2015).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da bazı mekanizmalar ile çoğalmalarını önleyen faydalı etkileri nedeniyle kullanılırlar. Bu mekanizmalar;

- Oksidasyonu başlatan yüksek reaktivite gösteren türlerin süpürülmesi,
- Biyolojik moleküllerin oksidasyonunu katalizleyen ve ROT üretimindeki indirgeme reaksiyonlarına katılan metal iyonlarının şelatlanması,
- ROT'un öncüsü olan singlet oksijenin (O_2^-) sönmülmesi,

- ROT'un çoğalmasını önleyerek oksidatif zincirin kırılmasıdır (Nawar, 1996; Brewer, 2011).

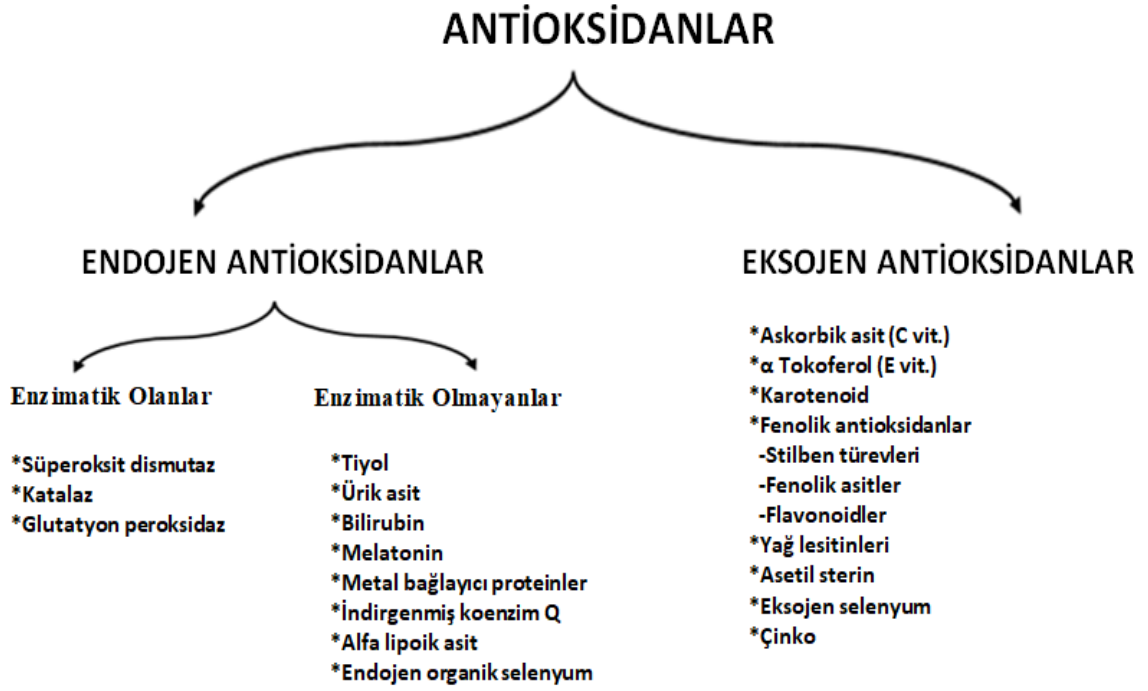
Antioksidanların etkinliği; yapısal özelliklerine, fiziksel konumlarına, aktivasyon enerjilerine, indirgeme potansiyellerine, uçuculuk ve ısıya duyarlılıklarına bağlı olarak değişir. En iyi antioksidanlar, zincir reaksiyonlarının çoğalmasını engelleyen antioksidanlardır. Aromatik ve fenolik halka içeren antioksidanlar, bir hidrojen atomu alma kabiliyetleri ile serbest radikallerin aktivitesini azaltmaları nedeniyle en iyi potansiyel süpürücülerdir (Brewer, 2011).

1.7.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar farklı kriterlere göre; birincil ve ikincil, enzimatik ve enzimatik olmayan, önleyici ve tamir edici, endojen ve eksojen, suda çözünebilir ve yağda çözünebilir, doğal ya da sentetik olarak sınıflandırılabilir (Pisoschi ve Pop; 2015).

Antioksidanlar, oksidasyon zinciri reaksiyonundaki etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Oksidasyon zinciri reaksiyonundaki rollerine göre, birincil (zincir-kırıcılar) ve ikincil (önleyici) olarak sınıflandırılır. Birincil bileşenler olarak antioksidanlar, reaksiyonların başlangıç ve ilerleme aşamaları boyunca oluşan serbest radikallerin önlenmesi veya eliminasyonu için hidrojen atomu transfer eder ya da elektron alırlar. Böylece rezonans yardımıyla reaktif türleri inaktive ederler. Antioksidanlar; oksidasyonu katalizleyen demir, bakır gibi metal iyonları ile bileşik yaparak, primer antioksidanlardaki hidrojen ile yer değişimi sağlayarak, glukozoksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler vasıtasıyla oksijeni yakalayıp singlet oksijeni deaktive ederek, UV ışınını absorbe ederek ve hidrojen peroksitleri parçalayarak, oksidasyon hızını yavaşlatan ikincil görevi üstlenirler (Reische vd., 2002; Wanasundara ve Shahidi, 2005; Angelo ve Jorge, 2007).

Antioksidanlar oksidatif stres açısından değerlendirildiğinde endojen ve eksojen antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir (Pisoschi ve Pop; 2015). Yapılan sınıflandırma Şekil 1.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 1.6. Antioksidanların sınıflandırılması (Pisoschi ve Pop, 2015)

1.7.1.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar (Cheeseman ve Slater, 1993).

- **Enzimatik antioksidanlar**

Süperoksit dismutaz (SOD): SOD süperoksit radikal anyonunu hidrojen peroksite dönüştürerek oksidasyonu geciktiren savunma sistemi enzimleridir. Memeli dokularında üç farklı tipi vardır. Bunlar; sitozollerde bulunan bakır-çinko içeren süperoksit dismutaz (SOD1), mitokondriyal matrikste bulunan mangan içeren süperoksit dismutaz (SOD2) ve hücre dışı süperoksit dismutazlardır (SOD3). Her üçü de sağlıklı böbreklerin tübüllerinde yüksek düzeyde sentezlenir (Ghezzi vd., 2005; Sung vd., 2013).



Katalaz (CAT): CAT hidrojen peroksiti suya dönüştüren savunma sistemi enzimleridir. Genellikle hücre, doku ve organlarda, yüksek konsantrasyonlarda karaciğer ve eritrositlerde sentezlenir (Sung vd., 2013).



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizleyen, suya ve çeşitli alkollere dönüştüren selenyum içerikli savunma sistemi enzimleridir (Dröge, 2002).



- **Enzimatik olmayan antioksidanlar**

Tiyol: Tiyoller hemen hemen bütün fizyolojik oksidanlarla etkileşimde bulunarak görev yapan esansiyel antioksidan tamponlardır (Sung vd., 2013).

Ürik asit: Ürik asit singlet oksijen, peroksil ve hidroksil radikallerini süpürücü etkiye sahiptir. Eritrosit membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olarak görev yapar (Frei vd., 1981).

Bilirubin: Bilirubin hücre koruyucu bir aktivite gösterir. Birçok hücrede ROT'un konsantrasyonunu düşürür (Sedlak vd., 2009). Lipofilik bilirubinler membran lipidlerinin peroksidasyonunu önlerler (Baranano vd., 2002).

Melatonin: Melatoninler, süperoksit anyon radikallerini, hidroksil radikallerini ve nitrik oksitleri süpürücü etkiye sahiptir. Mitokondriyal oksidatif strese karşı çok iyi koruyuculardır (Poeggeler vd., 1994; Arnao ve Harnandez-Ruiz, 2006; Lowes vd., 2013).

Metal bağlayıcı proteinler: Transferrin, ferritin, laktoferrin, seruplazmin ve albumin bu gruba dahil enzimatik olmayan antioksidanlardandır. ROT'un çoğunun oluşumundan sorumlu olan geçiş metal iyonlarını bağlayarak antioksidan etki gösterirler (Sung vd., 2013).

İndirgenmiş Koenzim Q: İndirgenmiş Koenzim Q elektron transport zincirinde Vitamin C ve E ile birlikte elektron taşıyıcısı olarak görev yapar. Hücresel membran ve plazma lipoproteinlerini oksidatif hasara karşı korur (Beyer, 1992; Beyer, 1994).

1.7.1.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar, C vitamini, E vitamini, karotenoidler, fenolik antioksidanlar, yağ lesitinleri, asetilsisteinler, eksojen selenyum ve çinko olarak gruplandırılabilir (Pisoschi ve Pop, 2015). C ve E vitaminleri, karotenoidler ve fenolik bileşikler önemli eksojen antioksidanlardır.

C Vitamini (Askorbik asit): C vitamini hidroksil, alkoksil ve süperoksit anyon radikallerini, reaktif nitrojen türlerini semidehidroaskorbik asit formuna dönüştürerek biyomoleküllerdeki oksidasyonu önler (Descamps-Latscha vd., 2001; Du vd., 2012; Sung vd., 2013).

E Vitamini (α -Tokoferol): E vitamini hücre membranlarındaki lipid peroksidasyonunu önler. Serbest radikalleri düşük reaktiviteli türevlere dönüştürerek radikal zincirlerini durdurur. Böylece lipid substratlarına saldırıyı engeller (Descamps-Latscha vd., 2001; Himmelfarb ve Hakim, 2003).

Karotenoidler (β -Karoten): β -Karoten singlet oksijen radikallerini çok yüksek düzeyde söndürücü etkiye sahiptir. β -Karoten UV ışınlarına karşı koruyucu olup ciltte UV ışınlarının hasarını önler (Huang vd., 2005; Godic vd., 2014).

Fenolik Antioksidanlar: Fenolik asitlerden olan hidroksisinnamik asit türevleri serbest radikallere hidrojen verebilme kabiliyetlerinden dolayı zincir kırıcı antioksidanlar olarak rol oynar (Siquet vd., 2006). Klorojenik asit, kuinik ve kafeik asitin esterleri en güçlü serbest radikal süpürücülerindedir (Matsuzoe vd., 1999; Dias, 2012) Buldukları maddeye antimutajenik, antimikrobiyal ve antiviral aktivite kazandırır (Matsuzoe vd., 1999).

Flavonoidlerden olan kuersetin, rutin, apigenin ve naringin süperoksit anyon radikallerine karşı antioksidan aktivite gösterir (Yuting vd., 1990, Sichel vd., 1991). Bir antosiyanidin olan nasunin; hidrojen peroksit, hidroksil ve süperoksitleri yakalayarak, muhtemelen demir iyonlarını şelatlayarak Fenton hidroksil radikal üretimini önler (Noda vd., 1998; Frei vd., 2008).

1.8. Bitkisel Sekonder Metabolitler

Dünya genelinde yaklaşık 400 binden fazla bitki türü çok sayıda metabolitin kaynağıdır. Doğal kaynaklardan elde edilen metabolitlerin yaklaşık %80'i ise bitkisel

kökenlidir. Günlük hayatımızda kullandığımız, ekonomik olarak önem taşıyan farmasötiklerin, gıda katkı maddelerinin ve biyopestisitlerin birçoğu bitkilerden elde edilir (Zhong, 2011). Primer metabolitler, fotosentetik yeşil bitkilerin temel hücrel fonksiyonlarını yürütebilmek için sentezlediği karbonhidrat, lipid ve aminoasitlerdir (Delgoda ve Murray, 2017). Bitkisel sekonder metabolitler (BSM), bitkinin çeşitli fizyolojik değişiklikler nedeniyle ürettiği primer metabolitlerin türevleridir. BSM bitki büyümesini teşvik eder ve farklı çevresel stres faktörleri altında bitkinin hayatta kalmasını sağlar. Dolayısıyla bitki hayatında primer metabolitler kadar önemli rol oynar (Kliebenstein, 2013; Zandalinas vd., 2017). Bu bileşiklerin üretimi; bitki türüne, bitkinin fizyolojik ve gelişimsel safhalarına, çevresel faktörlere bağlı olarak değişir ve bitkideki miktarı genellikle bitki kuru ağırlığının %1'inden bile daha azdır (Zheng, 2010). Bitkiler aleminde spesifik taksonomik gruplarla sınırlı yaklaşık 100 bin adet BSM tanımlanmıştır. Biyosentetik yollarla türetilen bitkilerdeki sekonder metabolitler üç ana gruba ayrılır. Bu gruplar; azot içeren bileşikler, terpenler ve fenolik bileşiklerdir (Fang vd., 2011).

Siyanojenik glikozitler, glukosinolatlar ve alkaloidler; azot içeren bileşikler grubunun önemli bir kısmını oluşturur (Facchini, 2001). Özellikle bu gruba dahil olan tıbbi öneme sahip alkaloidler, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların iyileştirilmesinde (Akhgari vd., 2017) ve antimikrobiyal ajan, kas gevşetici, öksürük kesici ve analjezik olarak kullanılmaktadır (Ashraf vd., 2018).

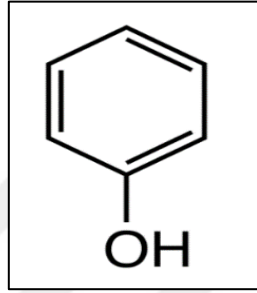
Karotenoidler, isoprenler, mono/diterpenler, absisik asit ve giberellin gibi bitki hormonları, fitol, tokoferoller, filokinonlar, plastokinonlar, polifenoller, brassinosteroidler, steroller ve seskiterpenler terpenler grubuna dahildir. Terpenler; kanobinoid ve flavonoidler ile sinerjistik etki göstererek migren ve baş ağrısı tedavisinde kullanılırlar (Baron, 2018).

Çalışmamız kapsamında fenolik bileşikler irdelendiği için bir sonraki bölümde ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

1.8.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bitkisel sekonder metabolitlerin en önemli sınıflarından biridir (Malcovska vd., 2014). Yapısal olarak fenolik bileşikler Şekil 1.7'de görüldüğü gibi bir aromatik halka, bu halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu taşırlar (Achakzai vd.,

2009; Ali vd., 2013). Fenolik bileşikler bitkilerde büyüme, üreme, çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanım gibi fonksiyonlarda rol oynamak üzere malonik asit yolağı ile sentezlenir (Achakzai vd., 2009; Chaparro vd., 2013; Giménez vd., 2014, Ayoub vd., 2016; Butkhup vd., 2016; Puthur, 2016). Bitkiler özellikle çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıklarında, fenolik bileşik üretimi maksimum seviyeye ulaşır (Achakzai vd., 2009; Verma ve Shukla, 2015). Ürettikleri fenolik bileşikleri; meyve, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulundururlar (Balasundram vd., 2006).



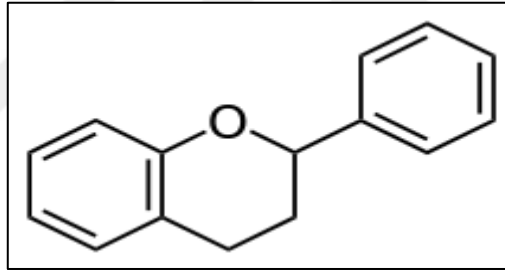
Şekil 1.7. Fenol yapısı

Şimdiye kadar 8 binden fazla farklı bitkisel fenolik bileşik tanımlanmıştır (Naczka ve Shahidi, 2006). Bu fenoliklere devamlı olarak yeni bulunan ve tanımlanan fenolik maddeler eklenmektedir (Harborne ve Williams, 2000). Fenolik bileşiklerin; antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antialerjik, antiaterojenik, antiinflamatuvar, antimutajenik, antikarsinojenik, antiülser ve antitrombotik etki gibi pek çok etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Moure vd., 2001; Balasundram vd., 2006). Birçok ülkede yapılan epidemiyolojik çalışmalarda meyve ve sebze açısından zengin bir diyetin; yaşlanma sürecini geciktirdiği, özellikle kalp damar gibi çeşitli hastalıklar ve kanser, romatoid artrit, akciğer hastalıkları, katarakt, Parkinson veya Alzheimer hastalığı gibi diğer hastalıkların riskini azalttığı belirtilmiştir (Szajdek ve Borowska, 2008; Çağlar ve Demirci, 2017). Bitkisel ürünlerin sağlığa yararlı etkilerinin çoğu, antioksidan etkili fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir (Balasundram vd., 2006). Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi ise yapılarında bulunan hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu gruplar, serbest radikallerin süpürülmesini sağlar (Cueva vd., 2010; Stojković vd., 2013). Fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarında bulunan hidroksil grupları aynı zamanda bakteriler üzerinde inhibe edici etki gösterir ve antimikrobiyal aktivitede önemli rol oynar (Shan vd., 2007; Hayek vd., 2013, Burt, 2014).

Fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler, kumarinler, lignanlar ve ligninler olmak üzere yedi grup altında sınıflandırılır (Pandey ve Rizvi, 2009). Aşağıda bu tez çalışması kapsamında irdelenen flavonoidler ve fenolik asitler ile bu bileşiklerin sağlığa yararlı etkileri anlatılmıştır.

1.8.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler, bugüne kadar 6 binden fazla bileşiği tanımlanmış olan en önemli fenolik bileşikler grubunu oluşturur (Erlund, 2004). Bu sınıfa dahil olan bileşikler flavonoller, flavonlar, flavanoller, flavanonlar, antosiyanidinler, kateşinler ve izoflavonoidlerdir. Hepsi temel difenilpropan genel yapısına sahip olup flavonoid molekülünün temel yapısı Şekil 1.8’de gösterilmiştir. İzoflavonlar, flavoneller, flavonlar ve antosiyaninler bitkilerde gelişim ve böceklere karşı savunma gibi rolleri üstlenen başlıca fenolik bileşiklerdir (Taiz ve Zeiger, 2006).



Şekil 1.8. Flavonoid molekülünün temel yapısı

Flavonoidlerin çeşitliliği kimyasal yapılarındaki farklılıklara bağlıdır (Havsteen, 2002). Genellikle altı ana grup dikkate alınır. Bunlar flavonoller, flavonlar, flavanoller, flavanonlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidlerdir. Kuersetin, kaempferol, mirisetin, luteolin ve apigenin en önemli flavonoidlerdir. En yaygın bulunan flavanonlar; hesperidin, narirutin ve naringenin iken, önemli flavonlar ve flavon glikozitleri arasında luteolin, krisin ve apigenin bulunur. Flavanoller normal olarak aglikonlar halinde veya kateşin ve epikateşin gibi gallik asit ile esterlenmiş halde bulunur. Apigenin ve luteolin beslenme en önemli flavonlar olarak kabul edilir. Önemli antosiyanidinler ise pelargonidin, siyanidin, delfinidin ve malvidindir (Erlund, 2004). Antosiyaninler, en iyi bilinen flavonoid türlerinden biri olmakla birlikte antosiyanidinlerin glikozit türevleridir. Antosiyanin konsantrasyonu özellikle koyu renkli meyvelerde (kırmızı üzüm, kara kiraz) daha

yüksektir. Bu bileşikler, kırmızıdan maviye değişen renk pigmentleri olarak işlev görür (Khandelwal ve Abraham, 2014).

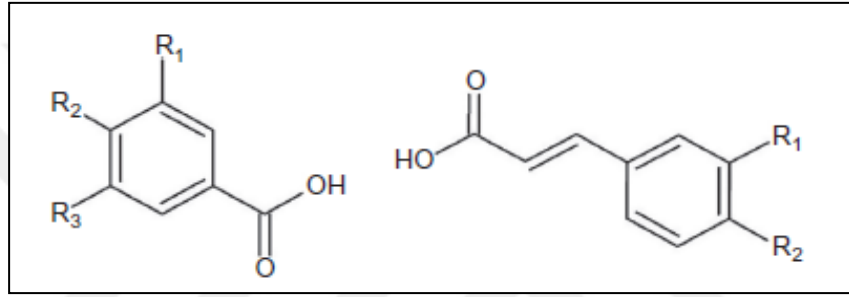
Flavonoid bakımından zengin bitkisel besinler doğada bol miktarda bulunur. Çoğu zaman bu bileşiklerin birkaç türü tek bir gıda maddesinde bulunabilir. Bununla birlikte bazı gıdalar flavonoidlerin ana kaynağıdır. Yeşil yapraklı sebzeler (marul, maydanoz, kişniş ve nane gibi), flavonoller, flavonlar ve flavon glikozitleri içeren en bilinen kaynaklar arasındadır. Bazı baharatlar (biberiye, kekik, tarhun, kekik ve fesleğen), tohumlar ve kuruyemişler de flavonoidlerin önemli kaynaklarıdır (Adebamowo vd., 2005). Bunun yanında, flavanoller neredeyse sadece sitrik meyvelerde ve üzümde bulunurken (Erlund, 2004), flavanoller bazı meyvelerde (kayısı, elma, armut, şeftali) bulunur (Mullie vd., 2008).

Yapılan çalışmalar flavonoid bakımından zengin beslenmenin insan sağlığına çok sayıda yararlı etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Luna-Guevera vd., 2019). Bitki tarafından sentezlenen flavonoidler, güçlü antioksidan aktivite sergilemekle birlikte kardiyovasküler ve nörolojik kronik dejeneratif hastalıklara karşı korunmaya yardımcı olur (Perez Viscaino vd., 2009, Luna-Guevara vd., 2019). Flavonoidlerin antioksidan özellikleri, yapılarında bulunan hidroksil fenolik gruplardan gelir. Bunlar; indirgeyici ajanlar, hidrojen donörleri, singlet oksijen ve süperoksit radikal temizleyicileri ve hatta metal iyon şelatlama ajanları olarak çalışır. Ayrıca flavonoidler; antioksidan enzimleri aktive edebilir, α -tokoferol radikallerini (tokoferoksilleri) azaltabilir, oksidazları inhibe edebilir, nitrosatif stresi hafifletebilirler (Atmani vd., 2009).

Flavonoidler güçlü antioksidan etkinlik göstermelerinin yanısıra antimikrobiyal ve bazı fonksiyonel etkilere de sahiptir. Bu bileşiklerin insanlarda bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek sağlıklı bir sindirim sisteminin sürdürülebilmesine yardımcı olduğu, antibakteriyel ve antifungal aktivite göstererek diyareyi önlediği bildirilmektedir (Azuma vd., 2013). Ayrıca flavonoidler, antikarsinojenik ve antitümör özelliklere sahiptir (Galati ve O'brien, 2004). Flavonoidlerin karsinojenlerin aktivasyonunu sağlayan enzimlerin inhibisyonu ile tümör oluşumunu engellediği bildirilmektedir (Delgado vd., 2014). Ayrıca flavonoidlerin çevresel toksik ajanların yol açtığı DNA hasarlarına karşı koruyucu rol oynadığı (Carino-Cortes vd., 2010), bunun dışında antidiyabetik etki gösterdiği de raporlanmıştır (Havsteen, 2002).

1.8.1.2. Fenolik Asitler

Doğada yaygın olan fenolik asitler; bitkilerde besin emilimi, protein sentezi, enzimatik aktivite, fotosentez ve allelopati gibi birçok fonksiyonda yer alan biyoaktif bileşiklerdir (Goleniowski vd., 2013). Fenolik asitler, tek bir fenol halkası ve en az işlevsel bir karboksilik asit grubundan oluşur ve genellikle fenole (C6) bağlı zincirdeki karboksil grubuna (C1, C2 veya C3) bağlı karbon sayısına göre C6-C1 (hidroksibenzoik asitler), C6-C2 (asetofenonlar ve fenilasetik asitler) ve C6-C3 (hidroksisinnamik asitler) olarak sınıflandırılır (Şekil 1.9.) (Zhu ve Sang, 2017).



Şekil 1.9. Fenolik asitlerin temel yapısı (hidroksi benzoik asit ve sinamik asit)

Gıda maddelerinde en yaygın bulunan fenolik asitler; gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringik asit ve protokateşinleri içeren hidroksibenzoik asitlerdir. Kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit ise hidroksisinnamik asitler grubundandır (Jurikova vd., 2016). Tüketilen bitkisel gıdaların miktarına bağlı olarak, fenolik asit alımı genellikle günlük olarak tüketilen tüm fenolik bileşiklerin yaklaşık üçte biri olmak üzere, günde 1-2 g arasındadır (Zhu ve Sang, 2017). Fenolik asitler, çoğunlukla meyvelerde (mango, şeftali, kıvılcık, yaban mersini, armut, kiraz, kayısı ve sitrik meyveler), sebzelerde (domates, ıspanak ve patlıcan), bazı hububatlarda, yağlı tohum ve kuruyemişlerde, kahve ve yeşil çayda bulunur (Naczka ve Shahidi, 2006; Masibo ve He, 2008; Działo vd.; 2016).

Fenolik asitler göstermiş oldukları biyoaktiviteler nedeniyle özellikle tıbbi araştırmalara konu olmuştur (Jitan vd., 2018). Fenolik asitler indirgeme yeteneklerinden dolayı doğal antioksidanlar olarak görev yaparlar. Fenolik asitlerin antioksidan aktivitesi kimyasal yapılarıyla ilişkilidir. Bu durum da serbest radikallere bir hidrojen atomu veya elektron vermesi ya da konjuge aromatik sistemin eşlenmemiş elektronunun yerini değiştirmesiyle oluşur (Cuvelier vd., 1992; Dai ve Mumper, 2010). Fenolik asitlerin

antioksidan aktivitelerini kimyasal yapılarında bulunan hidroksil grubu sayısı ile hidroksil ve karboksil gruplarının pozisyonu belirler. Hidroksil grubu sayısı arttıkça antioksidan aktivite artar. Polihidroksifenollerin monofenollere göre antioksidan aktivitesi daha yüksektir. Örneğin, protokatekuik asit ve kafeik asitin antioksidan aktivitesi, bir monofenol olan *p*-kumarik asite göre daha güçlüdür. Benzer şekilde bir trifenol olan gallik asitin antioksidan aktivitesi ise protokatekuik asit ve kafeik asite göre çok daha yüksektir (Cuvelier vd., 1992; Dai ve Mumper, 2010; Jitan vd., 2018). Hidroksil grubunun karboksil grubuna göre konumu da antioksidan aktivitede belirleyicidir. Hidroksil grubunun meta pozisyonunda olması antioksidan aktivitenin en yüksek olduğu konumdur. Para veya orto pozisyonlarda karboksil grubunun elektron çekim potansiyeli (sterik engelleme) antioksidan aktiviteyi azaltır. Monofenollerde orto pozisyondaki hidroksil grubuna bir veya iki metoksi grubunun eklenmesi de antioksidan aktiviteyi artırır. Örneğin antioksidan aktivite sırasıyla *p*-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit için giderek artar (Jitan vd., 2018).

Fenolik asitler antioksidan aktivitelerinin yanında; antiinflamatuvar, antikanser, antidiyabetik gibi biyolojik aktiviteler de sergiler (Gomes vd., 2003; Yi vd., 2005; Hsu ve Yen, 2008; Verma vd., 2013; Adefegha vd., 2015; Choi vd., 2016; Iswandana vd., 2016). Fenolik asitler, enflamasyon sırasında hücrel sinyalizasyon proseslerini kontrol eder (Garcia Lafuente vd., 2014) ve hücre hasarlanmasına neden olan enflamasyon ara ürünlerinin üretilmesini baskılar (Kassim vd., 2010; Li vd., 2014; Taofiq vd., 2015). Şiringik asitin enflamasyon görülen ratlarda sitokin seviyesini düşürdüğü ve enflamasyonu baskıladığı bildirilmektedir (Itoh vd., 2009). Rosmarinik asitin lipoksigenaz ve sikloksigenaz aktivitesini inhibe ederek enflamasyonu azalttığı rapor edilmektedir (Iswandana vd., 2016). Fenolik asitlerin sağlık alanında kullanımlarından bazıları da kanser tedavisi ve tümör gelişiminin baskılanmasıdır. Örneğin elajik asit, protokatekuik asit, kafeik asit ve gallik asitin farklı kanser türlerine sitotoksik etki yaparak antikanser etki gösterdiği raporlanmıştır (Gomes vd., 2003; Yi vd., 2005; Verma vd., 2013). Fenolik asitlerin antidiyabetik özelliklerinden de bahsedilmektedir. Örneğin gallik asit ve protokatekuik asitin Tip 2 diyabette rol oynayan α -amilaz ve α -glukozidazın etkinliğini inhibe ettiği bildirilmektedir (Adefegha vd., 2015; Iswandana vd., 2016). Benzer şekilde hidroksibenzoik asitlerin kan şekerini düşük seviyelerde tuttuğu ve bu iki enzimi inhibe ettiği bildirilmiştir (Ho vd., 2017; Chiou vd., 2017). Ayrıca düzenli fenolik asit alınan

diyetlerde kardiyovasküler hastalıkların da dahil olduğu kronik dejeneratif hastalıkların görülme riskinin azaldığı raporlanmıştır (Shi vd., 2013).

Fenolik asitler; mikrobiyal nükleik asit sentezini, enzimatik aktiviteyi, sitoplazmik membran fonksiyonunu ve enerji metabolizmasını inhibe ederek antimikrobiyal ajan olarak rol oynar (Villalobos vd., 2016). Protokatekuik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asitlerin gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri (Alves vd., 2013; Villalobos vd., 2016), patojenik *Escherichia coli* O157:H7 ve *Staphylococcus aureus* EP167 mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiği bildirilmektedir (Cueva vd., 2010; Alves vd., 2013). Kafeik asitin antimikrobiyal aktivitesinin bakteriyel RNA polimeraz enzimini inhibe edebilme kabiliyetinden kaynaklandığı (Lima vd., 2016), *p*-kumarik asitin bakteriyel genomik DNA'sına bağlanarak hücrel fonksiyonunu inhibe ettiği ve bakterilerin ölümüne sebep olduğu raporlanmıştır (Heleno vd., 2015).

Fenolik asitler, yaşlanma karşıtı ve UV ışınları hasarına karşı cilt koruyucu olarak, kısırlık ve karaciğer hasarı tedavisinde etkilidir. Örneğin ferulik asitlerin UV ışınlarını emme kabiliyeti çok yüksektir. Dolayısıyla iyi bir cilt koruyucu olarak görev yaparlar (Zhao vd., 2008). Ferulik asitlerin lipid peroksidasyonunu önlediği için bazı ülkelerde gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı (Srinivasan vd., 2007), C vitamini ile karşılaştırıldığında kanda daha uzun süre kaldığı (Srinivasan vd., 2007), koroner hastalıklara karşı koruyucu olduğu, kolesterolü düşürdüğü ve sperm canlılığını arttırdığı bildirilmektedir (Ou ve Kwok, 2004).

1.9. Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için yapılan analizlerde insan, hayvan ve gıdalarda patojen olan mikroorganizmalar seçilmiştir. 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) ve 7 adet fungus (2 maya, 5 küf) olmak üzere toplam 13 mikroorganizma test mikroorganizma olarak kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları, Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından (GÜ) ve Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından (EÜ) temin edilmiştir. İlgili mikroorganizmalara ilişkin bilgiler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Bacillus cereus: *B. cereus*, basil şeklinde, gram pozitif, hareketli, kapsülsüz, sporları terminal veya subterminal olan aerop bir bakteridir. Doğada yaygın olarak bulunur. Saprofit bakteriler olmalarına rağmen gıda zehirlenmelerine sebep olurlar. Ayrıca apse, göz içi enfeksiyonlar, osteomyelit, endokardit ve üriner enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonların etkeni olabilirler (Ustaçelebi, 1999).

Tablo 1.1. Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma adı	Şus numarası	Cinsi	Temin edilen yer
<i>Bacillus cereus</i>	RSKK 709	Gram (+) bakteri	GÜ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram (+) bakteri	GÜ
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	Gram (+) bakteri	EÜ
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29998	Gram (-) bakteri	GÜ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	Gram (-) bakteri	GÜ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	Gram (-) bakteri	GÜ
<i>Candida albicans</i>	DSMZ 5817	Fungus (maya)	GÜ
<i>Candida tropicalis</i>	NRRL YB-366	Fungus (maya)	GÜ
<i>Aspergillus flavus</i>	-	Fungus (küf)	GÜ
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Fungus (küf)	EÜ
<i>Aspergillus niger</i>	NRRL 326	Fungus (küf)	EÜ
<i>Alternaria brassicicola</i>	-	Fungus (küf)	EÜ
<i>Alternaria alternata</i>	-	Fungus (küf)	EÜ

Staphylococcus aureus: *S. aureus*, pigmentli, fakültatif anaerop, sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz gram pozitif bir bakteridir. Doğada oldukça yaygın halde bulunur. İnsan ve sıcakkanlı hayvanlarda gıda zehirlenmesi ve piyojenik enfeksiyonları yapan bir türdür. Deri ve mukozoda apse, sivilce, kıl kökü iltihabı, çıban, panaris (dolama), ter bezi, göz kapağı ve bademcik iltihabı, endokardit ve pnömoniye neden olurlar.

Listeria monocytogenes: *L. monocytogenes* basil şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerop, gram pozitif bir bakteridir. İnsanlarda menenjit, septisemi (kan zehirlenmesi), konjoktivit (göz kapağı iltihaplanması) gibi hastalıklara neden olur. Gebelerde plesenta yolu ile fetüse geçebildiği için ölü doğumlara neden olabilir (Ustaçelebi, 1999).

Escherichia coli: *E. coli*, *Escherichia* cinsi içinde en önemli türdür. *E. coli* basil şeklinde, gram negatif, hareketli, fakültatif anaerob bakteridir. Normal bağırsak bakterisi olarak memeli ve kuşlarda bulunur. Bağırsak ve bağırsak dışı hastalıklara neden olur. *E. coli* bağırsaklarda ishale, bağırsak dışına çıkarak dokulara geçebildiği zaman; üriner sistem, safra ve safra yolları enfeksiyonları, menenjit, peritonit, hemolitik üremik sendrom, sinüzit ve yara enfeksiyonları gibi çok çeşitli hastalıklara yol açar (Ustaçelebi, 1999).

Klebsiella pneumoniae: *K. pneumoniae* kısa ve uçları yuvarlak basil şeklinde, hareketsiz, sporsuz, aerob ve fakültatif aerob özellik gösterebilen, gram negatif bir bakteridir. Doğada yaygın olarak bulunur. İnsanlarda üst solunum yolu ve dışkı florasında bulunan bir bakteri olduğu için uygunsuz koşullar altında fırsatçı bir patojen olarak ortaya çıkar. Üst solunum yollarında yoğun balgam üretimine ve akciğerlerde kalıcı hasara sebep olabilir. Hastane enfeksiyonlarından sorumlu bir bakteridir (Ustaçelebi, 1999). *K. pneumoniae* kaynaklı bu enfeksiyonların içerisinde en sık rastlanan üriner sistem enfeksiyonlarıdır (Kahraman vd., 2017).

Vibrio parahaemolyticus: *V. parahaemolyticus*, halofilik (tuzu seven) gram negatif bir bakteridir. Deniz ve kıyı şeridi çevrelerinde görülür. Genellikle işlem görmemiş, çiğ ve pişirilmemiş deniz mahsullerinin tüketilmesiyle insanlara bulaşır. İnsanlarda akut gastroenterite (mide bağırsak iltihaplanması), nadir olarak yara ve kulak enfeksiyonlarına ve sepsisme (kan zehirlenmesi) neden olur (Letchumanan vd., 2014).

Candida albicans: *C. albicans*, eşeyli çoğalan diploid bir mantar türüdür. *Candida* cinsine ait yaklaşık 200 tür vardır ve en yaygın görülen mantar enfeksiyonu *C. albicans*'a aittir. Vücutta nemli ve ılık bölgeleri tercih eden *C. albicans* normal koşullar altında ağız ve vajen florasında bulunur. Bağırsakların da flora üyesi olan *Candida*, fırsatçı enfeksiyonların temel etkenidir (Acarkan vd., 2014). Vücuda antibakteriyel antibiyotikler alındığında, *C. albicans* ile rekabet içerisinde bulunan bakterilerin ölümüyle birlikte *C. albicans* sayısı hızla artarak mevcut denge bozulur. Böylece ağız ve vajinal kandidiyazi (pamukçuk) oluşur (Devkatte vd., 2005; Omran ve Esmailzadeh, 2009; Olama vd., 2013).

Candida tropicalis: *C. tropicalis* eşeysiz çoğalan diploid bir mantar türüdür (Suzuki vd., 1991). *Candida* türleri içinde *C. albicans*'tan sonra virulansı en yüksek patojendir. Hatta çok güçlü biyofilm üreticisi olması nedeniyle *C. albicans* türünün bazı durumlarda önüne geçmektedir. Vücutta nemli ve ılık bölgeleri tercih eder. Ayrıca osmotik basınca karşı toleransı yüksek olan *C. tropicalis*, çok yüksek tuz konsantrasyonlarında bile fungal

aktivite gösterir (Zuza-Alves vd., 2017). İnsanlarda deri ve tırnak enfeksiyonlarına, pişiğe, ağız ve vajinal kandidiyazına neden olur. Bunun yanında bağışıklık sistemi zayıf hastalarda ölümcül vakalara neden olmaktadır (Chai vd., 2010).

Aspergillus spp.: *Aspergillus* cinsi içerisinde 185 tür bulunur ve *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*'in de aralarında bulunduğu 20 tür, ciddi enfeksiyonlara neden olur. *Aspergillus* sporları; hava, su, toprak, çürümüş bitkisel artıklar, hayvan yemi, hayvan barınakları ve hayvanların üzerinde yaygın olarak bulunur. *Aspergillus* türlerinin mikroskopik karakterlerinin yanında, büyüme hızı, koloni rengi ve sıcaklığa gösterdikleri tolerans; mantarlar içerisinde makroskopik olarak da tanımlanabilmelerini sağlar. *Aspergillus* spp.'nin etmeni olduğu hastalıklara aspergillozis adı verilir ve bu hastalık solunum yoluyla kuşlara ve insanlara bulaşır. İnsanlarda görülen hastalıklar aşağıda belirtilmiştir.

- Tüberküloza bağlı akciğer boşluklarında kolonileşme, akciğer ve böbreklerde tümör oluşumu gibi hastalıklara neden olur. İnsan vücudundaki herhangi bir organ veya sistemi etkileyebilir. Endokardit (kalp iç zarı iltihabı), miyokardit (kalp kası iltihabı) sinüzit, menenjit gibi iltihaplı hastalıklara yol açar. Ayrıca aspergillozis hastanelerde kullanılan bazı aletlerden hastalara bulaşır. Bu nedenle bağışıklık sistemi zayıf hastalar, yaşlı, hamile ve bebekler için çok büyük bir risk oluşturur.

- Bronşlarda alerjik reaksiyonlara neden olur.

- *Aspergillus* spp. tarafından üretilen aflatoksinler kanserojen etki göstererek karaciğer kanseri ve karaciğer tümörüne neden olur (Patron, 2006).

Alternaria spp.: *A. brassicicola* ve *A. alternata* türlerinin de dahil olduğu *Alternaria* spp. tahıl, sebze ve meyve gibi tarımsal ürünlere hasat öncesi veya sonrası zarar veren çok sayıda türe sahip olan bir mantar cinsidir. Doğada çok geniş bir yayılıma sahip olan bu cinsin sporları çok çeşitli habitatlarda, toprak ve havanın normal florasında bulunur (Patriarca ve Pinto, 2018). *Alternaria* ılık ve kuru ortamlarda gelişir (Targonski vd., 1995). Düşük sıcaklıklarda bile gelişimlerine devam ederler. Kısa hayat döngüsüne sahip bu patojenik türler sporlarını rüzgar ile kolayca yayabilirler. Sporlar radyasyon etkisine ve zorlu çevresel koşullara dayanıklıdır. Tüm bu özellikler düşünüldüğünde *Alternaria* spp.'nin çok etkili bir patojen olduğu söylenebilir. *Alternaria* türleri sekonder metabolitler olan fitotoksin ve mikotoksinleri üretir. Fitotoksinler bitkilerde hastalık etmeni olarak önemli rol oynar. Mikotoksinler ise bulaşık sebze ve meyveleri tüketen insan ve hayvanlar için zararlıdır. Ancak *Alternaria* spp.'nin ürettikleri mikotoksinler hakkında *Aspergillus*

spp.'nin ürettikleri kadar bilgi bulunmamaktadır (Patriarca ve Pinto, 2018). *Alternaria* spp. sporları astım ve alerjik fungal sinüzite neden olur (O'Hollaren vd., 1991; Stewart ve Hunsaker, 2002).

1.10. Antimikrobiyal Ajanlar

Antimikrobiyal ajanlar; bakteri, mantar veya virüs gibi mikroorganizmaların gelişimini önleyen, çoğalmasını baskılayan veya bu mikroorganizmaları öldüren farklı molekül sınıflarıdır (Musumeci ve Puglisi, 2013). Bu ajanlar mikroorganizmaları tamamen öldürürse mikrobiyosit, mikroorganizmaların üremesini engellerse mikrobiyostatik olarak adlandırılır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Özgümüş, 2010).

Antimikrobiyal ajanlar kimyasal yapı ve etki mekanizmalarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

- Bakteri hücre duvarlarının sentezini inhibe eden ajanlar,
- Doğrudan mikroorganizmanın hücre zarı geçirgenliğini artıran ve hücre içi bileşiklerin bozunmasına neden olan ajanlar,
- Protein sentezini tersine inhibe etmek için 30S veya 50S ribozomal alt birimlerinin işlevini bozan ajanlar,
- 30S ribozomal alt ünitesine bağlanan ve protein sentezini değiştiren ajanlar,
- Bakteriye nükleik asit metabolizmasını etkileyen ajanlar (RNA polimeraz veya topoizomeraz inhibitörleri),
- Antimetabolitler (Musumeci ve Puglisi, 2013).

Antimikrobiyal maddeler, etki gösterdikleri mikroorganizma cins sayısının az ya da çok oluşuna göre dar ya da geniş spektrumlu olarak tanımlanmaktadır (Özgümüş, 2010; Topal, 2013). Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler, konağın bağışıklık sisteminde bulunan doğal mikroorganizma yapısını bozmaktadır. Bu nedenle etkisini sadece enfeksiyon etkeni olan mikroorganizma üzerinde gösteren dar spektrumlu antimikrobiyaller tercih edilmelidir. Fakat çoklu patojene bağlı enfeksiyonlarda veya acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyaller kullanılabilir (Topal, 2013). Antimikrobiyal maddelerin ayrıca düşük konsantrasyonlarda bile konağa zarar vermeden sadece hastalık yapan mikroorganizma üzerinde etkili olması beklenir. Bu özelliğe seçici toksisite adı verilir (Özgümüş, 2010; Topal, 2013).

Bitkiler doğal antimikrobiyal kaynaklar açısından büyük bir potansiyele sahiptir (Orhan vd., 2012). Antimikrobiyal bileşikler çoğunlukla sekonder metabolitler olan fenollerde ve bunların oksijen-ikame türevleri olarak bitkilerde bulunmaktadır. Bitkilerde antimikrobiyal etkiden sorumlu olan temel bileşikler; fenolikler, fenolik asitler, kinonlar, saponinler, flavonoidler, taninler, kumarinler, terpenoidler ve alkaloidler olarak bilinmektedir (Gyawali ve İbrahim, 2014; Yücel ve Yücel, 2015). Doğal antimikrobiyal maddelerin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle beraber, terpenoidler ve fenoliklerin hücre membranını parçaladığı, flavonoidlerin metal şelasyonuna neden olduğu, kumarin ve alkaloidlerin ise genetik materyal üzerine etki ederek mikroorganizma gelişimini engellediği bilinmektedir (Cowan, 1999; Yücel ve Yücel, 2015). Fenolik bileşiklerde bulunan hidroksil grupları, bakterilerin hücre zarı ile etkileşime girerek hücrelerin membran yapısını bozmakta ve hücrenin bileşenlerinin hücre dışına sızmasına neden olmaktadır (Burt, 2004; Lai ve Roy 2004; Shan vd., 2007; Xue vd., 2013). Ayrıca bu hidroksil gruplarının; proton değiştirici olarak hareket eden elektronların delokalizasyonuna ve bakteri hücrelerinin sitoplazmik zar üzerindeki eğilimini azaltmaya yardımcı olarak hücre ölümüne neden olduğu (Ultee vd., 2002; Gyawali ve İbrahim, 2014) ve mikroorganizmaların hücre metabolizmalarını değiştirerek enzimlerin aktif bölümünü kolayca bağlayabileceği bildirilmiştir (Farang vd., 1989). Bunun yanında flavonoidlerin antiviral etkisinin bulunduğu ve bu etkinin proteinlere yüksek oranda bağlanma yeteneği ile ilgili olduğu bilinmektedir. Örneğin yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan metil kuersetinin, poliovirüsünün replikasyonunu ve hücrenin protein sentezini bloke ettiği bildirilmiştir (Kahraman vd., 2002). Ayrıca polifenollerin de antibakteriyel aktivitelerinden bahsedilmektedir (Taguri vd., 2004). Bitkilerin kendilerini mikrobiyal enfeksiyonlar gibi biyotik saldırılardan korumak için sentezlemiş oldukları bu antimikrobiyal bileşikler nedeniyle bitkiler ve bitkisel ürünler mikroorganizmalara karşı aktivite çalışmalarında kullanılmaktadır (Kan vd., 2009).

Bakteriler, antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençli olabilmektedir. Doğal direnç, mikroorganizmanın tür özelliğine bağlı olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşıması veya ilacın yapısal bir özelliğinden dolayı hedefine ulaşamaması sonucunda oluşmaktadır. Örneğin Gram negatif bakteriler ilacın dış membrandan geçememesi nedeniyle, vankomisine doğal olarak dirençlidir veya bakterilerin L formları ve mikoplazmalar gibi çepersiz mikroorganizmalar, penisilin gibi hücre duvar sentezi inhibitörlerine doğal olarak

dirençlidir. Aynı şekilde metabolik olarak inaktif olan bakteri sporları doğal dirençlidir. Çünkü birçok ilacın etkili olabilmesi için bakterinin aktif üreme döneminde olması gerekmektedir (Eliopoulos 1992; Willett vd., 1992; Jawetz vd., 1995; Mayer vd., 1995; Yüce, 2001). Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri doğal direncin yanında çok daha önemli olan kazanılmış dirençtir (Tenover, 2006). Kazanılmış direnç, bakterilerin genetik özelliklerindeki değişime bağlı olarak önceden duyarlı olduğu bir antibakteriyal ajandan etkilenmemesi durumu olarak ifade edilmektedir (Yüce, 2001). Nokta mutasyonlar ile hedef bağlanma yerlerinin değiştirilerek antimikrobiyal ajanın aktivitesinin engellenmesi, bakterilerde büyük bir DNA segmentinin yeniden düzenlenmesi, plazmidler, bakteriyofajlar, yalın DNA dizilimleri veya taşınabilir genetik elementler aracılığıyla gerçekleşen yabancı bir DNA segmentinin kazanılması gibi çok çeşitli mekanizmalarla genetik değişiklikler meydana gelebilir. Böylece sayılan mekanizmalar yardımıyla herhangi bir antimikrobiyal ajana direnç gelişebilir. Antibiyotik direnç geni bir kez geliştikten sonra bu direnç transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon ve transpozisyon ile bakteriler arasında yayılır (Kuyucu, 2007). Dolayısıyla geliştirilen ilaçlara karşı mikroorganizmaların hızla direnç kazanması ve bu ilaçların etkinliğini yitirmesi önemli bir problem olarak ortaya çıkmaktadır (Kürek, 2007). Sentetik olarak üretilen ilaçların tek bir aktif madde içermesi nedeniyle mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanması kolaylaşırken, bitkilerde bulunan aktif maddelerin diğer maddelerle kompleks halinde bulunması mikroorganizmaların bu yapılara karşı çoklu direnç kazanmasını güçleştirmektedir (Tenover, 2006, Kürek, 2007). Dolayısıyla bitkilerin yapısında bulunan çok sayıda bileşimin oluşturduğu sinerjik etki ile enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve tek tip antibiyotiğe karşı direnç kazanan mikroorganizmaların yok edilmesinde, bitkisel kaynaklı ilaçların sentetik ilaçlara göre daha etkin bir tedavi sağladığı belirtilmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013). Bu nedenle bitki kaynaklı ilaçlar mikroorganizma temelli hastalıkların tedavisinde büyük umut kaynağı olmuştur ve araştırmacılar bitkilerin kimyasal bileşimlerini ortaya çıkarıp, antimikrobiyal mekanizmasını çözmeye çalışmaktadırlar (Erdoğan ve Everest, 2013).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve gereçler Tablo 2.1’de verildi.

Tablo 2.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve gereçler

Cihazlar ve Gereçler	Firma
Hassas Terazî	Kern
Buzdolabı	Beko
Çalkalayıcı inkübatör	Shel Lab
Etüv	Daihan Scientific
GPS Cihazı	Magellan
McFarland Densimetresi	Grant Instruments
Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific
Otoklav	HMC Hirayama
Öğütücü	Fritsch
Rotary evaporatör	Heidolph
Steril kabin	Esco
Su Banyosu	Memmert
Ultrasonik Su Banyosu	Wisd Laboratory Instruments
Vorteks	Heidolph
6 mm disk	Bioanalyse
96 kuyucuklu mikroplaka	LP Italiana Spa
Balon joje	ISO Lab
Bek alevi	ISO Lab
Eküvyon	Cultiplast
Ependorf tüpü	ISO Lab
Erlen mayer	ISO Lab
Falkon tüp	ISO Lab
Filtre kağıdı	Schleicher & Schüll
İnokulasyon aparatı	ISO Lab
Otoklav şişesi	ISO Lab
Otomatik pipetler	Ependorf
Öze	Loop Plast
Petri	ISO Lab
Viyal	ISO Lab

2.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarf malzemeler Tablo 2.2’de verildi.

Tablo 2.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal sarf malzemeler

Malzeme adı	Firma
ABTS	Sigma Aldrich
Alüminyum nitrat nonahidrat	Merck
Amonyum heptamolibdat tetrahidrat	Merck
Askorbik asit	Merck
Dimetilsülfoksit	Merck
DPPH	Sigma Aldrich
Etanol	Merck
Etil asetat	Sigma Aldrich
Folin-Ciocalteu fenol reaktifi	Merck
Gallik asit	Merck
Hekzan	Sigma Aldrich
Kloramfenikol	Sigma Aldrich
Kloroform	Sigma Aldrich
Kuersetin	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
Müller-Hinton Agar	Merck
Müller-Hinton Broth	Merck
Nistasin	Sigma Aldrich
Potasyum asetat	Sigma Aldrich
Potasyum persülfat	Sigma Aldrich
Potato Dextrose Agar	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	Merck
Sodyum karbonat	Sigma Aldrich
Sülfürik asit	Merck
Troloks	Sigma Aldrich

2.2. Metot

Tüm analizler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

2.2.1. Bitkilerin Toplanması

Orkidelere ait yumrular 9 Temmuz 2017 tarihinde Gümüşhane İli Kelkit İlçesi Aşağıözlüce Köyü sınırları dahilinde bulunan dağlık alanlardan toplandı (Rakım:1872 m, D:0549052 K:4429427 ve Rakım:1940 m, D: 0549227 K:4429388 lokasyonları). Orkide yumrularının doğadan toplanması izne tabi olduğundan Kelkit İlçesi Orman İşletme

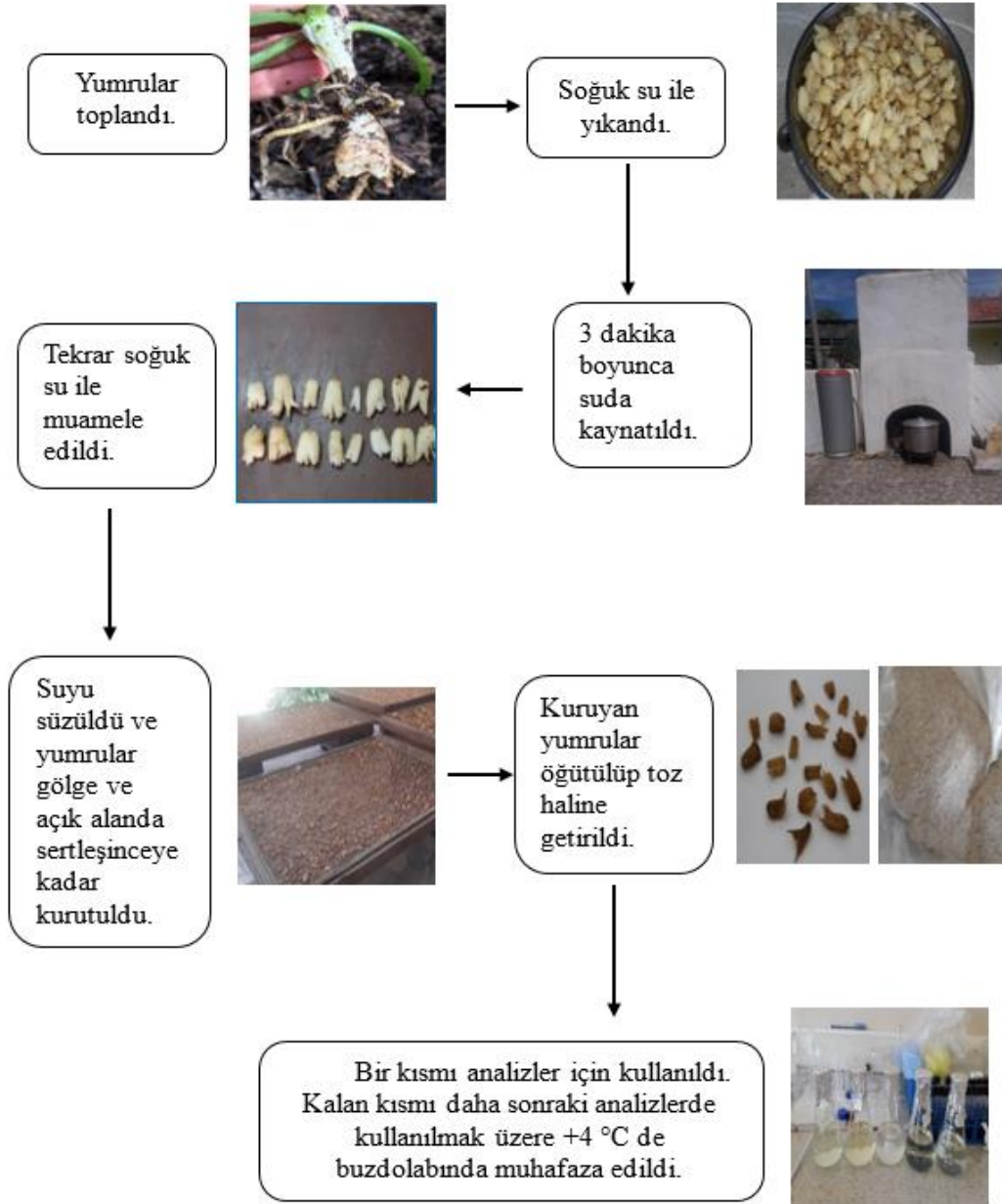
Şefliği'ne 22.06.2017 tarih ve 1322161 sayılı dilekçe ile başvuru yapıldı. 30.06.2017 tarih ve 1376191 sayılı resmi yazı ile 250 gr kuru yumru ağırlığı için izin verildi. Bitkinin tür teşhisi 'Rothmaler in Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 50. 1941' nomenklatür referansı temel alınarak Dr. Öğretim Üyesi Tuba ACET tarafından yapıldı. Hazırlanan herbaryum örneği Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'ndeki herbaryumda TAK1801 kodu ile muhafaza edildi. Ayrıca Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı'nda görev yapan 'Bitki Sistematiği' konusunda uzman Doç. Dr. İsmail Gökhan DENİZ'e canlı bitki materyalleri ile herbaryum örneği gönderildi ve tür teşhisi teyit edildi (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisine ait herbaryum örneği

2.2.2. Bitki Yumrularının Ekstraksiyona Hazırlanması ve Ekstraksiyon İşlemi

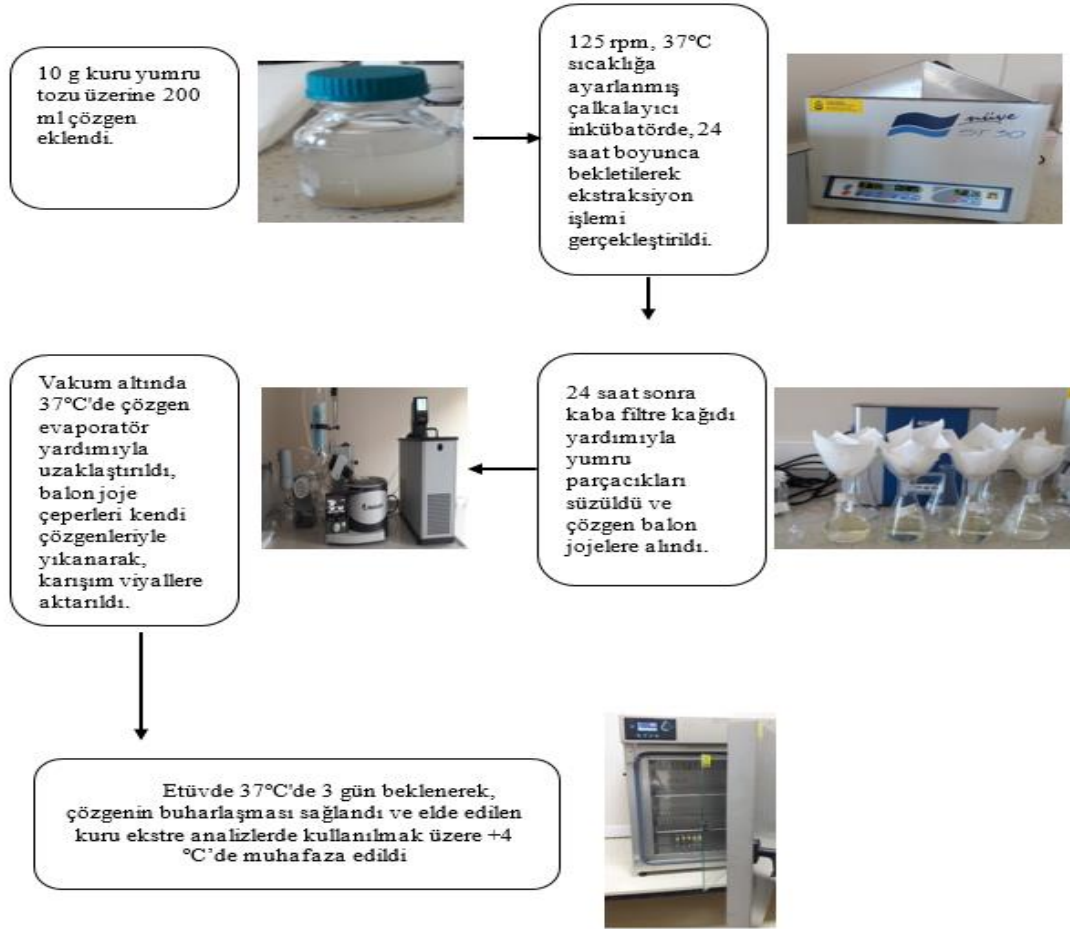
Bitki yumrularının ekstraksiyon için hazırlanma yöntemi geleneksel usule uygun olarak yapıldı (Tekinşen ve Güner, 2010). Ekstraksiyon öncesi hazırlık çalışmaları Şekil 2.2'de şematize edildi.



Şekil 2.2. Ekstraksiyon öncesi hazırlık çalışmaları

Ekstraksiyon için farklı polaritelere sahip hekzan (H, rp^1 : 0.009), etil asetat (EA, rp : 0.228), kloroform (K, rp : 0.259), etanol (E, rp : 0.654) ve metanol (M, rp : 0.762) olmak üzere beş farklı çözügen tercih edildi (Reichardt, 2003).

Ekstraksiyon işlemi Şekil 2.3'te şematize edildiği gibidir. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra, her ekstre için 10 mg/ml stok solüsyon dimetilsülfoksit (DMSO) ile hazırlandı ve analizlerde stok solüsyonlar kullanıldı (Acet ve Özcan, 2018).



Şekil 2.3. Ekstraksiyon işlemi

¹Göreceli polarite "Relative Polarity" (rp); bir çözügenin suya göre polaritesini belirler (su için rp:1.0 alınır) (Reichardt, 2003).

2.2.3. Çözeltilerin Hazırlanması

- **Toplam Fenolik Madde Tayini için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması**

Sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi (%1 w/v): 0.25 g Na_2CO_3 (MA:105.988 g/mol) hassas terazide tartılarak bir miktar distile su ile çözüldü ve balon jojede hacmi 25 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi çözeltisi (%10 v/v): 1 ml folin reaktifi distile su ile çözülerek hacmi balon jojede 10 ml'ye tamamlandı.

Gallik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 10 mg gallik asit hassas terazide tartılarak 1 ml etanol içinde çözüldü ve stok gallik asit çözeltisi elde edildi. Daha sonra 1 mg/ml'lik gallik asit stok çözeltisinden 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g/ml}$ 'lik seyreltik gallik asit çözeltileri oluşturuldu.

- **Toplam Flavonoid Madde Tayini için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması**

Alüminyum nitrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) çözeltisi (%10, w/v): 4.40 g alüminyum nitrat nonahidrat ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, MA:375.134 g/mol, MA_{susuz}:212.996 g/mol) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi balon jojede 25 ml'ye tamamlandı.

Potasyum asetat (KCH_3COO) çözeltisi (1 M): 2.454 g potasyum asetat (KCH_3COO , MA:98.142 g/mol) bir miktar distile su ile çözüldü ve hacmi balon jojede 25 ml'ye tamamlandı.

Etanol çözeltisi (%80, v/v): 80 ml saf etanol distile su ile balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

Kuersetin standart çözeltisinin hazırlanması: 10 mg kuersetin önce 80 μl saf etanol ile çözüldü ve hacmi 1000 μl 'ye distile su ile tamamlandı. 10.000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik kuersetin standart stok çözeltisi elde edildi. Standart stok çözeltisi %80'lik etanol ile 1:10 oranında seyreltilerek 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik çözelti hazırlandı. Daha sonra ise 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g/ml}$ seyreltik kuersetin standart çözeltileri oluşturuldu.

- **Total Antioksidan Kapasite Tayini (Fosfomolibdat Testi) için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması**

Fosfomolibdik asit kompleksinin hazırlanması: 1.6 ml sülfürik asit (0.6 M H_2SO_4 , MA:98.08 g/mol) 50 ml'lik balon jöjeye konuldu ve üzerine 12 ml metanol sızdırılarak karıştırıldı. Hassas terazide 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) tartıldı ve balon jöjeye alındı. Üzerine bir

miktar distile su eklenip çözüldü. Daha sonra 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) tartılıp karışıma eklendi. Çözündükten sonra hacim çizgisine kadar distile su ile tamamlandı.

Askorbik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 1.5 mg askorbik asit hassas terazide tartılarak 1 ml etanol içinde çözüldü. Daha sonra stok askorbik asit çözeltisinden 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltiler elde edildi. Son olarak 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik askorbik asit çözeltileri oluşturuldu.

Troloks standart çözeltisinin hazırlanması: 1.5 mg troloks hassas terazide tartılarak 1 ml etanol içinde çözüldü. Daha sonra stok troloks çözeltisinden 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltiler elde edildi. Son olarak 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik troloks çözeltileri oluşturuldu.

- **ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması**

ABTS radikali çözeltisi (7 mM): 38 mg 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS, MA:514.62 g/mol) tartılarak 10 ml distile su ile çözüldü. Daha sonra 6.622 mg potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, MA:270.322 g/mol, 2.45 mM) tartılarak 10 ml distile su ile çözüldü. Hazırlanan her iki çözelti falkon tüpte karıştırıldı. ABTS radikal çözeltisi elde etmek üzere, falkon tüpün etrafı alüminyum folyo ile kaplanarak oda sıcaklığında 12 saat karanlıkta bekletildi. ABTS radikal çözeltisinin optik yoğunluk değerinin 0.7 olması için karışım 1:37 oranında distile su ile seyreltildi.

Askorbik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltisinden 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik askorbik asit çözeltileri oluşturuldu.

Troloks standart çözeltisinin hazırlanması: 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltisinden 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik askorbik asit çözeltileri oluşturuldu.

- **DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması**

DPPH radikali çözeltisi (0.1 mM): 3.9 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, MA:394.32 g/mol) hassas terazide tartılarak etanol ile balon jode 100 ml'ye tamamlandı.

Askorbik asit standart çözeltisinin hazırlanması: 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltisinden 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik askorbik asit çözeltileri oluşturuldu.

Troloks standart çözeltisinin hazırlanması: 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik stok çözeltisinden 1, 3, 5, 7, 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik seyreltik askorbik asit çözeltileri oluşturuldu.

2.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Tayinleri için Gerekli Hazırlıkların Yapılması

Antimikrobiyal aktivite tayini için 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) ve 7 adet fungus (2 maya, 5 küf) olmak üzere toplam 13 mikroorganizma test mikroorganizma olarak kullanıldı (Tablo 1.1.).

- **Bakteri ve Fungus Ekimi için Besi Ortamlarının Hazırlanması**

Bakteri ve maya ekimi için 19 g Müller-Hinton Agar (MHA) tartılarak otoklav şişesine alındı ve üzeri 500 ml distile su ile tamamlandı. Fungus (küf) ekimi için ise 39 g “Potato Dextrose Agar” (PDA) tartılarak otoklav şişesine alındı ve üzeri 1 l distile su ile tamamlandı. Hazırlanan besi ortamları ve işlem sırasında kullanılacak tüm malzemeler 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Daha sonra steril kabin içerisinde hazırlanan besi ortamları 90 mm’lik petrilere dökülerek soğuması beklendi. Soğuyan petrilere üzerleri kapatılarak +4 °C’de buzdolabına konuldu.

- **Bakteri ve Maya Ekimi**

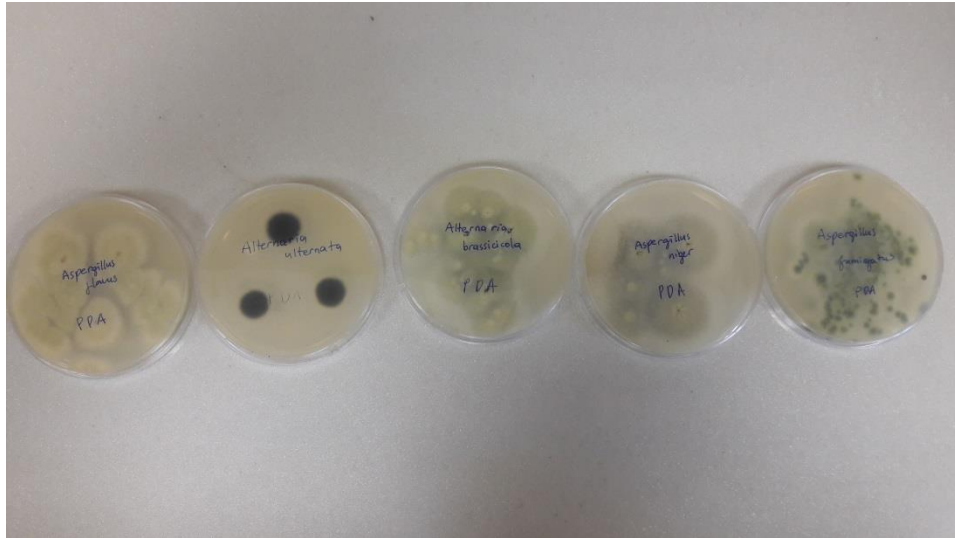
Çalışmada 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) bakteri ve 2 adet maya kullanıldı. Daha önce steril edilmiş 9 ml distile su bulunan tüplere öze yardımıyla ilgili mikroorganizmalar eklenerek 0.5 MacFarland (1.5×10^8 kob/ml) bulanıklık standardı sağlandı. Steril kabin içerisinde, MHA bulunan 90 mm’lik steril petrilere öze yardımıyla mikroorganizmaların ekimi yapıldı Daha sonra petrilere 37° C’de 18 saat gece kültürü yapılmak üzere inkübatöre konuldu. İnkübasyon sonrası bakteri ve maya bulunan petrilere son durumu Şekil 2.4’te verildi.



Şekil 2.4. İnkübasyon sonrası bakteri ve maya bulunan petrilerin son durumu

- **Küf Ekimi**

Çalışmada funguslardan beş farklı küf kullanıldı. PDA bulunan 90 mm'lik steril petrilere bek alevi ile sterilize edilen iğne öze yardımıyla küflerin ekimi yapıldı. Daha sonra ekimi yapılan petriler 27 °C sıcaklıkta 3 gün süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası küf bulunan petrilerin son durumu Şekil 2.5'te verildi.



Şekil 2.5. İnkübasyon sonrası küf bulunan petrilerin son durumu

2.2.5. Toplam Fenolik Madde Tayini

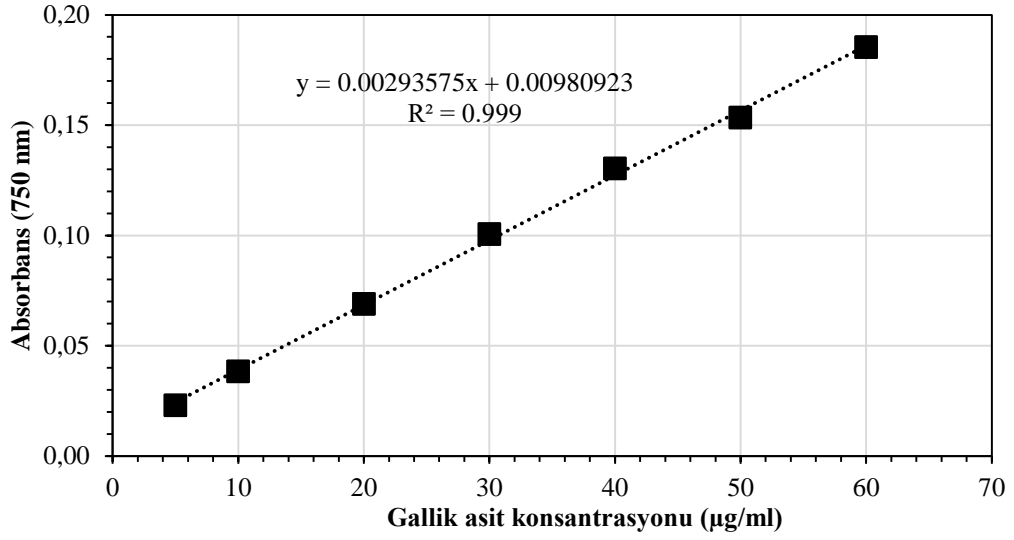
Ekstrelerin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu yönteminde (Slinkard ve Singleton, 1977), küçük değişiklikler yapılarak mikropalakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Acet ve Özcan, 2018). Yapılan pipetlemeler Tablo 2.3'te özetlendi. 5-60 µg/ml konsantrasyon aralığında (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml) gallik asit standart eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin 1 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. Toplam fenolik madde miktarı Şekil 2.6'daki standart eğri grafiği referans alınarak gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekstre) olarak hesaplandı.

Tablo 2.3. Yumru ekstrelerinde toplam fenolik madde tayini için yapılan pipetlemeler

	Miktar, µl			
	Kör	Kontrol	Standart	Numune
Distile su	250	31.25	-	-
Ekstre	-	-	-	31.25
Standart	-	-	31.25	-
Folin-Ciocalteu fenol reaktif çözeltisi, %10 (v/v)	-	125	125	125
Na ₂ CO ₃ çözeltisi, %1 (w/v)	-	93.75	93.75	93.75

Oda sıcaklığında, karanlıkta 2 saat inkübe edildi.

750 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu ile köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 2.6. Toplam fenolik madde miktarı için gallik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği

2.2.6. Toplam Flavonoid Madde Tayini

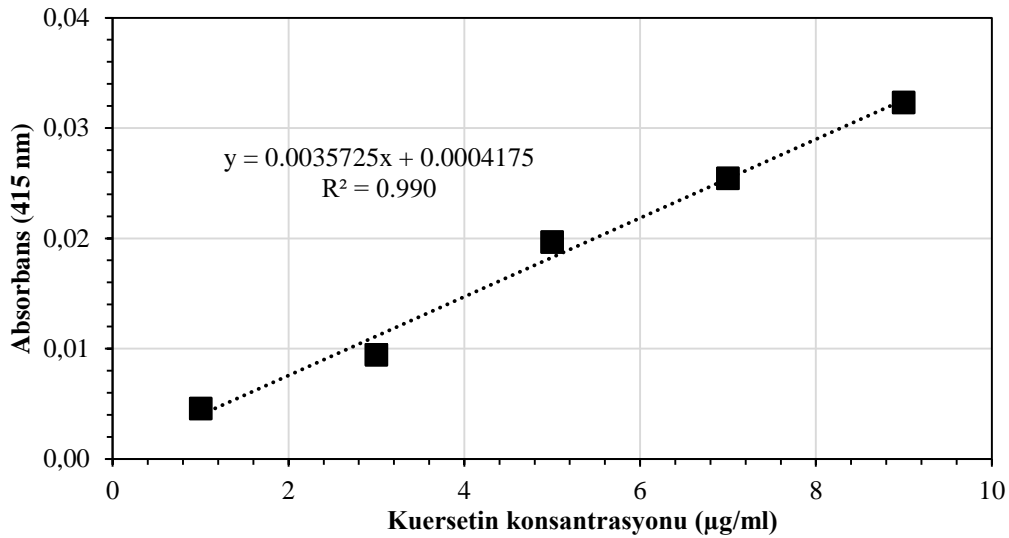
Toplam flavonoid madde miktarı, alüminyum nitrat kolorimetrik yönteminde küçük değişiklikler yapılarak mikropalakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Moreno vd., 2000). Yapılan pipetlemeler Tablo 2.4'te özetlendi. 1-9 µg/ml konsantrasyon aralığında (1, 3, 5, 7, 9 µg/ml) kuersetin standart eğrisi oluşturuldu. Ekstrelerin 1 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. Toplam flavonoid madde miktarı Şekil 2.7'deki standart eğri grafiği referans alınarak kuersetin eşdeğeri (mg QE/g ekstre) olarak hesaplandı.

Tablo 2.4. Yumru ekstralarında toplam flavonoid madde tayini için yapılan pipetlemeler

	Miktar, µl			
	Kör	Kontrol	Standart	Numune
Etanol	200	20	-	-
Ekstre	-	-	-	20
Standart	-	-	20	-
Etanol çözeltisi, % 80 (v/v)	-	172	172	172
Al(NO ₃) ₃ çözeltisi, % 10 (w/v)	-	4	4	4
KCH ₃ COO çözeltisi, 1 M	-	4	4	4

Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi.

415 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile köre karşı absorbans ölçümü yapıldı.



Şekil 2.7. Toplam flavonoid madde miktarı için kuersetin ile hazırlanan standart eğri grafiği

2.2.7. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

2.2.7.1. Fosfomolibdat Yöntemi

Ekstrelerin toplam antioksidan kapasitesi, fosfomolibdat test yönteminde küçük değişiklikler yapılarak mikropilakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Zengin vd.,

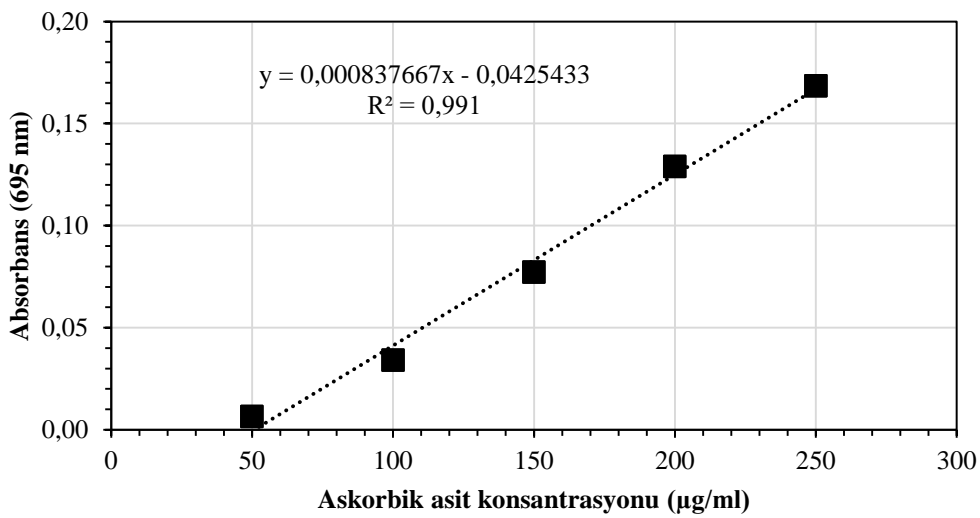
2014). Yapılan pipetlemeler Tablo 2.5'te özetlendi. Askorbik asit için 50-250 µg/ml (50, 100, 150, 200, 250 µg/ml), troloks için 100-500 µg/ml (100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) konsantrasyon aralığında askorbik asit ve troloks standart eğrileri oluşturuldu. Ekstrelerin 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. Toplam antioksidan kapasite Şekil 2.8. ve 2.9'daki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı.

Tablo 2.5. Yumru ekstrelerinde toplam antioksidan kapasite tayini (fosfomolibdat) için yapılan pipetlemeler

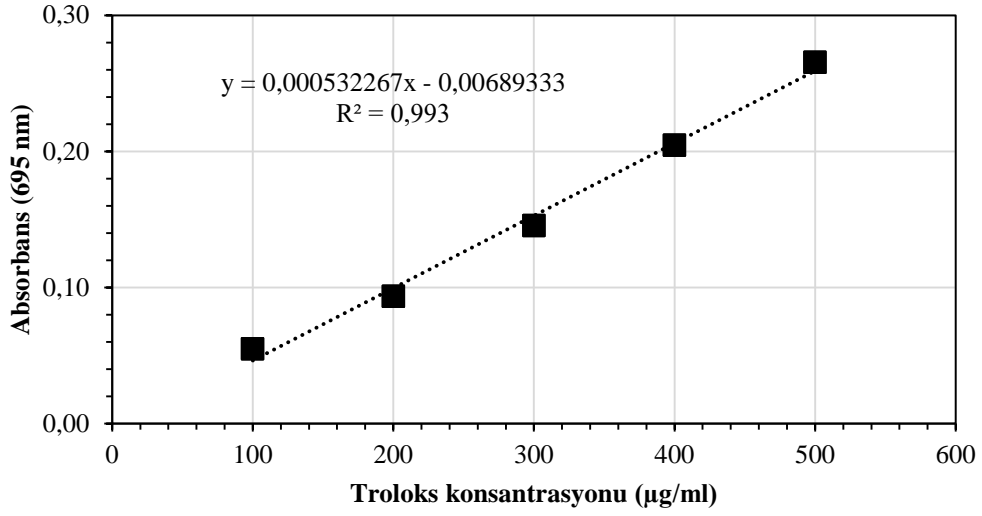
	Miktar, ml			
	Kör	Kontrol	Standart	Numune
Distile su	3.3	0.3	-	-
Ekstre	-	-	-	0.3
Standart	-	-	0.3	-
Fosfomolibdik asit kompleksi	-	3.0	3.0	3.0

Reaksiyonun gerçekleşmesi için deney tüpleri daha önceden ayarlanan 95 °C'deki su banyosunda 90 dakika bekletildi.

Soğumuş karışım otomatik pipet yardımıyla 96 kuyucuklu plakaya 250 µl hacimde enjekte edildi ve mikropilaka okuyucuda 695 nm'de köre karşı (distile su) okundu.



Şekil 2.8. Toplam antioksidan kapasite için askorbik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği



Şekil 2.9. Toplam antioksidan kapasite için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği

2.2.8. Antioksidan Aktivite Tayini Yöntemleri

2.2.8.1. ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini

Ekstrelerin ABTS radikali giderme aktivitesi Re vd., (1999) tarafından geliştirilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak mikroplakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Acet ve Özcan, 2018). Yapılan pipetlemeler Tablo 2.6'da özetlendi. Askorbik asit ve troloks için 1-9 µg/ml konsantrasyon aralığında (1, 3, 5, 7, 9) askorbik asit ve troloks standart eğri grafikleri oluşturuldu. Ekstrelerin 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. ABTS radikali giderme aktiviteleri Şekil 2.10. ve 2.11'deki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı.

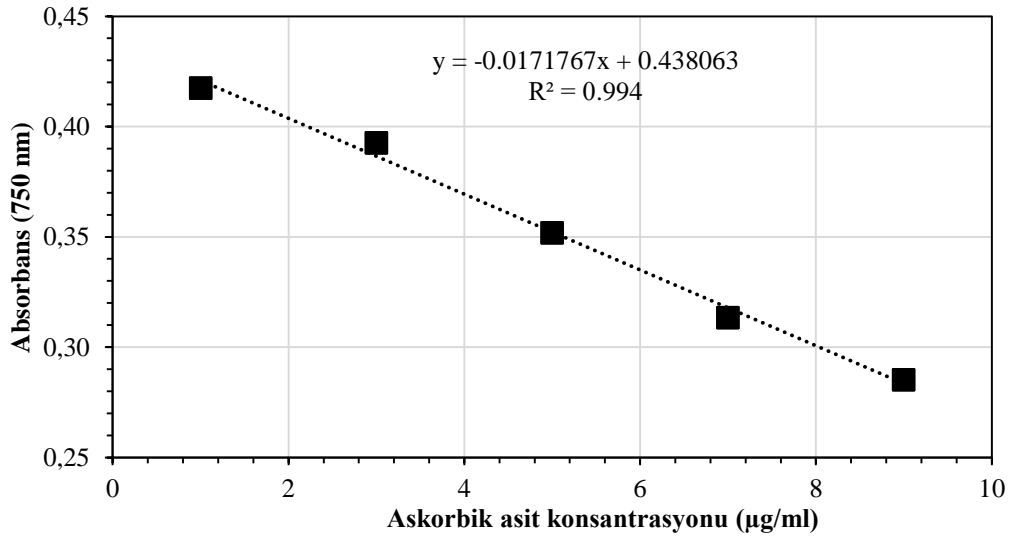
Tablo 2.6. Yumurru ekstralarında ABTS radikali giderme aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Miktar, µl			
	Kör	Kontrol	Standart	Numune
Etanol	240	80	-	-
Ekstre	-	-	-	80
Standart	-	-	80	-
ABTS radikali çözeltisi, 7 mM	-	160	160	160

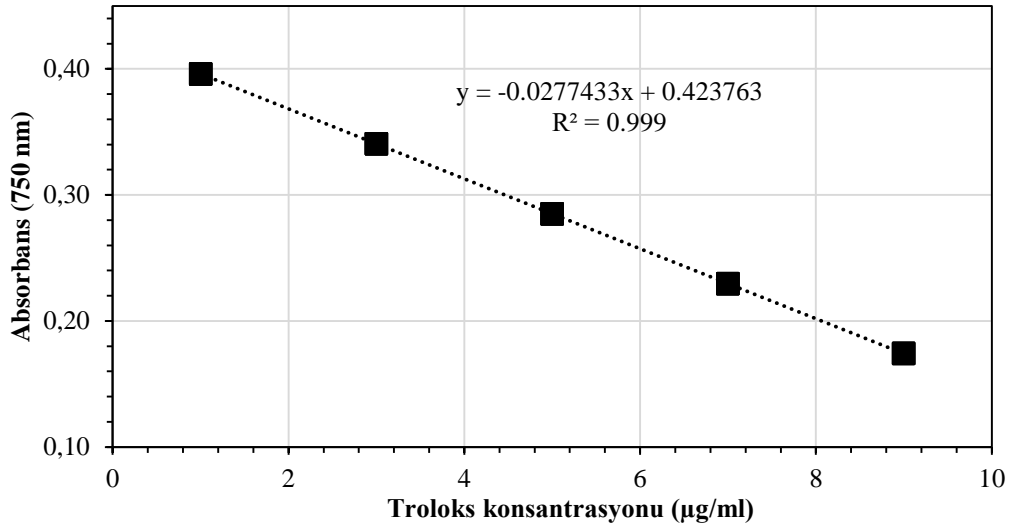
ABTS radikali çözeltisi 1:37 oranında seyreltilerek optik yoğunluk değerinin (OD) 0.7 olması sağlandı.

Oda sıcaklığında, karanlıkta 6 dakika inkübe edildi.

750 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile köre karşı absorban ölçümü yapıldı.



Şekil 2.10. ABTS radikali giderme aktivite tayini için askorbik asit ile hazırlanan standart grafiği



Şekil 2.11. ABTS radikali giderme aktivite tayini için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği

Ekstrelerin ABTS radikali giderme aktivitesi yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) değeri olarak da verildi. Bu amaçla yumru ekstrelerinin 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarının spektrofotometrik ölçümler sonrasında elde edilen absorbans değerleri ile Eşitlik 2.1 yardımıyla % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneğin Tablo 2.7'de verilen ekstre konsantrasyonları ve % inhibisyon değerleri ile lineer grafik çizildi (Şekil 2.12.). Şekil 2.12'deki grafik eğrisine ait eğri denklemleri kullanılarak kloroform ekstresinin IC_{50} değeri, 0.7693 mg/ml olarak hesaplandı. Askorbik asit ve troloks standart çözeltilerinin 1, 3, 5, 7, 9 µg/ml'lik konsantrasyonları ile aynı işlemler gerçekleştirilerek standart çözeltilerinin IC_{50} değerleri tespit edildi. Sonuçlar mg/ml olarak verildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_{kontrol} - A_{ekstre})}{A_{kontrol}} * 100 \quad (2.1)$$

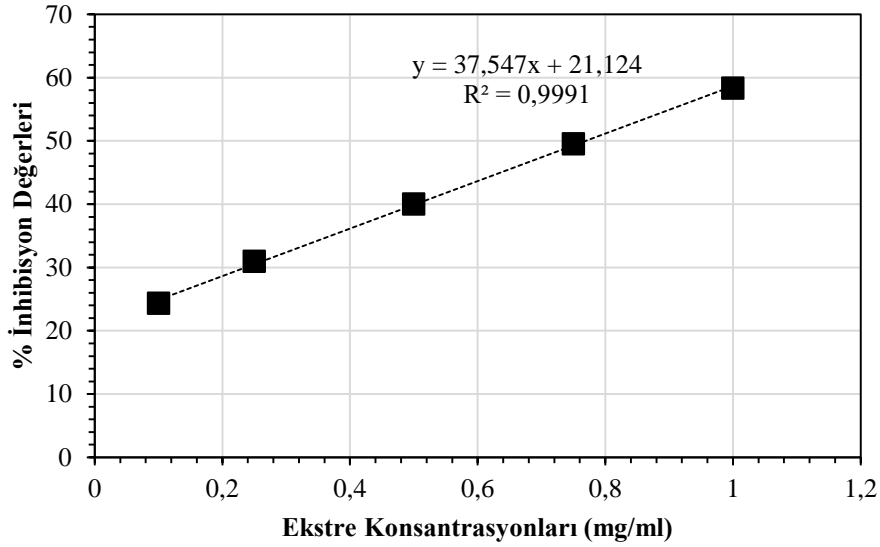
Bu eşitlikte;

$A_{kontrol}$; Kontrol absorbans değeri

A_{ekstre} ; Yumru ekstresinin absorbans değeri

Tablo 2.7. Kloroform ekstresine (K) ait absorbans ve % inhibisyon değerleri

Örnek ve Kontrol	Absorbans Değeri	%İnhibisyon Değerleri
K 0.10 mg/ml	0.3248	24.3299
K 0.25 mg/ml	0.2962	30.9951
K 0.50 mg/ml	0.2574	40.0372
K 0.75 mg/ml	0.2167	49.5222
K 1.00 mg/ml	0.1788	58.3546
Kontrol	0.4294	-



Şekil 2.12. Kloroform ekstresi konsantrasyonları % inhibisyon grafik eğrisi

2.2.8.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini

Ekstrelerin DPPH radikali süpürme aktivitesi Brand-Williams vd. (1995) tarafından geliştirilen yöntemde küçük değişiklikler yapılarak mikroplakalarda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Acet ve Özcan, 2018). Yapılan pipetlemeler Tablo 2.8'de özetlendi. Askorbik asit ve troloks için 1-9 µg/ml konsantrasyon aralığında (1, 3, 5, 7, 9) askorbik asit ve troloks standart eğrileri oluşturuldu. Ekstrelerin 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanıldı. Ekstrelerin DPPH radikali süpürme aktivitesi Şekil 2.13. ve

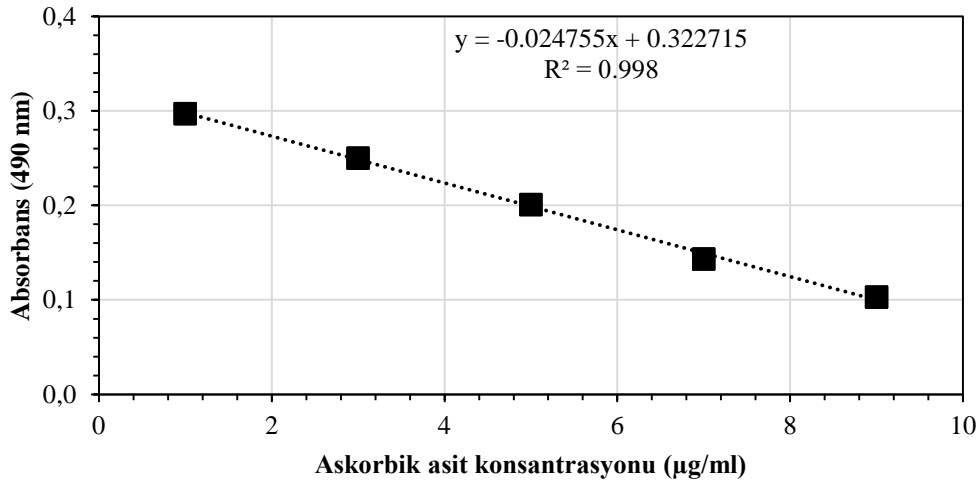
2.14'teki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı. Ayrıca ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi IC₅₀ değeri olarak da verildi. Bu amaçla yumru ekstrelerininin 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 mg/ml'lik konsantrasyonları kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Sonuçlar mg/ml olarak verildi.

Tablo 2.8. Yumru ekstrelerinde DPPH radikali süpürme aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

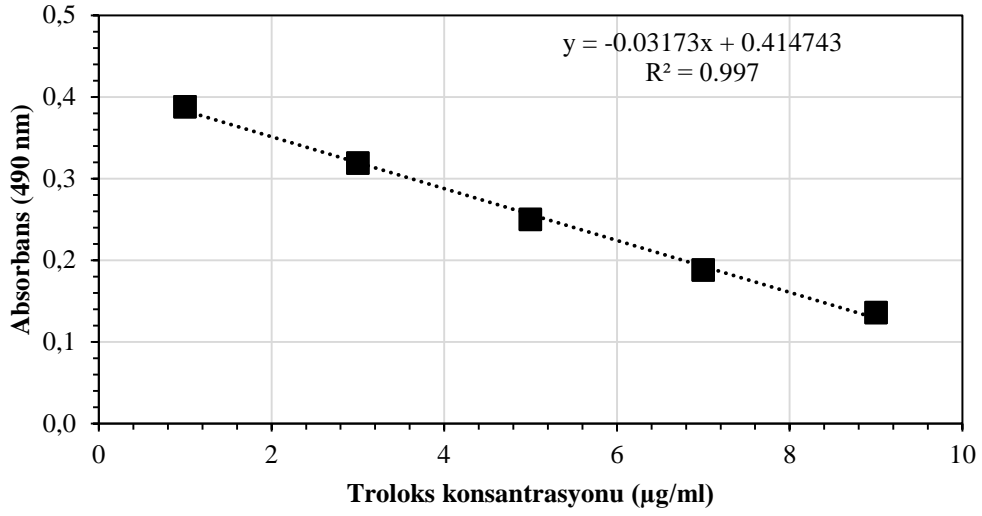
	Miktar, µl			
	Kör	Kontrol	Standart	Numune
Etanol	250	125	-	-
Ekstre	-	-	-	125
Standart	-	-	125	-
DPPH radikali çözeltisi, 0.1 mM	-	125	125	125

Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

490 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu ile köre karşı absorban ölçümü yapıldı.



Şekil 2.13. DPPH radikali süpürme aktivite tayini için askorbik asit ile hazırlanan standart eğri grafiği

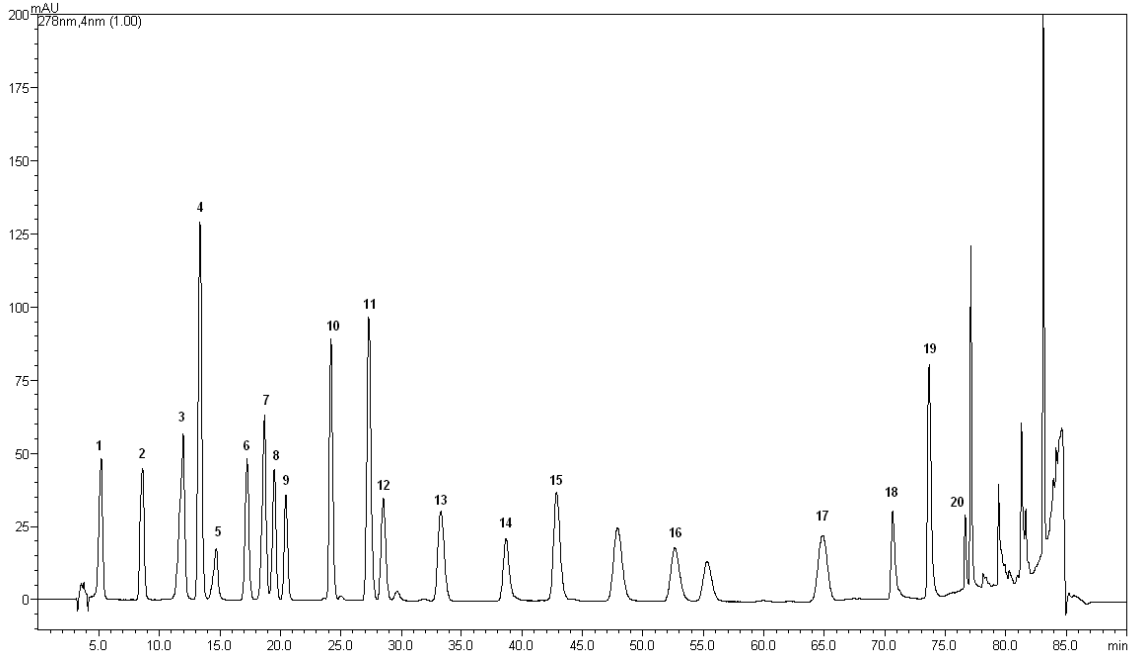


Şekil 2.14. DPPH radikali süpürme aktivite tayini için troloks ile hazırlanan standart eğri grafiği

2.2.9. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi ile Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarı en yüksek olan etil asetat ekstresinin (10 mg/ml) fenolik bileşen analizi gerçekleştirildi. Analiz kapsamında, Shimadzu Marka HPLC cihazı ile orkidelerde yaygın olarak görülen 20 adet fenolik bileşiğe bakıldı. Gallik asit, protokatekuik asit, kateşin, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, şiringik asit, vanilin, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, benzoik asit, rutin, rosmarinik asit, sinnamik asit, kuersetin, luteolin ve kaemferol fenolik bileşiklerinin içeriklerine ilişkin sonuçlar µg/g ekstre olarak verildi.

Analiz için pompa (LC-10 ADvp), degazör ünitesi (DGU-14A), otosampler (SIL-10 ADvp) ve detektör (DAD, λ max=278) içeren Shimadzu Marka HPLC sistemi ve Agilent Eclipse XDB-C18 (250×4.60 mm, 5 µm partikül 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 2.15'teki standart kromatogramına göre okumalar yapıldı. Bu analiz, hizmet satın alınarak Süleyman Demirel Üniversitesi YETEM Uygulamalı Temel Bilimler ve Teknolojileri Araştırma Birimi'nde yaptırıldı.



1:gallik asit 2:protokateşuik asit 3:kateşin 4:*p*-hidroksi benzoik asit 5:klorojenik asit 6:kafeik asit 7:epikateşin 8:şiringik asit 9:vanilin 10:*p*-kumarik asit 11:ferulik asit 12:sinapik asit 13:benzoik asit 14:*o*-kumarik asit 15:rutin 16:rosmarinik asit 17:sinamik asit 18:kuarsetin 19:luteolin 20:kamferol

Şekil 2.15. HPLC analizinde kullanılan standart kromotogramı







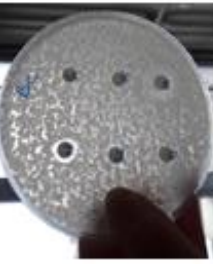

2.2.10. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir mikroorganizma türüne karşı in-vitro etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanır. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılır. Uygulama kolaylığı ve maliyet açısından en sık kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Bu test, kağıt disklere emdirilen antimikrobiyal ajanın, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanır. Ayrıca antimikrobiyal ajanların minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılır. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikropkaya kuyucuklarında üremenin gözle görülebilir olması esas alınır. Bu kapsamda ekstrelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için difüzyon yöntemlerinden disk difüzyon ve dilüsyon yöntemlerinden ise mikrodilüsyon yöntemi tercih edildi (CLSI 2006; Kahlmeter vd., 2003; Kahlmeter vd., 2006).

2.2.10.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Ekstrelerin 10 mg/ml konsantrasyon stokları kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite tayin edildi (CLSI, 2007). Bu tez çalışmasında 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) ve 7 adet fungus (2 maya, 5 küf) olmak üzere toplam 13 mikroorganizma test mikroorganizma olarak kullanıldı (Tablo 1.1.). Bakteriler, mayalar ve küfler için disk difüzyon yöntemi aşamaları Şekil 2.16'da şematize edildi.



Bakteriler ve Mayalar		Küfler	
<p>Bakteri ve maya test organizmalarının taze kültürleri daha önceden hazırlandı. Sterilize edilmiş distile su bulunan tüplere öze yardımıyla ilgili mikroorganizmalar eklenerek 0.5×10^8 MacFarland bulanıklığına (1.5×10^8 kob/ml) seyreltildi.</p>			<p>Küf test organizmalarının taze kültürleri daha önceden hazırlandı.</p>
<p>Bakteri ve mayalar eküvyon yardımıyla MHA bulunan petrilere inoküle edildi. Test organizma uygulanmış petrilere üzerine 6 mm çapında steril boş diskler yerleştirildi. Her disk üzerine $200 \mu\text{g}$ ekstre solüsyonları ile pozitif kontrol olarak bakteriler ve mayalar için aynı miktarda kloramfenikol antibiyotigi emdirildi.</p>			<p>Küfler iğne öze yardımıyla PDA bulunan petrilere inoküle edildi. Test organizma uygulanmış petrilere üzerine 6 mm çapında steril boş diskler yerleştirildi. Her disk üzerine $200 \mu\text{g}$ ekstre solüsyonları ile pozitif kontrol olarak aynı miktarda nistatin antibiyotigi emdirildi.</p>
<p>Petirler $4 \text{ }^\circ\text{C}$'de 2 saat bekletilerek, ekstre solüsyonlarının ve kontrol olarak kullanılan antibiyotigim agara difüze olması sağlandı. Daha sonra bakteri ve maya bulunan petrilere $37 \text{ }^\circ\text{C}$'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı.</p>			<p>Petirler $4 \text{ }^\circ\text{C}$'de 2 saat bekletilerek, ekstre solüsyonlarının ve kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin agara difüze olması sağlandı. Daha sonra küf bulunan petrilere $28 \text{ }^\circ\text{C}$'de, 48 saat inkübasyona bırakıldı.</p>
<p>48 saat sonra petrilere disk etrafında oluşan zonlar cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedildi.</p>			<p>48 saat sonra petrilere disk etrafında oluşan zonlar cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedildi.</p>

Şekil 2.16. Disk difüzyon yöntemi

2.2.10.2. Mikrodilüsyon Yöntemi

Yapılan disk difüzyon testi sonuçlarına göre kullanılan mikroorganizmalar üzerine inhibisyon zonu oluşturan ekstrelerin, 96'lık mikropalakalarda mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK değerleri belirlendi (CLSI, 2007). Bitki ekstrelerinden DMSO kullanılarak 40 mg/ml stok solüsyonlar hazırlandı. Pozitif kontrol olarak 1-1024 µg/ml aralığında seri iki kat dilüsyonla hazırlanan 10 farklı konsantrasyondaki kloramfenikol antibiyotiği kullanıldı. Taze kültürleri hazırlanan test organizmalarının (*Bacillus cereus* RSKK 709; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ATCC 29998, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Candida albicans* DSMZ 5817, *Candida tropicalis* NRRL YB-366) konsantrasyonları 0.5 MacFarland standardına (1.5×10^8 kob/ml) göre ayarlandı. Mikropalakada her kuyucuğa 100 µl MHB dağıtıldı ve ilk kuyucuğa 100 µl 16.4 mg/ml konsantrasyonundaki bitki ekstreleri eklendi. 100 µl'ye ayarlanmış çoklu pipet yardımıyla ilk kuyucuktan itibaren Şekil 2.17'de görüldüğü gibi seri dilüsyon işlemi yapılarak her bir kuyucuğun madde konsantrasyonu yarıya indirildi (8.2-0.5125 mg/ml). Seri dilüsyon tamamlandıktan sonra negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara 10 µl mikroorganizma eklendi ve 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda inhibisyon olup olmadığı kontrol edildi ve mikroorganizmaların büyümesini engelleyen en düşük ekstre konsantrasyonları MİK değeri olarak belirlendi.



Şekil 2.17. Seri dilüsyon işlemi

2.3. İstatistiksel Analizler

Tüm ölçümler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Sonuçlar SPSS (version 11.5 for Windows 2000, SPSS Inc.) programında, One-way ANOVA ile hesaplandı ve önemli farklılıklar Duncan'ın çoklu sıra testleri ile belirlenip $p<0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. Ekstre Verimi

Bitki ekstraksiyonu için farklı polaritelerde beş çözügen kullanıldı. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisi yumruları ile elde edilen kloroform, etil asetat, metanol, etanol ve hekzan ekstre verimleri Tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisi yumrularının ekstre verimleri ve çözügenlerin polarite dereceleri

Ekstraksiyon çözügeni	% Verim	RP
Kloroform ekstresi (K)	0.44	0.259
Etil asetat ekstresi (EA)	0.50	0.228
Metanol ekstresi (M)	2.83	0.762
Etanol ekstresi (E)	0.95	0.654
Hekzan ekstresi (H)	0.40	0.009

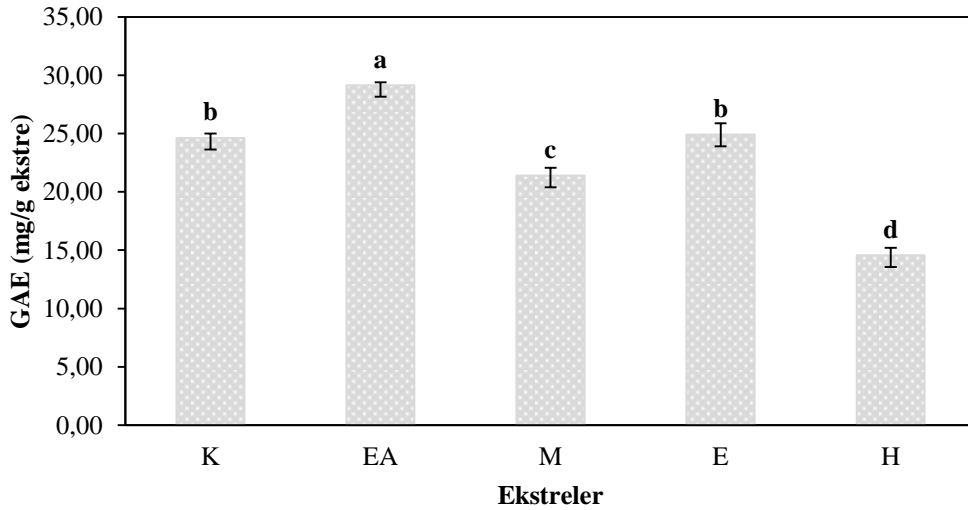
3.2. Toplam Fenolik Madde Tayini Sonuçları

Ekstrelerin toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocaltaeu yöntemi ile analiz edildi. Toplam fenolik madde miktarı Şekil 2.6’daki standart eğri grafiği referans alınarak gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g ekstre) olarak hesaplandı (Tablo 3.2. ve Şekil 3.1.).

Tablo 3.2. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı sonuçları

Ekstre	mg GAE/g ekstre
K	24.62±0.38 ^b
EA	29.15±0.24 ^a
M	21.40±0.68 ^c
E	24.91±0.95 ^b
H	14.56±0.63 ^d

± standart sapma, üç analizin ortalaması, sütunlardaki harfler p<0.05 istatistiksel düzeyde ekstrere arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.



a, b, c, d Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.1. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrere gallerik asite eşdeğer toplam fenolik madde miktarları

3.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini Sonuçları

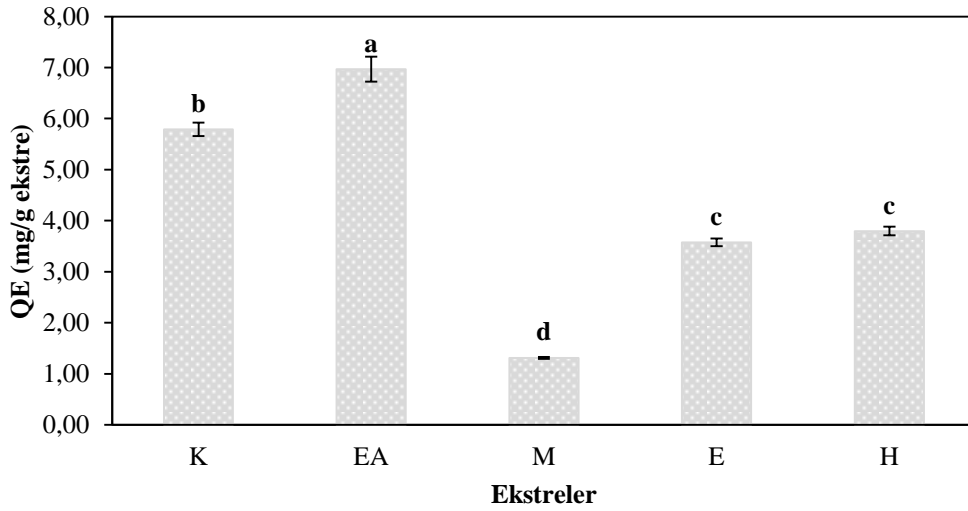
Ekstrelerin toplam flavonoid madde içeriği alüminyum nitrat kolorimetrik yöntemi ile analiz edildi. Toplam flavonoid madde miktarı Şekil 2.7'deki standart eğri grafiği

referans alınarak kuersetin eşdeğeri (mg QE/g ekstre) olarak hesaplandı (Tablo 3.3. ve Şekil 3.2.).

Tablo 3.3. Ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları

Ekstre	mg QE/g ekstre
K	5.79±0.13 ^b
EA	6.97±0.25 ^a
M	1.31±0.02 ^d
E	3.58±0.08 ^c
H	3.80±0.09 ^c

± standart sapma, üç analizin ortalaması, sütunlardaki harfler p<0.05 istatistiksel düzeyde ekstreler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.



a, b, c, d Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.2. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin kuersetine eşdeğer toplam flavonoid madde miktarları

3.4. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları

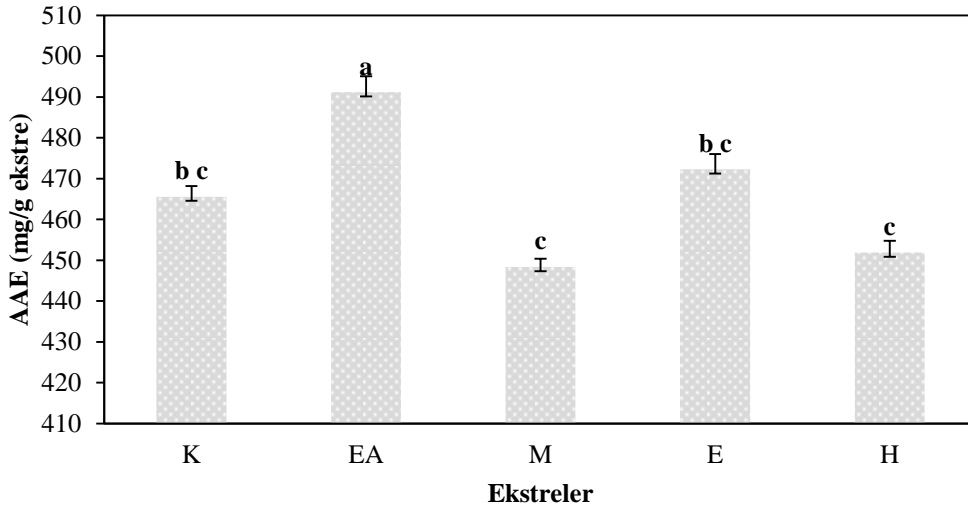
3.4.1. Fosfomolibdat Yöntemi Tayini Sonuçları

Ekstrelerin toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibdat yöntemi ile analiz edildi. Toplam antioksidan kapasite Şekil 2.8. ve 2.9'daki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı (Tablo 3.4., Şekil 3.3. ve 3.4.).

Tablo 3.4. Ekstrelerin toplam antioksidan kapasite (Fosfomolibdat) sonuçları

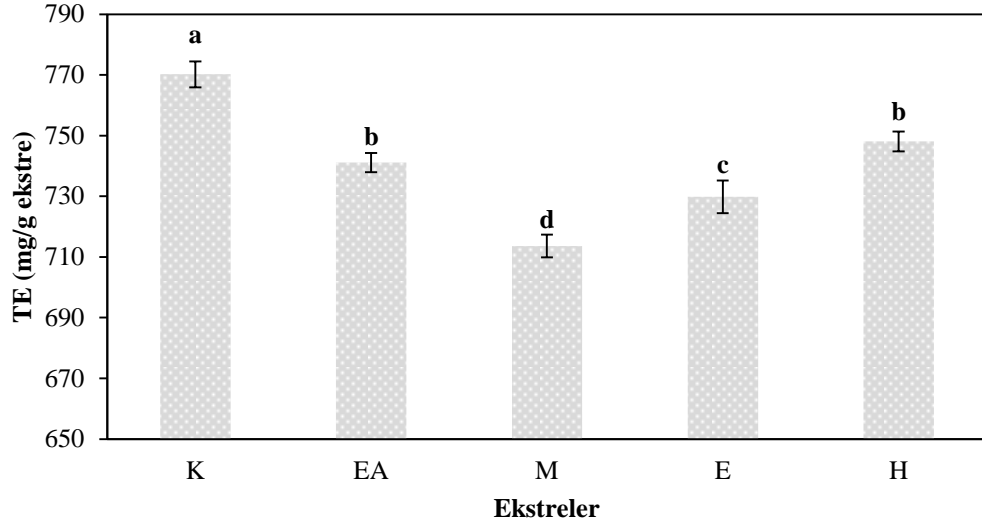
Ekstreler	mg AAE/g ekstre	mg TE/g ekstre
K	466±2.67 ^{b,c}	770±4.30 ^a
EA	491±3.92 ^a	741±3.19 ^b
M	448±2.04 ^c	714±3.74 ^d
E	472±3.78 ^{b,c}	730±5.40 ^c
H	452±2.89 ^c	748±3.24 ^b

± standart sapma, üç analizin ortalaması, sütunlardaki harfler p<0.05 istatistiksel düzeyde ekstreler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.



a, b, c Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.3. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin askorbik asite eşdeğer toplam antioksidan kapasite sonuçları



a, b, c, d Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.4. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer toplam antioksidan kapasite sonuçları

3.5. Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

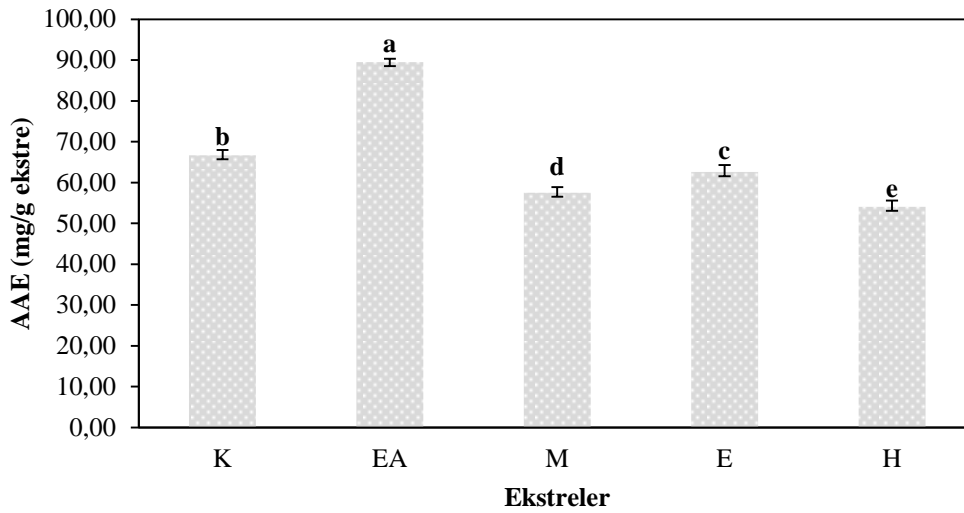
3.5.1. ABTS Radikali Giderme Aktivite Tayini Sonuçları

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi ABTS radikali giderme aktivite tayini ile analiz edildi. ABTS radikali giderme aktiviteleri Şekil 2.10. ve 2.11'deki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı (Tablo 3.5., Şekil 3.5. ve 3.6.). Ayrıca ekstrelerin ABTS radikali giderme aktivitesi IC_{50} değeri (mg/ml) olarak verildi (Tablo 3.5. ve Şekil 3.7.).

Tablo 3.5. Ekstrelerin antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları ve IC₅₀ değerleri

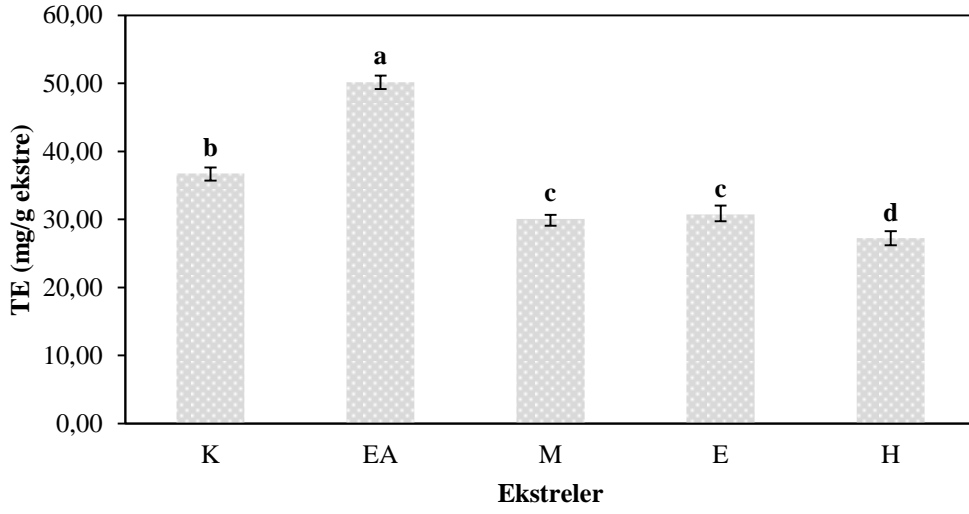
Ekstreler ve standartlar	mg AAE/g ekstre	mg TE/g ekstre	IC ₅₀ mg/ml
K	66.69±1.29 ^b	36.73±0.93 ^b	0.76±0.006 ^c
EA	89.49±0.83 ^a	50.17±0.96 ^a	0.35±0.003 ^c
M	57.50±1.37 ^d	30.06±0.63 ^c	0.65±0.005 ^d
E	62.59±1.68 ^c	30.74±1.28 ^c	0.64±0.005 ^d
H	54.06±1.53 ^e	27.22±1.04 ^d	1.74±0.009 ^f
Troloks	-	-	0.07±0.001 ^b
Askorbik asit	-	-	0.02±0.001 ^a

± standart sapma, üç analizin ortalaması, sütunlardaki harfler p<0.05 istatistiksel düzeyde ekstrere arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.



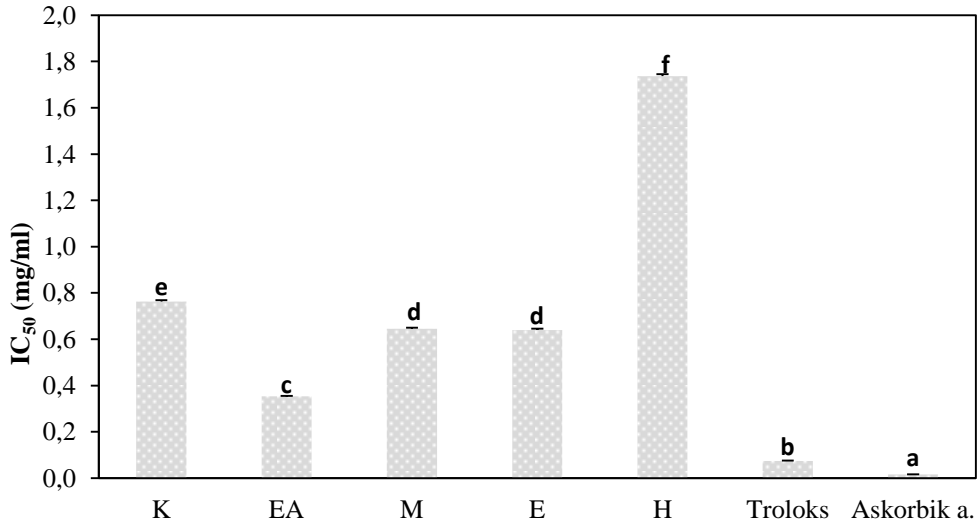
a, b, c, d, e Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.5. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrere askorbik asite eşdeğer antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları



a, b, c, d Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.6. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer antioksidan aktivite (ABTS) sonuçları



a, b, c, d, e, f Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.7. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin ve standartların ABTS radikali giderme aktivitesine ilişkin IC₅₀ değerleri

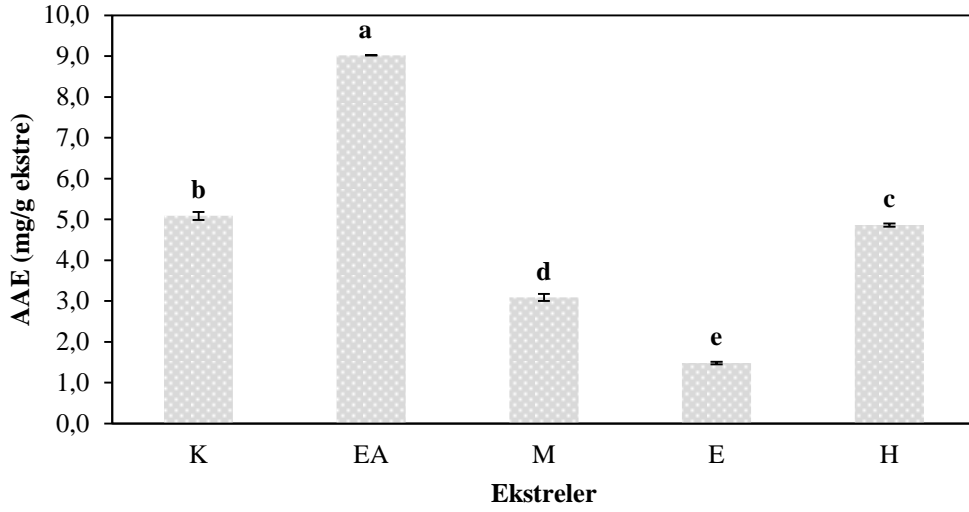
3.5.2. DPPH Radikali Süpürme Aktivite Tayini Sonuçları

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi DPPH radikali süpürme aktivite tayini ile analiz edildi. DPPH radikali süpürme aktiviteleri Şekil 2.13. ve 2.14'teki standart eğri grafikleri referans alınarak askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/g ekstre) ve troloks eşdeğeri (mg TE/g ekstre) olarak hesaplandı (Tablo 3.6., Şekil 3.8. ve 3.9.). Ayrıca ekstrelerin ABTS radikali giderme aktivitesi IC₅₀ değeri (mg/ml) olarak verildi (Tablo 3.6. ve Şekil 3.10.).

Tablo 3.6. Ekstrelerin antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları ve IC₅₀ değerleri

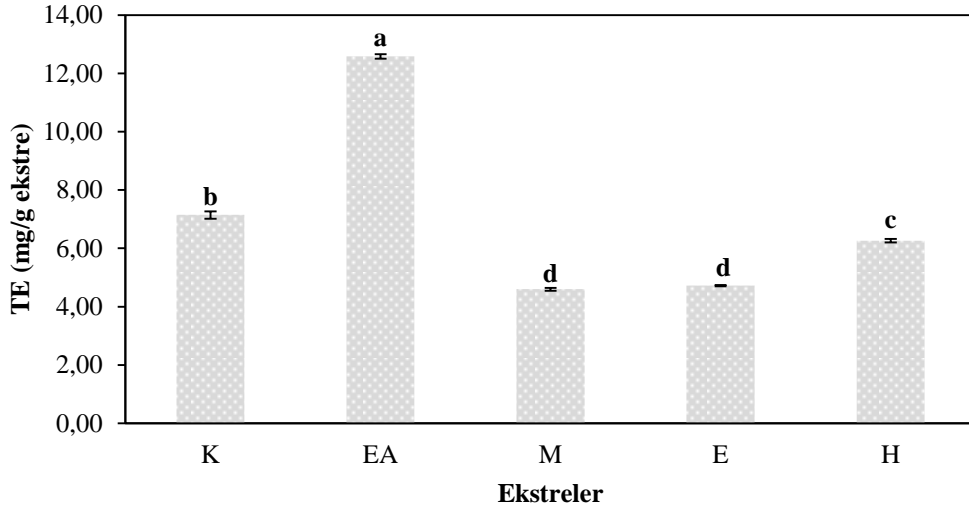
Ekstreler ve standartlar	mg AAE/g ekstre	mg TE/g ekstre	IC ₅₀ mg/ml
K	5.09±0.10 ^b	7.15±0.13 ^b	1.21±0.010 ^e
EA	9.02±0.01 ^a	12.58±0.08 ^a	0.20±0.001 ^c
M	3.09±0.08 ^d	4.60±0.05 ^d	1.32±0.005 ^f
E	1.48±0.03 ^e	4.72±0.03 ^d	1.53±0.004 ^g
H	4.86±0.04 ^c	6.26±0.06 ^c	0.98±0.004 ^d
Troloks	-	-	0.07±0.002 ^b
Askorbik asit	-	-	0.06±0.001 ^a

± standart sapma,  analizin ortalaması, stnlardaki harfler p<0.05 istatistiksel düzeyde ekstreler arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir.



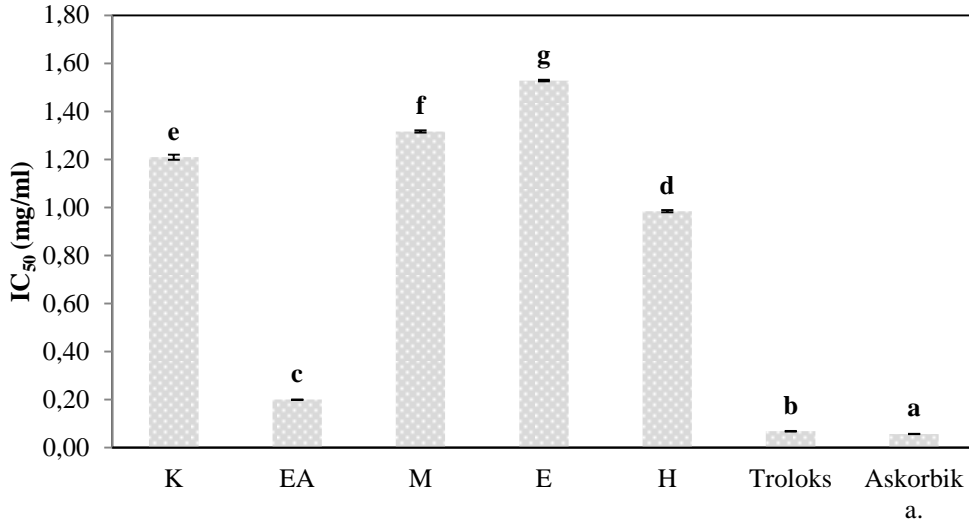
a, b, c, d, e Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.8. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin askorbik aside eşdeğer antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları



a, b, c, d Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.9. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstrelerin troloksa eşdeğer antioksidan aktivite (DPPH) sonuçları

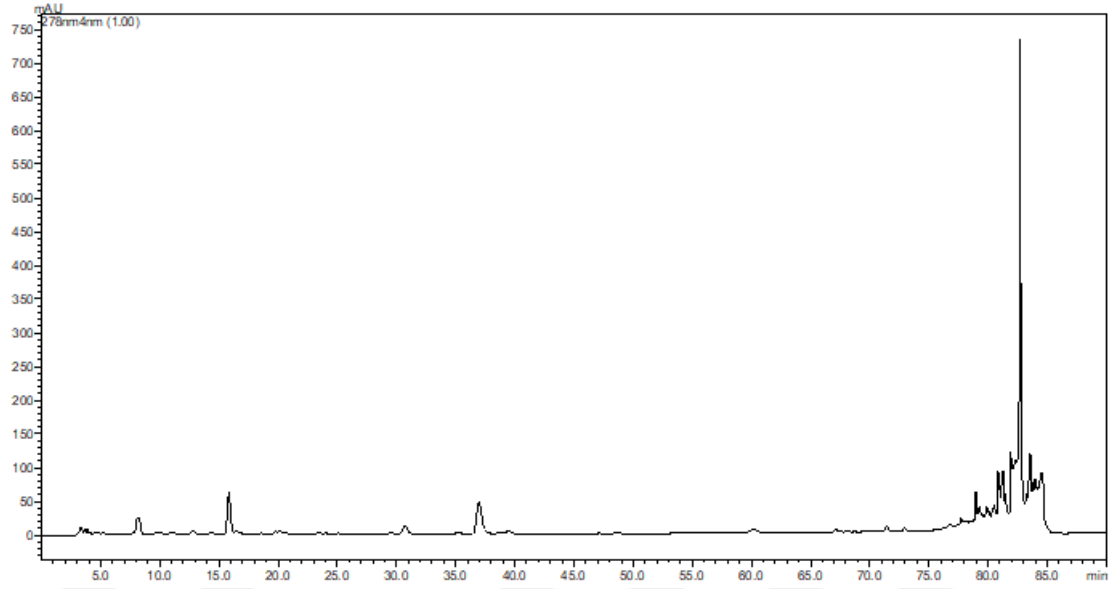


a, b, c, d, e, f, g Aynı sütunda farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Şekil 3.10. Farklı çözücülerle hazırlanmış *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait ekstraların ve standartların DPPH radikali süpürme aktivitesine ilişkin IC₅₀ değerleri

3.6. HPLC Analizi ile Fenolik Madde İçeriği Sonuçları

Toplam fenolik madde miktarı bakımından en yüksek içeriğe sahip etil asetat ekstresinin fenolik bileşenleri HPLC ile analiz edildi. Şekil 2.15'teki standart kromotogramına göre okumalar yapıldı. Şekil 3.11'deki numune kromotogramından elde edilen sonuçlar $\mu\text{g/g}$ ekstre olarak Tablo 3.7'de verildi.



Şekil 3.11. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'ya ait etil asetat ekstresinin HPLC kromotogramı

Tablo 3.7. Etil asetat ekstresinin fenolik bileşen içeriği

Sıra No	Fenolik bileşen	İçerik ($\mu\text{g/g}$ ekstre)
1	Gallik Asit	*
2	Protokatekuik Asit	750.4 \pm 5.01
3	Kateşin	*
4	<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	152.2 \pm 5.16
5	Klorojenik asit	50.9 \pm 3.04
6	Kafeik asit	*
7	Epikateşin	*
8	Şiringik asit	2.9 \pm 0.40
9	Vanilin	18.2 \pm 1.01
10	<i>p</i> -kumarik asit	6.1 \pm 0.51
11	Ferulik asit	*
12	Sinapik asit	*
13	Benzoik asit	1455.3 \pm 10.03
14	<i>o</i> -kumarik asit	*
15	Rutin	*
16	Rosmarinik asit	*
17	Sinnamik asit	63.5 \pm 3.69
18	Kuersetin	*
19	Luteolin	175.3 \pm 5.01
20	Kaempferol	*

Sonuçlar üç paralelin ortalaması alınarak ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

*Tespit edilemedi.

3.7. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Sonuçları

3.7.1. Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile tayin edildi. Bu tez çalışması kapsamında 3 adet Gram (+), 3 adet Gram (-) bakteri ve 7 adet fungus (2 maya, 5 küf) olmak üzere toplam 13 mikroorganizma (Tablo 1.1.) ve kontrol olarak kloramfenikol kullanıldı. İnkübasyon sonrasında disk etrafında oluşan inhibisyon zonlarına ilişkin sonuçlar (mm) Tablo 3.8’de verildi. Küf mikroorganizmalarına karşı herhangi bir ekstrede inhibisyon görülmediği için bu sonuçlara Tablo 3.8’de yer verilmedi.

Tablo 3.8. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon) sonuçları

	İnhibisyon zon çapı (mm)					
	K	EA	M	E	H	KF
Ekstreler ve antibiyotikler						
<i>Gram (+) bakteri</i>						
<i>Bacillus cereus</i> (RSKK 709)	9	-	-	-	8	14
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	8	-	-	-	-	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	7	12
<i>Gram (-) bakteri</i>						
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 29998)	9	8	7	7	7	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	8	-	-	-	7	15
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC 17802)	7	7	-	-	-	12
<i>Fungus (maya)</i>						
<i>Candida albicans</i> (DSMZ 5817)	9	9	-	-	-	12
<i>Candida tropicalis</i> (NRRL YB-366)	10	-	-	-	-	12

*KF: Kloramfenikol antibiyotiği

3.7.2. Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

Yapılan disk difüzyon testi sonuçlarına göre kullanılan mikroorganizmalar üzerine inhibisyon zonu oluşturan ekstrelerin MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi ile tayin edildi. Sonuçlar mg/ml olarak Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.9. Ekstrelerin antimikrobiyal aktivite (MİK) sonuçları

	MİK (mg/ml)					
	K	EA	M	E	H	KF
Ekstreler ve antibiyotikler						
<i>Gram (+) bakteri</i>						
<i>Bacillus cereus</i> (RSKK 709)	0.5125	-	-	-	1.025	0.016
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	8.2	-	-	-	-	0.128
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	8.2	0.016
<i>Gram (-) bakteri</i>						
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 29998)	8.2	8.2	4.1	8.2	8.2	0.016
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	8.2	-	-	-	8.2	0.032
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (ATCC 17802)	8.2	8.2	-	-	-	0.064
<i>Fungus (maya)</i>						
<i>Candida albicans</i> (DSMZ 5817)	0.5125	0.5125	-	-	-	0.016
<i>Candida tropicalis</i> (NRRL YB-366)	0.5125	-	-	-	-	0.016

4. TARTIŞMA

Oksidatif stres, organizmanın yapı elemanlarını bozarak olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu etkileri bertaraf etmek için vücuda dışarıdan antioksidanların alınması gerekmektedir (Valko vd., 2006). Bu kapsamda yeterli miktarda antioksidan alımı ile serbest radikallerin artışıyla doğrudan ilişkili olan hastalıklardan kurtulmak mümkün olabilir. Dolayısı ile oksidan kaynaklı hastalıkların görülme riskini azaltmak, daha kaliteli ve uzun yaşam için antioksidanlar önemli bir savunma mekanizması olarak tavsiye edilmektedir (Kasapçopur ve Birdane, 2014; Karabulut ve Gülay, 2016). Bilimsel çalışmalar, sentetik antioksidanların toksik etkileri nedeniyle özellikle fenolik bileşikler içeren bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Okan vd., 2014).

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve bunları yeni üyelerine aktarmaktadırlar. Bu durum, bir yandan kullanılan antibiyotiklerin kullanım ömrünü sınırlarken, öte yandan da enfeksiyonel hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejiler geliştirme zorunluluğunu gündeme getirmektedir (Erdoğan ve Everest, 2013). Sentetik olarak üretilen ilaçların tek bir aktif madde içermesi nedeniyle mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanması kolaylaşırken, bitkilerde bulunan aktif maddelerin diğer maddelerle kompleks halinde bulunması mikroorganizmaların bu yapılara karşı çoklu direnç kazanmasını güçleştirmektedir (Tenover, 2006, Kürek, 2007). Dolayısıyla bitkilerin yapısında bulunan çok sayıda bileşimin oluşturduğu sinerjik etki ile enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve tek tip antibiyotiğe karşı direnç kazanan mikroorganizmaların yok edilmesinde, bitkisel kaynaklı ilaçların sentetik ilaçlara göre daha etkin bir tedavi sağladığı belirtilmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Orkidelerden elde edilen bileşikler de bitkisel kaynaklı ilaç olarak kullanılmaktadır. Dünya genelinde orkidelerin farklı bitki kısımlarının çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı görülmektedir (Maridass ve GhanthiKumar 2008; Hossain, 2009; Kala ve Senthilkumar, 2010; Hossain, 2011; Marasini ve Joshi, 2012; Bhattacharjee ve Islam, 2015; Biswas vd., 2016; Schuster vd., 2016; Bose vd., 2017; Auberon vd., 2018). Fakat bilimsel anlamda orkidelerin tıbbi etkilerini ortaya koyan ve orkidelerde bulunan bileşenler hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle orkidelerle tıbbi uygulamaların kabul görmesi için içeriğinde bulunan bileşenlere ilişkin daha çok çalışma yapılması

gerekmektedir (Cribb vd., 2009). Bu tez çalışmasında, halk arasında tedavi amacıyla kullanılan *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesine ait yumruların; toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi, antioksidan aktivitesi, fenolik madde içeriği ve ayrıca antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Burada ele alınan orkide türü ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu araştırma, *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica*'nın biyolojik aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde tamamen özgün veriler ortaya koymuştur.

Çalışmamızda kullanılan yumru ekstreleri farklı polaritelerde beş çözügen kullanılarak elde edilmiştir. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* bitkisi yumruları ile elde edilen kloroform, etil asetat, metanol, etanol ve hekzan ekstre verimleri ve çözügenlerin polarite dereceleri Tablo 3.1'de verilmiştir. Tablo verileri değerlendirildiğinde etil asetat ekstre verimi sonucu hariç tutulduğunda polarite derecesi arttıkça ekstre veriminin arttığı söylenebilir [Polarite derecesi: Hekzan (0.009) < Etil Asetat (0.228) < Kloroform (0.259) < Etanol (0.654) < Metanol (0.762); Ekstre verimi: %: Hekzan (0.40) < Kloroform (0.50) < Etil Asetat (0.44) < Etanol (0.95) < Metanol (2.83)]. Bu durum “Benzer benzeri çözer.” ilkesine dayanarak yumru ekstresinin polar bileşenlerce zengin olduğunu düşündürmektedir (Montes vd., 2003). Dolayısıyla ekstraksiyonda su gibi daha polar bir çözügen kullanılması ekstre verimini arttırabilir. Dalar vd.'nin (2015) yaptığı çalışmada etanolik bazlı liyofilize ekstraksiyon ile *Dactylorhiza chuhensis*'e ait yumru veriminin %19.8 (DW) olduğu bildirilmiştir. Bu sonuç çalışmamızda elde edilen ekstre verimlerine göre oldukça yüksektir. Bu orkideye ait yumru ekstre veriminin arttırılması için liyofilize ekstraksiyon yöntemlerine benzer çalışmalar yapılabilir.

Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntemin esası fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü indirgeme reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda oluşan mavi rengin absorbansının ölçülmesiyle hesaplama yapılmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Slinkard ve Singleton, 1977). Tablo 3.2'deki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek içeriğin etil asetat ekstresinde (29.15 ± 0.24^a mg GAE/g ekstre), en düşük içeriğin ise hekzan ekstresinde (14.56 ± 0.63^d mg GAE/g ekstre) olduğu görülmüştür. Orchidaceae familyasına ait bitkilerde; Kanlayavattanakul vd. (2018)'nin yaptıkları çalışmada *Dendrobium* orkidelerine ait çiçeklerin etanol (%70 v/v) ve sulu

ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 9.220 ± 0.140 , 10.310 ± 0.320 (g GAE/100 g ekstre), Aliyazıcıoğlu vd. (2018)'nin çalışmasında ise *Dactylorhiza osmanica*'nın toprak üstü aksamında 20.6 ± 0.3785 mg GAE/g ekstre olarak raporlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan orkide yumrularına ait etil asetat ekstralarının toplam fenolik madde miktarı, *Dactylorhiza osmanica*'nın toprak üstü aksamı ekstralarına göre daha yüksek olmakla beraber, *Dendrobium* orkidelerinin çiçek ekstralarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Dalar vd.'nin (2015) yaptıkları çalışmada *Dactylorhiza chusensis*'e ait yumruların metanol ekstralarının ve Paltinean vd.'nin (2017) yaptıkları çalışmada, *Dactylorhiza maculata*'ya ait yumruların etanol (%70 v/v) ekstralarının toplam fenolik madde miktarları sırasıyla, 13.9 ± 0.6^c mg GAE/g DW ve 2.76 ± 0.21 mg GAE/g DW olarak raporlanmıştır. Her iki çalışmada da bu orkidelere ait toprak üstü aksamı ekstralarının, yumru ekstralarının toplam fenolik madde miktarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Giri vd.'ye (2012) göre tıbbi bir orkide olan *Habernaria edgeworthii* bitkisinin doğal yumrularının metanol ekstralarında toplam fenolik madde miktarı 5.28 ± 0.06 mg GAE/g DW olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bitki büyüme düzenleyicileri ile muamele edilen kallus süspansiyon kültürlerinin toplam fenolik madde miktarı bitkinin doğadan toplanılan yumruları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada elde edilen bulgulara göre metil jasmonat uygulanan kalluslarda fenolik madde miktarı yaklaşık üç kat artmıştır (14.70 ± 0.72^a mg GAE/g DW). Bu açıdan bakıldığında, tez çalışması kapsamında değerlendirilen orkide türünün biyoteknolojik uygulamalar yardımıyla fenolik madde içeriğinin arttırılabileceği ve bu sayede doğal kaynakların korunmasına da yardımcı olunabileceği düşünülmektedir.

Ekstrelerin toplam flavonoid madde içeriği alüminyum nitrat kolorimetrik yöntemi ile analiz edilmiştir. Tablo 3.3'teki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek içeriğin etil asetat ekstresinde (6.97 ± 0.25^a mg QE/g ekstre), en düşük içeriğin ise metanol (1.31 ± 0.02^d mg/QE g ekstre) ekstresinde olduğu görülmüştür. Paltinean vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *D. maculata*'nın toprak üstü aksamı ve yumru etanol ekstralarının toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla 2.69 ± 0.29 ve 0.46 ± 0.05 (mg QE/g DW) olarak bulunmuştur.

Ekstrelerin toplam antioksidan kapasitesi fosfomolibdat yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntem, antioksidan maddelerin asidik ortamda Mo(VI)'i Mo(V)'e indirgemesi ve oluşan yeşil renkli fosfat/Mo(V) kompleksin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. (Zengin

vd., 2014). Tablo 3.4'teki sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek içeriğin etil asetat ekstresinde (491 ± 3.92^a mg AAE/g ekstre) ve kloroform ekstresinde (770 ± 4.30^a mg TE/g ekstre) olduğu görülmüştür. En düşük toplam antioksidan kapasite ise metanol ekstrelerinde sırasıyla (448 ± 2.04^c mg AAE/g ekstre) ve (714 ± 3.74^d mg TE/g ekstre) olarak bulunmuştur. Literatürde Orchidaceae familyasına ait bitkilerde toplam antioksidan kapasitenin aynı yöntemle değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışma sonuçları kendi içinde değerlendirilmiştir.

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi ABTS ve DPPH radikal giderme aktivite tayinleri ile analiz edilmiştir. Bitkilerin antioksidan aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda en az bir serbest radikal kullanılarak bu radikalın bitki özütü tarafından ne oranda giderildiği hesaplanmaktadır. Bu radikaller içerisinde en yaygın olanları elektron transferi ile indirgenen ABTS ve DPPH radikalleridir. Stabil radikaller olan ABTS ve DPPH sırasıyla koyu mavi/yeşil ve mor renklidir. Antioksidan varlığında radikallerin rengindeki açılma spektrofotometrik olarak ölçülür (Uysal vd., 2016; Büyüktuncel, 2014).

Tablo 3.5'teki ABTS analiz sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek aktivitenin etil asetat ekstresinde (89.49 ± 0.83^a mg AAE/g ekstre, 50.17 ± 0.96^a mg TE/g ekstre) ve en düşük aktivitenin ise hekzan ekstresinde (54.06 ± 1.53^e mg AAE/g ekstre, 27.22 ± 1.04^d mg TE/g ekstre) olduğu görülmüştür. Tablo 3.6'daki DPPH analiz sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek aktivitenin etil asetat ekstresinde (9.02 ± 0.01^a mg AAE/g ekstre, 12.58 ± 0.08^a mg TE/g ekstre) ve en düşük aktivitenin ise etanol (1.48 ± 0.03^e mg AAE/g ekstre, 4.72 ± 0.03^d mg TE/g ekstre) ve metanol (4.60 ± 0.05^d mg TE/g ekstre) ekstresinde olduğu görülmüştür. Giri vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada *Habernaria edgeworthii* bitkisinin antioksidan aktiviteleri ABTS, DPPH metodları ile tayin edilmiştir. ABTS değerleri; doğal yumrulara 1.78 ± 0.05 mM AAE/100 g, kallus kültürlerinde ise 6.62 ± 0.00 - 6.71 ± 1.13 mM AAE/100 g, DPPH değerleri doğal yumrulara 1.14 ± 0.05 mM AAE/100 g, kallus kültürlerinde ise 1.09 ± 0.06 - 1.16 ± 0.00 mM AAE/100 g bulunmuştur.

Ekstrelerin ve standartların ABTS ve DPPH radikali giderme aktiviteleri IC_{50} değeri olarak da verilmiştir (Tablo 3.5 ve 3.6). IC_{50} değerinin düşük değerde olması ekstrenin ya da standartların ABTS ve DPPH radikali giderme aktivitelerinin yüksek olduğunu göstermektedir. ABTS analizi sonucu doğal bir antioksidan olan askorbik asit ve yapay bir antioksidan olan troloks standartlarının IC_{50} değerleri sırasıyla 0.02 ± 0.001^a mg/ml ve 0.07 ± 0.001^b mg/ml olarak bulunmuştur. Ekstreler için ABTS yöntemi ile belirlenen IC_{50}

değerleri 0.35 ± 0.003^c ve 1.74 ± 0.009^f mg/ml arasında bulunmuştur. Etil asetat ekstresinin (0.35 ± 0.003^c) ABTS radikali giderme aktivitesi, diğer ekstrlerden önemli derecede yüksektir. ABTS radikali giderme aktivitesi bakımından etil asetat ekstresini etanol>metanol>kloroform>hekzan ekstrleri takip etmektedir. DPPH analizi sonucu askorbik asit ve troloks standartlarının IC_{50} değerleri ise sırasıyla 0.06 ± 0.001^a mg/ml ve 0.07 ± 0.002^b mg/ml olarak bulunmuştur. Ekstreler için DPPH yöntemi ile belirlenen IC_{50} değerleri ABTS yöntemi sonuçlarına paralellik göstermiş ve en düşük IC_{50} değeri ile en yüksek aktivite etil asetat ekstresinde (0.20 ± 0.001^c mg/ml), en yüksek IC_{50} değeri ile en düşük aktivite etanol ekstresinde (1.53 ± 0.004^g mg/ml) tespit edilmiştir. Etil asetat ekstresinin (0.20 ± 0.001^c mg/ml) DPPH radikali giderme aktivitesi, diğer ekstrlerden önemli derecede yüksektir. Etil asetat ekstresini hekzan>kloroform>metanol>etanol ekstrleri takip etmektedir. Ancak, etil asetat ekstresinin ABTS ve DPPH radikali giderme aktivitesi, standartlarla karşılaştırıldığında ise düşüktür.

Kanlayavattanakul vd.'nin (2018) çalışmasına göre *Dendrobium* orkidelerine ait çiçeklerin etanol (%70 v/v) ve sulu ekstrlerinin IC_{50} değerleri ABTS metoduna göre sırasıyla (IC_{50} , mg/ml) 103.563 ± 1.289 , 113.621 ± 1.986 , DPPH metoduna göre sırasıyla (IC_{50} , mg/ml) 124.703 ± 0.987 , 144.807 ± 14.483 olarak raporlanmıştır. Buna göre bu çalışmada kullanılan *Dactylorhiza romana subsp. georgica* bitkisi yumru ekstrlerinin *Dendrobium* orkidelerine ait çiçeklerin antioksidan aktivitesine göre oldukça yüksek olduğu söylenebilir. Aliyazıcıoğlu vd.'ye (2018) göre *Dactylorhiza osmanica*'nın toprak üstü kısımlarında DPPH yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri 0.1838 ± 0.0015 mg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda DPPH yöntemi ile belirlenen IC_{50} değeri (0.20 ± 0.001^c mg/ml) bu sonuca oldukça benzerlik göstermektedir.

Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbirinin yerine kullanılırlar. Fakat aktivite, spesifik bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalin miktarının ölçüsüdür. Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez (MacDonald-Wicks, 2006). Farklı antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki reaksiyonlar farklı hız sabitlerine sahiptir ve bu yüzden numunenin antioksidan kapasitesi farklı oksidanlarla değişir (Ghiselli vd., 2000). Ölçümde kullanılan analitik metotlar ve analizin olduğu koşullar da aynı numune için, farklı sonuçlara neden olabilir

(Büyüktuncel, 2013). Çalışmamızda elde edilen sonuçların antioksidan kapasite ve antioksidan aktivite değerlerinin bazı durumlarda farklı olma gerekçesi bu şekilde açıklanabilir.

Toplam fenolik madde miktarı bakımından en yüksek içeriğe sahip etil asetat ekstresi, orkidelerde görülen 20 adet fenolik bileşenin standart kromotogramları dikkate alınarak (Şekil 3.11.) HPLC ile analiz edilmiştir. En yaygın kullanılan analitik tekniklerden biri olan HPLC analizi, bir karışımdaki bileşenlerin tanımlanmasında sıvı hareketli faz kullanılarak, bileşenlerin çözündürülüp, yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçirilmesi esasına dayanır. Böylece saf hallerinde alıkonma zamanları belirlenen bileşenlerin standart kromotogramlarına göre numune karışımının kompozisyonu belirlenir (Sani vd., 2011). Tablo 3.7'deki sonuçlar değerlendirildiğinde etil asetat ekstresinde dokuz fenolik bileşenin bulunduğu görülmüştür. Etil asetat ekstresinde en fazla bulunan fenolik bileşenin benzoik asit (1455.3 µg/g ekstre), en az bulunan bileşenin ise şiringik asit (2.9 µg/g ekstre) olduğu tespit edilmiştir. Miktar bakımından benzoik asit içeriğini (µg/g ekstre) protokatekuik asit (750.4) > luteolin (175.3) > *p*-hidroksi benzoik asit (152.2) > sinnamik asit (63.5) > klorojenik asit (50.9) > vanilin (18.2) > *p*-kumarik asit (6.1) takip etmektedir. Paltinean vd.'ye (2017) göre HPLC-MS ile analiz edilen. *D. maculata*'nın toprak üstü aksamında en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşenin isokuersitrin, (518.6±3.7 µg/g DW), daha sonra takip eden bileşenin kuersitrin (474.6±4.34 µg/g DW) olduğu; ferulik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit ve kaempferol bileşenlerine de rastlandığı ancak düşük miktarda bulunduğu, yumrulara ise çalışılan fenolik bileşenler içerisinde herhangi birisine rastlanmadığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise yumru ekstralarında bazı fenolik bileşenlerin bulunması dikkat çekicidir. Aliyazıcıoğlu vd.'ye (2018) göre *Dactylorhiza osmanica*'nın toprak üstü kısımlarında RP-HPLC analizi ile tespit edilen fenolik bileşiklerden bazılarının benzoik asit (289.123 mg/l), protokatekuik asit (1006 mg/l), *p*-hidroksi benzoik asit (1472 mg/l), vanilin (0.694 mg/l), *p*-kumarik asit (3133 mg/l) olduğu bildirilmiştir. Etil asetat ekstresinde en fazla bulunan fenolik bileşenin benzoik asit olduğu görülmüştür. Benzoik asit ve tuzları antimikrobiyal özellikleri nedeniyle gıdalarda en sık kullanılan katkı maddelerindedir. Ucuz ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle daha çok sentetik olarak üretilirler. Çeşitli meyve suları, alkolsüz içecekler gibi asidik gıdalarda antimikrobiyal gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Öztürkcan ve Acar, 2017). Benzoik asit ve tuzları daha çok küf ve mayalara karşı etkilidir. Benzoik asitin etkinliği pH

4.5'in üzerinde azaldığından bakterilere karşı kullanılması tavsiye edilmez (Robach, 1980; Küçükçetin vd., 2008). Çalışmamız kapsamında orkide yumrularına ait ekstraktların *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermesinin, içeriğinde bulunan benzoik asitten kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Polihidroksifenollerden olan protokatekuik asit, bir monofenol olan *p*-kumarik asite göre daha güçlü bir süpürücü olmakla birlikte her ikisi de antioksidan aktiviteye sahiptir (Cuvelier vd., 1992; Dai ve Mumper, 2010; Jitan vd., 2018). Protokatekuik asit ve *p*-kumarik asitlerin gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği (Alves vd., 2013; Villalobos vd., 2016), patojenik *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Cueva vd., 2010; Alves vd., 2013). *p*-kumarik asitin bakterilerin genomik DNA'sına bağlanarak hücresel fonksiyonlarını inhibe ettiği ve bakterilerin ölümüne sebep olduğu raporlanmıştır (Heleno vd., 2015). Ayrıca, Bose vd. (2017), protokatekuik asit ve *p*-kumarik asitin antitirozinaz, antiinflamatuvar ve antiproliferatif etkilerinden bahsetmiştir. Protokatekuik asitin farklı kanser türlerine sitotoksik etki yaparak antikanser etki gösterdiği (Gomes vd., 2003; Yi vd., 2005; Verma vd., 2013), Tip 2 diyabette rol oynayan α -amilaz ve α -glukozidazın etkinliğini inhibe ettiği bildirilmiştir (Adefegha vd., 2015; Iswandana vd., 2016).

p- hidroksi benzoik asitin lösemi hücrelerinde apoptozisi uyardığı, göğüs kanserinde kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği, α -glukozidaz ve pankreatik α -amilaz enzimini inhibe ettiği raporlanmıştır (Yen vd., 2018; Nemeç vd., 2017; Ho vd., 2017).

Luteolinin, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser etkilerinin olduğu ve prooksidan enzimlerin inhibisyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Jollow vd., 1974; Ali vd., 2013).

Sinnamik asit esterlerinin, ultraviyole (UV) ışınlarını filtre edici özelliğe sahip olduğu ve bu nedenle UV ışınları ve serbest radikallerden kaynaklanan yaşlanmaya karşı yaşlılık belirtilerinin oluşmasını geciktirdiği bildirilmiştir (Şen, 2016).

Klorojenik asit esterlerinin en güçlü serbest radikal süpürücülerinden olduğu (Matsuzoe vd., 1999; Dias, 2012) ve aynı zamanda buldukları maddeye antimikrobiyal ve antiviral aktivite kazandırdığı bildirilmiştir (Matsuzoe vd., 1999).

Vanilin antioksidan, antiinflamatuvar etkileri nedeniyle nöron koruyucu olarak görev yaptığı ve iskemia hastalığının önlenmesine yardımcı olduğu raporlanmıştır (Gupta ve Sharma, 2014).

Şiringik asitin enflamasyon görülen ratlarda sitokin seviyesini düşürdüğü, enflamasyonu baskıladığı ve antienflamatuar olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Itoh vd., 2009).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir mikroorganizma türüne karşı *in vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanır. Uygulama kolaylığı ve maliyet açısından en sık kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Bu test, kağıt disklere emdirilen antimikrobiyal ajanın, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanır. Ayrıca antimikrobiyal ajanların MİK değerlerinin tespit edilmesi için dilüsyon yöntemleri kullanılır. Dilüsyon testlerinde, antimikrobiyal ajanın dilüsyonlarını içeren mikrop laka kuyucuklarında üremenin gözle görülebilir olması esas alınır. Bu kapsamda ekstrelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için difüzyon yöntemlerinden disk difüzyon ve dilüsyon yöntemlerinden ise mikrodilüsyon yöntemi tercih edilmiştir (CLSI 2006; Kahlmeter vd., 2003; Kahlmeter vd., 2006). Tablo 3.8’de disk difüzyon testi sonuçları verilmiştir. Küflere karşı herhangi bir ekstrede inhibisyon gözlemlenmemiştir. Ekstrelere ait antimikrobiyal aktivite denemelerinde kloroform ekstresinin *L. monocytogenes* hariç tüm mikroorganizmalara karşı 7-10 mm aralığında inhibisyon zonu gösterdiği tespit edilmiştir. Metanol ve etanol ekstrelerinde ise sadece *E. coli*’ye karşı 7 mm inhibisyon zonu gözlemlenmiştir. Öte yandan çalışmamızda kullanılan tüm ekstrelerin *E. coli*’ye karşı 7-9 mm inhibisyon zonu oluşturduğu görülmektedir. *E. coli*’nin bağırsaklarda ishale yol açtığı (Ustaçelebi, 1999) düşünüldüğünde yerel halkın bu orkideye ait yumruları toz haline getirerek ishale karşı kullanması, yumruların *E. coli*’ye karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktiviteden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Kloroform ekstresi en yüksek inhibisyon zonu ile gram (+) bakterilerden *B. cereus*’a (9 mm, kontrol:14 mm) ve gram negatif bakterilerden *E. coli*’ye (9 mm, kontrol:12 mm) karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Cueva vd. (2010), protokatekuik asit ve *p*-kumarik asitlerin patojenik *E. coli* mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ettiğini bildirilmiştir. Çalışmamız kapsamında orkide yumrularına ait etil esetat ekstresinin bu iki fenolik bileşeni içeriyor olması *E. coli*’ye karşı antimikrobiyal aktivitede etkili olabileceğini düşündürmektedir. Genel bir değerlendirme yapıldığında ise ekstrelerin bakterilerden ziyade daha çok maya türlerine (*C. albicans*, kloroform ve etil esetat ekstreleri: 9 mm); (*C. tropicalis* (kloroform ekstresi: 10 mm) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği dikkat çekmektedir. Fırsatçı patojenler olarak bilinen *Candida* türleri

insanlarda deri ve tırnak enfeksiyonlarına, pişiğe, ağız ve vajinal kandidiyazına neden olmaktadır (Devkatte vd., 2005; Omran ve Esmailzadeh, 2009; Chai vd., 2010; Olama vd., 2013). Çalışma kapsamında orkideye ait yumruların yerel halk tarafından yara ve çıban iyileştirici olarak kullanılması bu bitkinin *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Aliyazıcıoğlu vd.'nin (2018) çalışmasında *Dactylorhiza osmanica*'nın toprak üstü aksamı metanol ekstralarının (500 µg konsantrasyonda) *S. aureus*'a 8 mm (kontrol ampisilin:10 mm), *B. cereus*'a 8 mm (kontrol ampisilin:15 mm) inhibisyon gösterdiği ve çalışmamıza benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Aynı çalışmada ekstralarda *C. albicans*'a karşı inhibisyon gözlemlenmezken (kontrol: flukonazol 25 mm), kendi çalışmamızda kloroform ve etil asetat ekstralarında *Candida* türlerine karşı inhibisyon zonu gözlemlenmesi dikkat çekmektedir. Avasthi vd.'ye göre (2013), bir orkide türü olan *Orchis latifolia*'nın hekzan ekstralarının (50 µg konsantrasyonda) *C. albicans*'a karşı 9 mm inhibisyon zonu gösterdiği bildirilmiş ve çalışmamıza benzer veriler elde edilmiştir. Marasini ve Joshi (2012) tarafından 11 farklı epifitik orkide ile gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite çalışmasında toprak üstü aksamı etanol ekstralarının (250 µg konsantrasyonda) sırasıyla *E. coli*'ye 8-10 mm, *S. aureus*'a 8-13 mm, *K. pneumoniae*'ye 8-12 mm, *C. albicans*'a karşı 8-10 mm inhibisyon zonu oluşturduğu bildirilmiştir. Bahse konu çalışmadaki bulgulara göre ilgili mikroorganizmalara karşı benzer ya da daha düşük aktivite elde edildiği görülmüştür. Bhattacharjee ve Islam (2015)'a göre, *Rhynchostylis retusa* orkidesine ait metanol ve kloroform ekstralarının (200 µg konsantrasyonda) sırasıyla *S. aureus*'a 8.4-10 mm (kontrol: streptomisin 22.2 mm), *E. coli*'ye 9-10.2 mm (kontrol: streptomisin 22.6 mm), *K. pneumoniae*'ye karşı 10.4-10.7 mm (kontrol: streptomisin 24.6 mm) inhibisyon zonu gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan ekstraların, Bhattacharjee ve Islam (2015) tarafından elde edilen bulgulara benzer ya da daha düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Ekstrelerin disk difüzyon testi sonuçlarına göre mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MİK değerleri belirlenmiştir. MİK değeri bir mikroorganizmanın üremesinin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonu olarak tanımlanır (Kahlmeter vd., 2006). Dolayısıyla ekstraların MİK değerinin düşük olması antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Mikrodilüsyon denemelerde ekstraların 8.2-0.5125 mg/ml seri dilüsyonları kullanılmıştır. Tablo 3.9'daki MİK testi sonuçları

değerlendirildiğinde en düşük MİK değeri kloroform ve etil asetat ekstralarında görülmüştür. Kloroform ekstresinde MİK değeri Gram (+) bakterilerden *B. cereus*, mayalardan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için 0.5125 mg/ml olarak bulunmuştur. Etil asetat ekstresinde ise *C. albicans* için MİK değeri 0.5125 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Hekzan ekstresinin *B. cereus* için MİK değeri kloroform ekstresine göre daha yüksektir (1.025 mg/ml). Gram (-) bakterilerden *E. coli* için metanol ekstresinin MİK değeri 4.1 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, Tablo 3.8'deki disk difüzyon sonuçlarına paralel olarak; kloroform ekstresinde *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *V. parahaemolyticus*, etil asetat ekstresinde *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, etanol ekstresinde *E. coli*, hekzan ekstresinde *E. coli* ve *K. pneumoniae* için MİK değeri 8.2 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Marasini ve Joshi'ye göre (2012), bir orkide türü olan *Coelogyne cristata*'nın toprak üstü aksamı etanol ekstralarının *S. aureus* için MİK değeri 31.25 mg/ml olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yumruların kloroform ekstresinde ise MİK değeri 8.2 mg/ml olarak belirlenmiş ve bahse konu çalışmaya göre *S. aureus*'un üremesinin inhibisyonu daha düşük bir konsantrasyonda sağlanmıştır. Paltinean vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *D. maculata*'nın yumru etanol ekstralarının MİK değeri *S. aureus*, *B.cereus* ve *L. monocytogenes* için 0.015 mg/ml, *E. coli* için 0.0078 mg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise farklı bitki ekstralarının ilgili mikroorganizmaların inhibisyonu için gerekli en düşük konsantrasyonlar sırasıyla; 8.2 mg/ml, 0.5125 mg/ml, 8.2 mg/ml ve 4.1 mg/ml'dir. Paltinean vd.'ye göre (2017), çalışmamızda kullanılan ekstraların antimikrobiyal aktivitesi önemli düzeyde düşüktür. Sandrasagaran vd.'ye göre (2014), *Dendrobium crumenatum* orkidesine ait yalancı yumruların metanol ekstralarının MİK değerleri sırasıyla *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* için 12.5, 3.125, 6.250 mg/ml olarak raporlanmıştır. Çalışmamızda ise *E.coli*'nin MİK değeri anılan değerlere göre düşüktür (4.1 mg/ml).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yaptığımız tez çalışması kapsamında *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidesine ait yumrulardan elde edilen kloroform, etil asetat, metanol, etanol ve hekzan ekstralarının fenolik ve flavonoid madde miktarı analiz sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek sonuçlar etil asetat ekstresinde belirlenmiştir.

2. Ekstrelerde fosfomolibdat testi ile belirlenen en yüksek toplam antioksidan kapasiteye etil asetat ve kloroform ekstralarında, en yüksek DPPH ve ABTS radikali süpürücü aktivite ise etil asetat ekstresinde tespit edilmiştir. Antioksidan kapasite ve aktivite sonuçları arasında korelasyon olduğu görülmüştür.

3. En yüksek fenolik içeriğe sahip etil asetat ekstresinde yapılan HPLC analizi ile antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkileri rapor edilen dokuz adet fenolik bileşen tespit edilmiştir. Yumrulara bulunan fenolik bileşenlerin biyoteknolojik araçlar vasıtasıyla saflaştırılması bu bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal etkinliklerini daha net bir şekilde ortaya koyacaktır.

4. Disk difüzyon yöntemi ile ekstraların çalışmada kullanılan küflere karşı herhangi bir inhibisyon göstermediği tespit edilmiştir. Öte yandan çalışmada kullanılan tüm bakterilere karşı farklı düzeyde antimikrobiyal aktivite görülürken, mayalara karşı daha yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.

5. Mikrodilüsyon testi ile belirlenen MİK değeri en düşük kloroform ve etil asetat ekstralarında tespit edilmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktivite Gram (+) bakterilerden *B. cereus*, mayalardan *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı görülmüştür.

6. Orkideye ait yumru ekstralarının özellikle mayalara karşı göstermiş olduğu antifungal aktivite, bu yumruların yerel halk tarafından yara ve çıban tedavisinde kullanımını desteklemektedir. Ayrıca tüm bitki ekstralarının *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etki göstermesi, yumruların toz halinde ishal önleyici olarak kullanımını doğrulamaktadır. *K. pneumoniae*'ye karşı görülen antimikrobiyal aktivite, bu yumruların soğuk algınlığına karşı balgam söktürücü olarak kullanımını desteklemektedir.

7. Salep kalitesi açısından ticari değeri yüksek olan yumruların, antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin tespit edilmiş olmasının, bu bitkiye ilave katma değer sağlayabileceği düşünülmektedir.

8. Çalışmada, ekstraksiyon öncesi yumrular geleneksel usule uygun olarak kaynatılarak kurutulmuştur. Kaynatma ile kaybedilebilecek bileşiklerin incelenebilmesi için başka bir çalışmada yumrular herhangi bir işleme tabi tutulmadan kurutularak ekstraksiyona hazırlanabilir.

9. Yumruların ekstraksiyon verimini arttırmak için çalışmada kullanılan çözümlerin polarite derecesinden daha yüksek çözümler veya su kullanılabilir. Bunun yanında liyofilize temelli ekstraksiyon yöntemleri ile çalışılabilir.

10. Bu orkidinin çiçek, yaprak, gövde ve yumru ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ayrı ayrı belirlenerek çalışma kapsamı genişletilebilir. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi için farklı yöntem ve standartlar kullanılabilir.

11. Yumru ekstraktlarının farklı *Candida* türleri ile mayalara karşı antifungal aktiviteleri araştırılabilir. Ayrıca ekstraktların antimikrobiyal etkinlikleri canlı sistemlerde çalışılmalıdır.

12. Yapılan literatür taramalarında *in vitro* şartlarda kallus kültürlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin doğal kaynaklarına göre oldukça yüksek bulunması, orkide türlerinin biyoteknolojik uygulamalar yardımıyla ticari sekonder metabolit üretiminde kullanılabilmesine işaret etmektedir.

13. Bu orkideye ait yumru ekstraktlarının yüksek biyolojik aktivite göstermesi nedeniyle, biyoteknoloji alanında gıda ve ilaç endüstrilerinde doğal ve alternatif bir kaynak olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Ancak *in vivo* şartlarda yapılan çalışmalar ile tez kapsamında elde edilen bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acarkan, T., Nazlıkul, H. ve Bayram, E., 2014. Bağırsaklarda *Candida albicans*. Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi, 8, 1, 20-25.
- Acet, T. ve Özcan, K., 2018. Aslanpençesi (*Alchemilla Ellenbergiana*) ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8, 1, 113-121.
- 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. Pak. J. Bot., 41, 5, 2129–2135.
- Acıbuca, V. ve Bostan Budak, D., 2018. Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 33, 1, 37-44.
- Adebamowo, C.A., Cho, E., Sampson, L., Katan, M.B., Spiegelman D., Willett W.C. ve Holmes, M.D., 2005. Dietary flavonols and flavonol-rich foods intake and the risk of breast cancer. Int. J. Cancer, 114, 4, 628–633.
- Adefegha, S.A., Oboh, G., Ejakpovi, I.I. ve Oyeleye, S.I., 2015. Antioxidant and antidiabetic effects of gallic and protocatechuic acids: a structure–function perspective. Comp. Clin. Pathol., 24, 6, 1579–1585.
- Ahmad, F., Nidadavolu, P., Durgadoss, L. ve Ravindranath, V., 2014. Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. Free Radic. Biol. Med., 74, 118, 28.
- 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. Biotechnol. Lett., 6, 39, 829–840.
- Ali, M., Abbasi, B.H. ve Haq, I.U., 2013. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. Ind. Crops Prod., 49, 400–406.
- Aliyazıcıoğlu, R., Korkmaz, N., Akkaya, Ş., Şener, S.Ö., Özgen, U. ve Alpaya Karaoğlu, Ş., 2018. *Dactylorhiza osmanica*’nın topraküstü kısımlarında antioksidan, antimikrobiyal ve tirozinaz İnhibisyon aktivitelerinin araştırılması. Fırat Tıp Dergisi, 23, 2, 50-57.
- Altındağ, E., Sevgi, E., Kara, Ö., Sevgi, O., Tecimen, H.B. ve Bolat, H., 2012. Comparative morphological, anatomical and habitat studies on *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *romana* and *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó Ex Renz & Taub. (Orchidaceae) in Turkey. Pak. J. Bot., 44, 143-152.

- Alves, M.J., Ferreira I.C., Froufe H.J., Abreu R.M., Martins A. ve Pintado M., 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. J. Appl. Microbiol., 115, 2, 346–357.
- Angelo, P.M., ve Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 66, 1, 232–240.
- Arnao, M.B., Hernandez Ruiz, J., 2006. The physiological function of melatonin in plants. Plant Signal. Behav., 1, 3, 89-95.
- 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, Elsevier, United Kingdom, 153-167p.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Debbache, N. ve Boudaoud, H., 2009. Flavonoids in human health: From structure to biological activity. Curr. Nutr. Food Sci., 5, 4, 225–237.
- Auberon, F., Olatunjobi, O.P., Krisac, S., Herbetted, G., Antheaumea, C., Bontéf, F., Mérillonc, J.M. ve Lobsteina, A., 2018. Arundinosides A-G, new glucosyloxybenzyl 2R-benzylmalate derivatives from the aerial parts of *Arundina graminifolia*. Fitoterapia, 125, 199-207.
- Avasthi, A.S., Ghosal, S. ve Purkayastha, S., 2013. Study of antimicrobial activity of *Orchis latifolia*. International Journal of Pharma. and Bio. Sciences, 4, 4-B, 638-646.
- Ayoub, M., de Camargo, A.C., Shahidi, F., 2016. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. Food Chem., 197, Part A, 221–232.
- Azuma, T., Shigeshiro, M., Kodama, M., Tanabe, S. ve Suzuki, T., 2013. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. J. Nutr., 143, 6, 827–834.
- Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem., 99, 1, 191-203.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D. ve Snyder, S.H., 2002. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99, 16093-16098.
- Bast, A., Haenen, G. ve Goelmen J.A., 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. Am. J. Med., 91, 3, 3, 2-13.
- Beyer, R.E., 1992. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant, Biochem. Cell. Biol., 70, 390-403.

- Beyer, R.E., 1994. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. J. Bioenerg. Biomembr., 26, 349-358.
- Bhattacharjee, B. ve Islam, S.M., 2015. Assessment of antibacterial and antifungal activities of the extracts of *Rhynchosyris retusa blume* - A medicinal orchid. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4, 2, 74-78.
- Biswas, S., Pardeshi, R., Reddy, N.D., Shoja, M.H., Nayak, P.G., Setty, M.M. ve Pai, K.S.R., 2016. *Bulbophyllum sterile* petroleum ether fraction induces apoptosis in vitro ameliorates tumor progression in vivo. Biomedicine&Pharmacotherapy, 84, 1419-1427.
- 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&Photobiology, B: Biology, 173, 686-695.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. ve Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, Food Science and Technology, 28, 25-30.
- Brewer, M.S., 2011. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 10, 221-247.
- Brown G.C. ve Borutaite V., 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. IUBMB Life, 52, 3, 5, 189-195.
- Burt S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in food-a review. Food Microbiol, 94, 223-253.
- Butkhup, L., Chowtivannakul, S., Gaensakoo, R., Prathepha, P. ve Samappito, S., 2016. Study of the phenolic composition of Shiraz red grape cultivar (*Vitis vinifera L.*) cultivated in north-eastern Thailand and its antioxidant and antimicrobial activity. South Afr. J. Enol. Vitic., 31, 2, 89-98.
- Büyüktuncel, E., 2014. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17, 2, 93-103.
- Büyükuslu, N. ve Yiğitbaşı, T., 2015. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. Clinical and Experimental Health Sciences, 5, 3, 197-203.
- Carino-Cortes, R., Alvarez-Gonzalez, I., Martino-Roaro, L. ve Madrigal-Bujaidar, E., 2010. Biol. Pharm. Bull., 33, 697-701.
- Casas-Grajales, S. ve Muriel, P., 2015. Antioxidants in liver health. World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther., 6, 59-72.

- 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.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49, 481-493.
- Chiou, S.Y., Sung, J.M., Huang, P.W. ve Lin, S.D., 2017. Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive properties of *Echinacea purpurea* flower extract and caffeic acid derivatives using in vitro models. *J. Med. Food*, 20, 171–179.
- Choi, K.C., Son, Y.O., Hwang, J.M., Kim, B.T., Chae, M. ve Lee, J.C., 2016. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum*. *Pharm. Biol.*, 55, 611–619.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards), 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7th Informational Supplement, M7- A7, 11, 1.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards), 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th Informational Supplement, M100-S17, 27, 1.
- Cowan M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agent. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 4, 564.
- Cribb, P.J., Kell, S.P., Dixon, K.W. ve Barrett, R.L., 2003. Orchid Conservation: A Global Perspective, Natural History Publications, Kota Kinabalu, Malaysia, 1–24p.
- Cuevaa, C., Moreno-Arribasas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bills, G., Vicente, M.V., Basilio, A., López, C., Requenad, T., Rodríguez, J.M. ve Bartoloméa, B., 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria, *Res. Microbiol.*, 161, 372–382.
- Cuvelier, M.E., Richard, H. ve Berset, C., 1992. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56, 324–325.
- Çağlar, M. ve Demirci, M., (2017). Üzümsü meyvelerde bulunan fenolik bileşikler ve beslenmeadaki önemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7, 11, 18-26.
- Çalışkan, Ö., 2018. Salep Orkideleri, Erol Ofset Yayınları, Samsun, 11-14s.
- Dai, J. ve Mumper, R.J., 2010, Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.

- 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. J. Herb. Med., 5, 77-85.
- Das, S.P. ve Bhattacharjee S.K., 2006. Herbaceous Perennials and Shade Loving Foliage Plants, Pointer, Jaipur, 356p.
- de Zwart, L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M. ve Vermeulen N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1/2, 202-226.
- Delgado, L., Fernandes, I., Gonzalez-Manzano, S., de Freitas, V., Mateus, N. ve Santos-Buelga, C., 2014. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. Food Funct., 5, 797-803.
- Delgoda, L. ve Murray, J.E., 2017. Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites, Elsevier, Jamaica, 93-100p.
- Demple, B., 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. Annu. Rev. Genet., 25, 315-337.
- Descamps-Latscha, B., Drüek, T. ve Witko-Sarsat, V., 2001. Dialysis-induced oxidative stress: Biological aspects, clinical consequences and therapy. Semin. Dial., 14, 193-199.
- Devkotte, A.N., Zore, G.B. ve Karuppayil, S.M., 2005. Potential of plant oil as inhibitors of *Candida albicans* growth. FEMS Yeast Research, 5, 867-873.
- Dias, J.S., 2012. Nutritional quality and health benefits of vegetables: A review. Food and Nutrition Sciences, 3, 1354-1374.
- Diengdoh, R.M., Kumaria, S. ve Das, M.C., 2019. Antioxidants and improved regrowth procedure facilitated cryoconservation of *Paphiopedilum insigne* Wall. *Ex. Lindl.* - An endangered slipper orchid. Cryobiology, 87, 60-67.
- Drel, V.R. ve Sybirna, N., 2010. Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats. Cell Biol. Int., 34, 147-1153.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in physiological control of cell function. Physiol. Rev., 82, 45-97.
- Du, J., Cullen, J.J. ve Buettner, G.R., 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. Biochim. Biophys. Acta, 1826, 2, 443-457.
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J. ve Kulma, A., 2016. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. Int. J. Mol. Sci., 17, 2, 160.

- Efferth, T., 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. Journal of Engineering, 5, 50-59.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı, Ankara (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara, 246s.
- Eliopoulos, G.M., 1992. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs. The Journal of Infectious Diseases, 280, 6.
- 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., 2014. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. Nutr. Res., 24, 851-874.
- Facchini, P.J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. Annu. Rev. Plant Biol., 52, 1, 29-66.
- Fang, X., Yang, C.Q., Wei, Y.K., Ma, Q.X., Yang, L. ve Chen, X.Y., 2011. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. Plant Div. Res. 33, 1, 53-64.
- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. ve El-Baroty G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J Food Prot, 52, 9, 665-667.
- 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.
- Feoli, A.M., Macagnan, F.E., Piovesan, C.H., Bodanese, L.C. ve Siqueira, I.R., 2014. Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: Effects of a single exercise session. Oxid. Med. Cell. Longev., 2014, 8 pages.
- Frei, B. ve Lawson, S., 2008. Vitamin C and cancer revisited. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105, 11037-11038.
- Frei, B., Stocker, R. ve Ames, B.N., 1981. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9748-9752.
- Galati, G. ve O'brien, P.J., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radic. Biol. Med., 37, 287-303.

- García, Lafuente, A., Moro, C., Manchón, N., Gonzalo, Ruiz, A., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M. ve Mateo, Vivaracho, L., 2014. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. Food Chem., 161, 216–223.
- Ghezzi, P., Bonetto, V. ve Fratelli, M., 2005. Thiol-disulfide balance: From the concept of oxidative stress to that of redox regulation, Antioxid. Redox Signal, 7, 7-8, 964-972.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. ve Scaccini C., 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. Free Radical Bio. Med., 29, 11, 1106-1114.
- Giménez, M.J., Valverde, J.M., Valero, D., Guillén, F., Martínez, Romero, D., Serrano, M. ve Castillo, S., 2014. Quality and antioxidant properties on sweet cherries as affected by preharvest salicylic and acetylsalicylic acids treatments. Food Chem., 160, 226–232.
- Giri, L., Dhyani, P., Rawat, S., Bhatt, I.D., Nandi, S.K., Rawal, R.S. ve Pande, V., 2012. In vitro production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. Industrial Crops and Products, 39, 1-6.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. ve Palazo'n, J., 2013. Phenolic Acids in Natural Products: Phtochemistry. Botany and Metabolisim of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Ramawat, K.G. ve Mérillon, J.M. (eds.), Springer, Berlin, pp. 1951-1973.
- Gomes, C.A., da Cruz, T.G., Andrade, J.L., Milhazes, N., Borges, F. ve Marques, M.P.M., 2003. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: A structure–activity study. J. Med. Chem., 46, 25, 5395–5401.
- Gupta, S. ve Sharma, B., 2014. Pharmological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. Pharmacol. Biochem. Behav., 122, 122-135.
- Güder, A., 2008. *Urtica dioica* L. ve *Malva neglecta* Wallr. bitkilerinin ve karışımlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Samsun, 72s.
- Gyawali, R. ve Ibrahim, S.A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. Food Control, 46, 412-429.
- Halliwell B. ve Gutteridge J.M.C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol. Aspects Med., 8, 2, 89-193.
- Halliwell B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). Free Radic. Res., 31, 4, 261-272.

- Halliwell, B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic. Res. Commun., 9, 1-32.
- Harborne J.B. ve Williams C.A., 2002. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55, 6, 481-504.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther., 96, 2-3, 67–202.
- Hayek S.A., Gyawali R. ve İbrahim S.A., 2013. Antimicrobial Natural Products: Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them. Science, Technology and Education. Méndez Vilas, A. (ed.), Formatex, Spain, pp. 910-921.
- Heleno, S.A., Martins, A. Queiroz, M.J. ve Ferreira, I.C., 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. Food Chem., 173, 501–513.
- Himmelfarb, J. ve Hakim, R.M., 2003. Oxidative stress in uremia. Curr. Opin. Nephrol. Hyp., 12, 6, 593-598.
- Ho, G.T., Kase, E.T., Wangenstein, H. ve Barsett, H., 2017. Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. J. Agric. Food Chem., 65, 13, 2677–2685.
- Hossain M.M., 2009. Medicinal aromatic plants. Sci. Biotechnol., 1, 101–106.
- Hossain, M.M., 2011. Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An Overview. Fitoterapia, 82, 2, 102-140.
- Hsu, C.L. ve Yen, G.C., 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. Mol. Nutr. Food Res., 52, 1, 53-61.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem., 53, 6, 1841-1856.
- Iswandana, R., Pham, B.T., van Haften, W.T., Luangmonkong, T., Oosterhuis, D., Mutsaers, H.A.M. ve Olingaa, P., 2016. Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid. Toxicology in Vitro, 32, 261–268.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M. ve Yagi, K., 2009. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. Biol. Pharm. Bull., 32, 7, 1215–1219.
- Iwu, M.M., Duncan, A.R. ve Okunji, C., 1999. New Antimicrobials of Plant Origin. Perspectives on New Crops and New Uses. Janick, J. (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 457-462.

- Jahromi, H.K., Pourahmad, M., Abedi, H.A., Karimi, M. ve Jahromi, Z.K., 2018. Protective effects of salep against isoniazid liver toxicity in wistar rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 8, 1, 239-243.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. ve Puri, S., 2018. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic plants, 9, 26-38.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. ve Adelberg, E.A., 1995. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology, New York, 137-167p.
- Jitan, S.A., Alkhoori, S.A. ve Yousef, L.F., 2018. Phenolic acids from plants: Extraction and application to human health. Studies in Natural Products Chemistry, 58, 389-417.
- Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Zampaglione, N.A. ve Gillette, J.R., 1974. Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. Pharmacology 11, 3, 151-169.
- Jurikova, T., Mlcek, J., Skrovankova, S., Balla, S., Sochor, J., Baron, M. ve Sumczynski, D., 2016. Black Crowberry (*Empetrum nigrum* L.) Flavonoids and their health promoting activity. Molecules, 21, 12, 7-21.
- Kahlmeter, G., Brown, D.F., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P. ve Vatopoulos, A., 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J. Antimicrob. Chemother, 52, 2, 145-148.
- Kahlmeter, G., Brown, D.F., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Soriano, F. ve Stetsiouk, O., 2006. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin. Microbiol. Infect., 12, 6, 501-503.
- Kahraman, A., Serteser, M. ve Köken, T., 2002. Flavonoidler. 2002. Kocatepe Tıp Dergisi, 3, 1-8.
- Kahraman, E., Karakeçe, E., Erdoğan, F., Uluyurt, H., Köroğlu, M. ve Çiftci, İ., 2017. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi. Ortadoğu Tıp Dergisi, 9, 1, 12-18.
- Kala, S. ve Senthilkumar, S., 2010. Antimicrobial activity of *Acanthephippium bicolor*, Lindley. Malaysian Journal of Microbiology, 6, 2, 140-148.
- Kan, A., Ozcelik, B. ve Kartal, M., 2009. In vitro antiviral activities under cytotoxic doses against herpes simplex type-1 and parainfluenza-3 viruses of *Cicer arietinum* L. (Chickpea). Africa J. Pharm. Pharmacol., 3, 12, 627-631.
- Kandemir, A., Osmalı, E., Korkmaz, M., Yolcu H. ve Bayram, B., 2012. Kelkit Florası Görücüye Çıktı, Kelkit Kaymakamlığı, Gümüşhane, 196s.

- 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.
- Karabulut, H. ve Gülay, M., 2016. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1, 1, 65-76.
- Karabulut, H. ve Gülay, M., 2016. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1, 1, 65-76.
- Karik, Ü. ve Öztürk, M., 2009. Türkiye Dış Ticaretinde Tıbbi ve Aromatik Bitkiler. Bahçe, 38, 1, 21-31.
- Kasapçopur Özel, G. ve Birdane, Y., 2014. Antioksidanlar. Kocatepe Veteriner Dergisi, 7, 2, 41-52.
- Kashani, H.H., Faraji, Z., Nikzad, H., Parivar, K., Sharrif, M.M. ve Mikzad, M., 2012. The effect of aqueous extract of Salep prepared from root-tubers of *Dactylorhiza maculate* (Orchidaceae) on the testes and sexual hormones of immature male mice. J. Med. Plants. Res., 6, 24, 4102-4106.
- Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M.R., Mohd, M.A. ve Yusoff, K.M., 2010. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. Nutr. Res., 30, 9, 650-659.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C. ve Abbasi, B.H., 2019. Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. Industrial Crops and Products, 129, 525-535.
- Khandelwal, N. ve Abraham, S.K., 2014. Intake of anthocyanidins pelargonidin and cyanidin reduces genotoxic stress in mice induced by diepoxybutane, urethane and endogenous nitrosation. Environ. Toxicol. Pharmacol., 37, 2, 837-843.
- Kliebenstein, D.J., 2013. Making new molecules: Evolution of structures for novel metabolites in plants. Curr. Opin. Plant Biol., 16, 1, 112-117.
- Korkmaz, M. ve Karakurt, E., 2015. An ethnobotanical investigation to determine plants used as folk medicine in Kelkit (Gümüşhane/Turkey) district. Biological Diveristy and Conversation, 8, 3, 290-303.
- Kreutz, K., 2009. Türkiye Orkideleri, Rota Yayınları, İstanbul, 28-29s.
- Kuyucu, N., 2007. Antibiyotik direnci. Çocuk Enfeksiyon Dergisi, 1, 33-38.
- Küçükçetin, A., Şık, B. ve Demir, M., 2008. Bazı ticari süt ürünlerindeki sodyum benzoat, potasyum sorbat, nitrat ve nitritin belirlenmesi. Gıda Dergisi, 33, 4, 159-164.
- Kürek, N., 2007. Denizli ve çevresinde yayılış gösteren *Eryngium* cinsine ait saf ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 59s.

- Lai, P.K. ve Roy, J., 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. Curr. Med. Chem., 11, 11, 1451-1460.
- Leinonen, H.M., Kansanen, E., Polonen, P., Heinaniemi, M. ve Levonen, A.L., 2014. Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. Adv. Cancer Res., 122, 281– 320.
- Letchumanan, V., Chan, K.G. ve Lee, L.H., 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: A review on the pathogenesis, prevalence and advanced molecular identification techniques. Frontiers in Microbiology, 5, 705, 1-13.
- Li, G., Zhang, P., Wang, J., An, Y., Gong, Q., Gregg, E.W., Yang, W., Zhang, B., Shuai, Y., Hong, J., Engelgau, M.M., Li, H., Roglic, G., Hu, Y. ve Bennett, P.H., 2014. Cardiovascular mortality, all-cause mortality and diabetes incidence after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance in the Da Qing Diabetes Prevention Study: A 23-year follow-up study. Lancet Diabetes Endocrinol., 2, 6, 474-80.
- Lima, V.N., Oliveira Tintino, C.D.M., Santos, E.S., Morais, L.P., Tintino, S.R., Freitas, T.S., Geraldo, Y.S., Pereira, R.L.S., Cruz, R.P., Menezes, I.R.A. ve Coutinho, H.D.M., 2016. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. Microb. Pathog., 99, 56–61.
- Lowes, D.A., Webster, N.R., Murphy, M.P. ve Galley, H.F., 2013. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. Br. J. Anaesth., 110, 3, 472-480.
- Luna Guevara, M. L., Luna Guevara, J.J., Hernandez Carranza, P., Ruiz-Espinosa, H. ve Ochoa-Velasco, C.E., 2019. Phenolic compounds: A good choice against chronic degenerative diseases. Studies in Natural Products Chemistry, 59, 79-108.
- Lushchak, V.I., 2011a. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 153, 2, 175–190.
- Lushchak, V.I., 2011b. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol., 101, 1, 13–30.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-Biological Interactions, 224, 164-175.
- MacDonald Wicks, L.K., Wood, L.G. ve Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. J. Sci. Food Agr., 86, 13, 2046-2056.
- Malcovska, S.M., Ducaiova, Z., Maslaáková, I. ve Backor, M., 2014. Effect of silicon on growth, photosynthesis, oxidative status and phenolic compounds of maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium excess. Water, Air Soil Pollut., 225, 8, 1.

- Marasini, R. ve Joshi, S., 2012. Antibacterial and antifungal activity of medicinal orchids growing in Nepal. *J.Nepal Chem.Soc.*, 29, 104–109.
- Maridass, M. ve GhanthiKumar, S., 2008. Antiinflammatory activity of *Cinnamomum keralaense* bark extract. *Pharmacologyonline*, 3, 322-326.
- Masibo, M. ve He, Q., 2008. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 7, 4, 309–319.
- Matsuzoe, N., Yamaguchi, M., Kawanobu, S., Watanabe, Y., Higashi, H. ve Sakata, Y., 1999. Effect of dark treatment of the eggplant on fruit skin color and its anthocyanin components. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 68, 1, 138-145.
- Mayer, K.H., Opal, S.M. ve Medeiros, A.A., 1995. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett, J.E., Dolin, R. ve Blaser, M.J. (eds.), Churchill Livingstone, New York, pp. 212-225.
- Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A. ve Tong, X., 2014. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1852, 2, 243-251.
- Montes, I., Lai, C. ve Sanabria, D., 2003. Like Dissolves Like: A Guided Inquiry Experiment for Organic Chemistry. *J. Chem. Educ.*, 80, 4, 447.
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., ve Vattuone, M.A., 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal Ethnopharmacology*, 71, 1-2, 109-114.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J. ve Dominguez, H., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, 72, 2, 145-171.
- Mullie, P., Clarys, P., Deriemaeker, P. ve Hebbelinck, M., 2008. Estimation of daily human intake of food flavonoids. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 59, 4, 291–298.
- Musumeci, T. ve Puglisi, G., 2013. Antimicrobial agents, University of Catania, Woodhead Publishing Limited, Italy, 305-333p.
- Nacz, M. ve Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 5, 1523–1542.
- Nascimento, N.C. ve Fett-Neto, A.G., 2010. Plant secondary metabolism engineering, methods and applications, plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: An overview. *Methods in Molecular Biology* 643, 1, 1-13.
- Nawar, W.W., 1996. Lipids, Food Chemistry, Marcel Dekker, New York, 225-319p.
- Nemec, M.J., Kim, H., Marciante, A.B., Barnes, R.C., Hendrick, E.D., Bisson, W.H., Talcott, S.T. ve Mertens-Talcott, S.U., 2017. Polyphenolics from mango (*Mangifera indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma in situ

- proliferation through activation of ampk pathway and suppression of mtor in athymic nude mice. J. Nutr. Biochem.,41, 12-19.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Moriand, A. ve Pacer, L., 1998. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 102, 2, 175-187.
- O'Hollaren, M.T., Yunginger, J.W., Offord, K.P., Somers, M.J., O'Connell, E.J. ve Ballard, D.J., 1991. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. N. Engl. J. Med., 324, 6, 359-363.
- Okan, O., Varlıbaş, H., Öz, M. ve Deniz, İ., 2014. Antioksidan analiz yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 13, 1, 48-59.
- Olama, Z., Holail, H. ve Makki, S., 2016. Anti fungal effect of some plant oils against some oral clinical isolates of *Candida albicans* in Lebanese community. TOJSAT, 3, 3, 25-39.
- Omran, S.M. ve Esmailzadeh S., 2009. Comparison of anticandida activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils versus antifungal drugs against *Candida* species. Jundishapur J. Microbiol., 2, 2, 53-60.
- 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. Turk J. Biol., 36, 672-686.
- Oskay, D. ve Oskay M., 2009. Bitki sekonder metabolitlerin biyoteknolojik önemi. Ecological Life Sciences, 4, 2, 31-41.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. ve Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis, 12, 5, 913-922.
- Ou, S. ve Kwok, K.C., 2004. Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. J. Sci. Food Agric., 84, 11, 1261-1269.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6, 3, 331-336.
- Öztürkcan, S.A. ve Acar, S., 2017. Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddeleri ile ilgili genel bir değerlendirme: Derleme, IGUSABDER, 1, 5, 1-17.
- Paltinean, R., Ielciu, I., Vlase, L., Mocan, A., Gheldiu, A.M., Babota, M., Vodnar, D.C. ve Crişan, G., 2017. Histo-anatomical researches, polyphenolic profile and biological activities of the aerial parts and tubers of *Dactylorhiza maculata* L. Soó. (Orchidaceae). Farmacia, 65, 6, 837-842.

- Pandey, K.B. ve Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Med. Cell. Longev., 2, 5, 270–278.
- Patriarca, A. ve Fernandez, V.F., 2018. *Alternaria*, Elsevier, Argentina, 1-8p.
- Patron, D.D., 2006. *Aspergillus*, health implication & recommendations for public health food safety, Journal of Food Safety, 8, 19-23.
- Perez Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos Buelga, C., ve Osuna, A., 2009. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. Pharmacol. Rep., 61, 1, 67–75.
- Pisoschi, A.M. ve Pop, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry, 97, 55-74.
- Poeggeler, B., Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C. ve Barlow Walden, L.R., 1994. Melatonin, a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. Ann. N. Y. Acad. Sci., 738, 419-420.
- Poljsak, G.B., Adamic, M. ve Dahmane, R., 2014. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment, Oxid. Med. Cell. Longev., 8, 3, 1-7.
- Puthur, J.T., 2016. Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. South Indian J. Biol. Sci., 2, 1, 14–17.
- Rahula, F.A., Jyotia, S., Naza, F., Ashafaqb, M., Shahidb, M. ve Siddiquea, Y.H., 2019. Therapeutic potential of luteolin in transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. Neuroscience Letters, 692, 90-99.
- Ramakrishna, A. ve Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signal on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior, 6, 11, 1720–1731.
- Rayner, B.S., Hua, S., Sabaretnam, T. ve Witting, P.K., 2009. Nitric oxide stimulates myoglobin gene and protein expression in vascular smooth muscle. Biochem J., 423, 2, 169-177.
- 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.
- Reichardt, C., 2003. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. Wiley-VCH Publishers, 3rd ed.
- Reische, D.W., Lillard, D.A. ve Eitenmiller, R.R., 2002. Antioxidants, Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Akoh, C.C. ve Min, D.B. (eds.), Marcel Dekker, New York, 507-532.

- Robach, M.C., 1980. Use of preservatives to control microorganism in food. Food Technol., 34, 10, 81.
- Rykaczewska, M., Krauze Baranowska, M., Żuchowski, J., Krychowiak, Mańnicka, M., Fikowicz Krośko, J. ve Królicka, A., 2019. Phytochemical analysis of *Braselia*, *Elleanthus*, and *Sobralia*. Three genera of orchids with antibacterial potential against *Staphylococcus aureus*, Phytochemistry Letters, 30, 245-253.
- Tekinşen, K. K. ve Güner, A., 2010. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. Food Chem., 121, 468-471.
- Sani, A.A., Chijioke, C.M., Rafat, O.A., Sikirat S.A., Emmanuel, T.A., Musa, A.S. ve Mohammed I., 2011. High performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation indicating assay for ciprofloxacin hydrochloride. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1, 8, 239-243.
- Sarı, A.O. ve Oğuz, B., 2000. Türkiye ve Dünya’da bazı tıbbi, kokulu ve baharat bitkilerinin yeri ve önemi. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir, 98s.
- Schippmann, U.W.E., Leaman, D. ve Cunningham, A.B., 2006. A Comparison of Cultivation and Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants Under Sustainability Aspects. Bogers, R.J., Craker, L.E. ve Lange, D. (eds.), Springer, Netherlands. pp. 75-95.
- Schuster, R., Zeindi, L., Holzer, W., Khumpirapang, N., Okonogi, S., Viernstein, H. ve Mueller, M., 2017. *Eulophia macrobulbon*-an orchid with significant anti-inflammatory and antioxidant effect and anticancerogenic potential exerted by its root extract. Phytomedicine, 24, 157-165.
- Sedlak, T.W., Saleh, M., Higginson, D.S., Paul, B.D., Juluri, K.R. ve Snyder, S.H., 2009. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 106, 13, 5171-5176.
- Sezik, E., 2002. Turkish orchids and salep. Acta Pharmaceutica Turcica, 44, 3, 151-157.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D. ve Corke, H., 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. Int. J. Food Microbiol., 117, 1, 112-119.
- Shi, X., Xiao, C., Wang, Y. ve Tang, H., 2013. Gallic acid intake induces alterations to systems metabolism in rats. J. Proteome Res., 12, 2, 991-1006.
- Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Di Bilio, A.J. ve Bonimo, R.P., 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻, Free Radic. Biol. Med., 11, 1, 1-8.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: Introductory remarks. Sies, H. (ed.), Academic Press, London. pp. 1-8.

- Sies, H., 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Exp. Physiol., 82, 2, 291–295.
- Singh, A.K., Singh, S.K., Singh, P.P., Srivastava, A.K., Pandey, K.D., Kumar, A. ve Yadav, H., 2018. Biotechnological aspects of plants metabolites in the treatment of ulcer: A new prospective. Biotechnology Reports, 18, 1-7.
- Singh, R.P., Sharad, S. ve Kapur, S., 2004. Free radicals and oxidative stress neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. Journal Indian Academy of Clinical Medicine, 5, 3, 218-225.
- Siquet, C., Pavia Martins, F., Lima, J.L., Reis, S. ve Borges, F., 2006. Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acidse A structure-activity relationship study. Free Radic. Res., 40, 4, 433-442.
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. J. Alzheimers Dis., 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.
- Srinivasan, M., Sudheer, A.R. ve Menon, V.P., 2007. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. J. Clin. Biochem. Nutr., 40, 2, 92-100.
- Stewart, A.E. ve Hunsaker, D.H., 2002. Fungus-specific IgG and IgE in allergic fungal rhinosinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg., 127, 4, 324-332.
- 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. J. Sci. Food Agric., 93, 13, 3205-3208.
- Sung, C.C., Hsu, Y.C., Chen, C.C., Lin, Y.F. ve Wu, C.C., 2013. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. Oxid. Med. Cell. Longev., 2013, 11, 1-15.
- Suzuki, T., Miyamae, Y. ve Ishida, I., 1991. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. J. Gen. Microbiol., 137, 1, 161-167.
- Szajdek, A. ve Borowska, E. J., 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A Review. Plant Foods Hum. Nutr., 63, 4, 147-156.
- 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. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 146s.
- Şen, T., 2016. Deri yaşlanması ve antioksidanların önemi. Ankara Ecz. Fak. Derg., 40, 1, 36-53.

- Taguri, T., Tanaka, T. ve Kouno, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol. Pharm. Bull., 27, 12, 1965-1969.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. Plant Physiology. Taiz, L. ve Zeiger, E. (eds.), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, pp. 283-308.
- Takshak, S. ve Agrawal, S.B., 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. Journal of Photochemistry&Photobiology, 193, 51-88.
- Tan, A., 2010. Türkiye genetik kaynakları ve muhafazası. Journal of Aegean Agricultural Research Institute, 20, 1, 9-37.
- Taofiq, O., Calhelha, R.C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos Buelga, C., Queiroz, M.J.R.P. ve Ferreira, I.C.F.R., 2015. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. Food Res. Int., 76, 3, 821-827.
- Targonski, P.V., Persky, V.W. ve Ramekrishnan, V., 1995. Effect of environmental molds on risk of death from asthma during the pollen season. J. Allergy Clin. Immunol., 95, 5, 955-961.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American Journal of Medicine, 119, 6, 3-10.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K. ve Puri, S., 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 12, 1-12.
- Titz, A., 2004. Medicinal Herbs and Plants: Scope for Diversified and Sustainable Extraction, Bangalore, India, 72-80p.
- Topal, Y., 2013. *Alchemilla* L. (Rosaceae) cinsine ait bazı türlerin fenolik bileşiklerinin antioksidan ve antimikrobiyal etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl, 90s.
- Topçu, Ş. ve Çölgeçen, H., 2015. Bitki sekonder metabolitlerinin biyoreaktörlerde üretilmesi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 8, 2, 9-29.
- Townsend, D.M., Lushchak, V.I. ve Cooper, A.J., 2014. A comparison of reversible versus irreversible protein glutathionylation. Adv. Cancer Res., 122, 177-198.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J. ve Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., 68, 4, 1561-1568.
- URL-1, www.tubives.com. 05 Aralık 2018.

- Urso, M.L. ve Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology, 189,1, 41-54.
- Ustaçelebi Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 510-541.
- Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y. ve Aktümsek, A., 2016. *Centaurea pterocaula* özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi. Marmara Pharmaceutical Journal, 20, 232-242.
- Valko, M., Leibfritz, D. Moncola J., Cronin, M.T., Mazur, M. ve Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 39, 1, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M., 2006. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160, 1, 1-40.
- Verma, N. ve Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. J. Appl. Res. Med. Aromatic Plants, 2, 4, 105-113.
- Verma, S., Singh, A. ve Mishra, A., 2013. Gallic acid: molecular rival of cancer. Environ. Toxicol. Pharmacol., 35, 3, 473-485.
- Villalobos, M.D.C., Serradilla, M.J., Martín, A., Ordiales, E., Ruiz Moyano, S. ve Córdoba, M.D.G., 2016. Antioxidant and antimicrobial activity of natural phenolic extract from defatted soybean flour by-product for stone fruit postharvest application. J. Sci. Food Agric., 96, 6, 2116-2124.
- Vinson, J.A., 2006. Oxidative stress in cataracts. Pathophysiology, 13, 3, 151-162.
- Wanasundara, P.K.J.P.D. ve Shahidi, F., 2005. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects. Shahidi, F. (ed.), Wiley Interscience, SUA.
- Willett, H.P., 1992. Antimicrobial agents. Zinsser Microbiology. Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B. ve Wilfert, C.M. (eds.), Appleton & Lange, East Norwalk, pp. 153-187.
- Xue, J., Davidson, P.M. ve Zhong, Q., 2013. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: The enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. J. Agric. Food Chem., 61, 51, 12720-12726.
- Yan, L.J., 2014. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. J. Diabetes Res., 2014, 4, 1-11.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y., 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1, 7, 35-49.

- Yi, W., Fischer, J. ve Akoh, C.C., 2005. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. J. Agric. Food Chem., 53, 8804–8812.
- Yen, G.C., Chen, C.S., Chang, W.T., Wu, M.F., Cheng, F.T., Shiau, D.K. ve Hsu, C.L., 2018. Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of *Ficus beecheyana* and their phenolic components. J. Food Drug Anal., 26, 182-192.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhonghan, J. ve Yong, J., 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Rad. Biol. Med., 9, 1, 19-21.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klinik Dergisi, 14, 2, 41-46.
- Yücel Şengün, İ. ve Yücel, E., 2015. Antimicrobial properties of wild fruits. Bio.Di.Con., 8, 1, 69-77.
- Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V. ve Gómez Cadenas, A., 2017. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. Physiol. Plant, 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's's and diabetes mellitus. J. Funct. Foods, 11, 538-547.
- Zhang, P. ve Tian, B., 2014. Metabolic syndrome: An important risk factor for Parkinson's disease. Oxid. Med. Cell. Longev., 15, 8, 1-15.
- Zhao, Z. ve Moghadasian, M.H., 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chem., 109, 4, 691–702.
- Zheng, G., Lv, H.P., Gao, S. ve Wang, S., 2010. Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. Plant Soil Environ., 56, 11, 508–515.
- Zhong, J.J., 2011. Plant secondary metabolites. Industrial Biotechnology, 6, 3883–3819
- Zhu, Y. ve Sang, S., 2017. Phytochemicals in whole grain wheat and their health-promoting effects. Mol. Nutr. Food Res., 61, 7, 1-23.
- 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.

7. EKLER



T.C.
ORMAN GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
Trabzon Orman Bölge Müdürlüğü
Gümüşhane Orman İşletme Müdürlüğü



Sayı : 61417804-305.03.01-E.1376191
Konu : Deniz KOTİLOĞLU'nun Talebi

30.06.2017

KELKİT ORMAN İŞLETME ŞEFLİĞİNE

İlgi: 22/06/2017 tarih ve 1322161 Sayılı yazınız.

İlgi yazınız ekinde Müdürlüğümüze gönderilen: Deniz KOTİLOĞLU'nun 20/06/2017 tarihli dilekçesi Orman Bölge Müdürlüğümüze sunulmuş olup, Alınan cevabi yazı ekte gönderilmiştir.

İlgilinin talebinin karşılanmasında sakınca olmayıp, Yüksel Lisans Tezinin sonucunun Bölge Müdürlüğümüze sunulmak üzere Müdürlüğümüze gönderilmesini;
Rica ederim.

 e-İmzalıdır

Tuncay DİNÇ
İşletme Müdürü V.

Ek : Bölge Müdürlüğü izin yazısı (1 Adet) (1 sayfa)

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Kağıttest
ISO/IEC 27001:2013

GÜMÜŞHANE
Telefon No: 0-456-2132100 Belge Geçer No:Faks :0-456-
2131389
e-posta: internet adresi: <http://trabzonobm.ogm.gov.tr>

Bilgi için: Muammer GÜRSES
Teknisyen



T.C.
ORMAN GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
Trabzon Orman Bölge Müdürlüğü
Odun Dışı Ürün Ve Hizmetler Şube Müdürlüğü



Sayı : 81030260-305.03.01-E.1366374
Konu : Deniz KOTİLOĞLU'na ait Dilekçe

29.06.2017

GÜMÜŞHANE ORMAN İŞLETME MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 28.06.2017 tarih ve 61417804-305.03.01-E.1356614 sayılı yazınız.

İşletme Müdürlüğünüz ilgi sayılı yazınız ekinde alınan Deniz KOTİLOĞLU'na ait 20.06.2017 tarihli dilekçe incelenmiş olup, ticari amaçlı kullanılmaması şartıyla Dactylorhiza romana subsp. georgica alttürünün Kelkit Orman İşletme Şefliği sınırlarında bilimsel amaçlı olarak 250 gr. toplanmasında herhangi bir sakınca yoktur. Ayrıca Yüksek Lisans tezin sonuçlarının Bölge Müdürlüğümüze sunulması hususunda;

Gereğini rica ederim.

 e-imzalıdır

Kenan AKDUMAN
Bölge Müdür Yardımcısı V.

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.



Toklu Mahallesi Devlet Sahil Yolu Karşısı TRABZON
Telefon No:4622302178 Belge Geçer No:4622302168
e-posta: internet adresi: <http://trabzonobm.ogm.gov.tr>

Bilgi için: Gülcan MEYDAN AKTÜRK
Mühendis

ÖZGEÇMİŞ

21.10.1987 tarihinde Bolu'da doğdu. İlköğretimini Bolu Sakarya İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 2005 yılında Bolu İzzet Baysal Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği, Tarla Bitkileri Bölümü'nden 'Onur Öğrencisi' (3.22/4) olarak mezun oldu. 2010-2012 yılları arasında fide üretim ve topraksız tarım işletmelerinde Ziraat Mühendisi olarak çalıştı. 2013 yılında Gümüşhane Kelkit Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü'nde Ziraat Mühendisi olarak göreve başladı ve halen göreve devam etmektedir. Yabancı dili İngilizce'dir (YÖKDİL/2018 Fen Bilimleri: 80 puan, YDS/2018 65 puan).