

Deneysel Araştırma

***Dactylorhiza osmanica*'nın Topraküstü Kısımlarında
Antioksidan, Antimikrobiyal ve Tirozinaz İnhibitör
Aktivitelerinin Araştırılması**

Rezzan ALİYAZICIOĞLU^{1,a}, Nuriye KORKMAZ¹, Şeyda AKKAYA¹, Sıla Özlem ŞENER²,
Ufuk ÖZGEN², Şengül ALPAY KARAOĞLU³

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

³Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Rize, Türkiye

ÖZET

Amaç: Ülkemiz zengin florasıyla çok sayıda tıbbi ve aromatik bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır. Günümüzde fitoterapi araştırmaları popüler olmuştur. Bu çalışmanın amacı, *Dactylorhiza osmanica* bitkisinden elde edilen metanolik ekstrenin antioksidan ve antimikrobiyal kapasiteleri, tirozinaz inhibitör etkisini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Ekstrenin antioksidan özelliği toplam fenolik içeriği (TPC), demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürme aktivitesi testi gibi in vitro antioksidan tayin yöntemleri kullanılarak araştırıldı. Ekstrenin fenolik kompozisyonu ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile incelendi. Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metodu kullanılarak test edildi. Tirozinaz inhibitör aktivite kolorimetrik olarak ölçüldü.

Bulgular: Ekstrenin TPC, FRAP ve DPPH aktiviteleri sırasıyla; 20.6 ± 0.3785 mg gallik asit eşdeğeri/gram numune, 804 ± 8.6217 µM Trolox/g numune ve 0.1838 ± 0.0015 mg/mL olarak bulundu. Gallik asit, protokatekuik aldehit, protokatekuik asit, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit, benzoik asit ekstrede bulunan fenolik bileşiklerdir. Tirozinaz inhibitör aktivite tayininde ekstrenin IC₅₀ değeri anlamlı bulunmamıştır. Ekstre, asid-hızlı bakteri (*M. smegmatis*), bazı gram pozitif (*S. aureus* and *B. cereus*) ve bazı gram negatif (*Y. pseudotuberculosis*) bakterilere karşı orta derecede antibakteriyal aktivite gösterdi.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçlarına göre, *D. osmanica* yeni farmasotiklerin geliştirilmesinde potansiyel bir kaynak olarak düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Antimikrobiyal, Enzim İnhibisyonu.

ABSTRACT

Investigation of Antioxidant, Antimicrobial and Tyrosinase Inhibitor Activities on the Aerial Parts of *Dactylorhiza osmanica*

Objective: Our country contains a large number of medical and aromatic plants with rich flora. Nowadays phytotherapy research has become popular. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacities, and tyrosinase inhibitory effect of methanolic extracts of *Dactylorhiza osmanica*.

Material and Method: The antioxidant properties of extract were investigated using in vitro antioxidant assay methods such as total phenolic content (TPC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay. Enzyme inhibitory effect was tested against tyrosinase. The phenolic composition of extract was investigated by means of reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Antimicrobial activity was tested using the disc diffusion method. Tyrosinase inhibitor activity was tested to colorimetrically.

Results: The total phenolic content value is 11.2 ± 0.472 mg gallic acid per gram sample, FRAP value is 240 ± 2.645 µM Trolox/g sample, and IC₅₀ value for DPPH assay has been found as 0.708 ± 0.010 mg/mL. Phenolic compounds were identified as gallic acid, proto-catechuic acid, proto-catechuic aldehyde, p-hydroxy benzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillin, p-coumaric acid, syringaldehyde, ferulic acid, and benzoic acid. The IC₅₀ value of the extract was not significant in determining tyrosinase inhibitor activity. The extract displayed moderate antibacterial activity against an acid-fast bacterium (*M. smegmatis*), some Gram positive (*S. aureus* and *B. cereus*) and Gram negatif (*Y. pseudotuberculosis*) bacteria.

Conclusion: According to the results of the present study, *D. osmanica* can be considered as a potential source for developing new pharmaceuticals.

Keywords: Antioxidant, Antimicrobial, Enzyme Inhibition.

Dünyadaki en zengin çiçekli bitki gruplarını oluşturan Orchidaceae familyası, ülkemizde 24 cins ve 170 takson ile temsil edilmektedir (1). Avrupa, Akdeniz ve Asya'da yayılış gösteren Orchidaceae familyasına ait

Dactylorhiza cinsinin ise ülkemizde 13 türü bulunmaktadır (2). Bu cinse ait türlerden biri olan ve çalışmamızın konusunu oluşturan *Dactylorhiza osmanica* ülkemizde halk arasında kuvvet verici, yara ve çiban tedavisinde, antienflamatuvar olarak ve zihin yorgunluğu

^aYazışma Adresi: Rezzan ALİYAZICIOĞLU, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye
Tel: 0533 511 3364
Geliş Tarihi/Received: 11.04.2017

e-mail: rezzanaoglu@mynet.com
Kabul Tarihi/Accepted: 29.11.2017

nun giderilmesinde kullanılmaktadır (3).

İnsan vücudu, serbest radikallerin ve diğer oksidanların zararlı etkilerine karşı doğal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Serbest radikaller kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar, sinirsel bozukluklar, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, alkol ile indüklenen karaciğer hastalığı, ülseratif kolit, yaşlanma ve ateroskleroz gibi çok sayıda hastalığa zemin oluşturmaktadır (4-12). Antioksidanlar içeren gıdalar serbest radikallere karşı savunmayı güçlendirerek bu hastalıkların önlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Antioksidanlar ayrıca yaşam kalitesini artırılmasında ve dejeneratif hastalıklardan korunmada faydalı olmaktadır (13).

Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan in vitro yöntemlerden olan ve çalışmamızda da kullandığımız toplam fenolik madde miktarının belirlenmesine dayanan Folin yöntemi, Troloks eşdeğeri antioksidan yöntemi (TEAC), demir indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali temizleme yöntemleri elektron transferine dayanmaktadır (14). Elektron ve hidrojen transferiyle serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan fenolik bileşikler yüksek antioksidan aktivite sahip doğal kaynaklı bileşiklerdir (15). Çalışmamız kapsamında bu bilgiden hareketle *D. osmanica*'nın metanol ekstresi RP-HPLC yöntemiyle bazı fenolik bileşikleri yönünden taranmıştır.

Tirozinaz enzimi vücutta melanin sentezinin aşırı olmasından kaynaklanan cilt lekesi gibi hiperpigmentasyon problemlerinde ve psoriasis, vitiligo gibi melanin sentezinin yeterli olmamasından kaynaklı hipopigmentasyon problemlerinde önemli bir enzimdir. Bu enzimi inhibe eden ajanlar hiperpigmentasyon problemlerin tedavisinde ve aktive eden ajanlar ise hipopigmentasyon problemlerinin tedavisinde kullanılabilir (16, 17). Çalışma kapsamında bitkinin tirozinaz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir.

Antimikrobiyal ajanlar, gıda koruyucuları olarak potansiyel uygulamaları nedeniyle hem bilim insanları hem gıda endüstrileri tarafından son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Depolama esnasında gıdalardaki istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini önlemek için, antimikrobik maddeler doğrudan ürün formülasyonuna dahil edilebilmekte, gıda yüzeyine kaplanabilmekte veya ambalajlama materyallerine eklenebilmektedir (18). Gıda koruyucusu olarak kullanılacak bitkilerde bulunan bazı sekonder metabolitler antimikrobiyal etkili doğal bileşik kaynaklarıdır (19). Antimikrobiyal aktivite tayininde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden disk difüzyon yöntemi çalışmamızda *D. osmanica*'nın antimikrobiyal kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (20).

D. osmanica ile ilgili bu çalışma antioksidan, antimikrobiyal, total fenolik içeriği, HPLC ile fenolik bileşenlerin tespiti ve tirozinaz inhibitör aktivite açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitkisel Materyalin Temini

Araştırmada kullanılan bitkisel materyal *D. osmanica* türünün topraküstü kısımları 2014 yılında Mayıs ayında Gümüşhane'den kuru ağırlığı 100 g olacak şekilde toplandı. Bitkinin tür teşhisi Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk Özgen tarafından yapıldı ve AEF-26708 herbaryum numarası ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (AEF) herbaryumunda saklandı. Bitki örneğimiz oda koşullarında ve gölgede kurutulduktan sonra analizde kullanılmak üzere renkli kavanozlarda muhafaza edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antioksidan, antimikrobiyal, tirozinaz inhibitör aktivite ve fenolik bileşenleri belirlemek için kullanılan kimyasallar analitik ya da HPLC sınıfı saflıkta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edildi.

Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Bu çalışma yapılırken HPLC (Agilent 1100, DAD 1200 Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) cihazı, UV-VIS spektrofotometre (Spectro UV-VIS Double PC-8 auto cell, Labomed), rotary evaporator sistemi (IKA®, Werke, USA), çalkalayıcı (Heidolph Promax 2020), su banyosu (Nüve, ST 402), pH metre (Hanna pH 213, Romania), magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Germany), bitki öğütme değirmeni (Retsch RM200, Germany) gibi laboratuvar cihazları kullanıldı.

Ekstraksiyon

Kurutulan topraküstü kısmı değirmen yardımıyla toz haline getirilip konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde metanol ile ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen *D. osmanica* bitkisi biyolojik aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere 4 °C'de muhafaza edildi.

Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

D. osmanica metanol ekstresinin toplam fenolik madde tayini kolorimetrik olarak yapıldı (21). Öncelikle, bitki özütünden (10 mg/mL) 50 µL ve farklı konsantrasyonlarda (31,25-62,5-125-250-500-1000 µg/mL) gallik asitten (standart) 50 µL deney tüplerine pipetleme yapıldı. Sonra her bir tüpe 2,5 mL saf su ve 250 µL Folin-Ciocalteu Reaktifli eklendi ve vorteksledi. 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 750 µL %7,5'lik Na₂CO₃ ilave edilerek vorteksledi. Karışımlar oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve absorpsiyon ölçümü 765 nm'de yapıldı. Toplam fenolik madde miktarı gram ya da mL numune başına µg olarak ifade edildi (µg Gallik asit eşdeğeri / gram kuru ekstrakt).

Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Benzie ve Szeto'nun metodu, Fe(III)-TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) kompleksinin antioksidanlar varlığında indirgenerek mavi renkli kompleks Fe(II)-TPTZ'nin oluşması ve bu kompleksin 595 nm'de maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanır (23). Bu amaçla, FRAP reaktifi [300 mM pH 3.6 asetat tamponu:10 mM TPTZ:20 mM FeCl₃ (10:1:1)] taze hazırlandı, kullanılmaya başlayınca kadar düşük hızda karıştırıldı. 3 paralel olacak şekilde hazırlanan numune tüplerine ve numune körü tüplerine bitki ekstresinden 100 µL ve reaktif körü tüplerine numune çözücüsünden 100 µL pipetlendi. Numune tüplerine ve reaktif körü sıralarına 3.0 mL FRAP reaktifi, numune körü sırasına ise 3.0 mL FRAP çözücüsü (su-metanol (2:3)) 20 sn arayla pipetlendi ve vorteksledi. 20 dakika sonrasında tüplerin absorpsiyonu 595 nm'de okundu. Standart olarak Trolox 5 farklı konsantrasyonda (1000- 500- 250-125-62.5 µM) hazırlandı ve aynı işlemlere tabi tutuldu.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini

Molyneux metoduna göre, *D. osmanica*'nın metanol ekstresinin serbest radikali süpürme aktivitesini belirlemek için 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanıldı (22). Bu metotta, ekstre aktivite gösterecek şekilde 5 farklı konsantrasyonda (100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL) hazırlandı. DPPH çözeltisi ise 100 µM olacak şekilde metanolde çözülerek hazırlandı. Ardından tüpler kontrol tüpleri, numune tüpleri ve kör tüpleri olacak şekilde ayarlandı. Kontrol tüplerine ve numune tüplerine 750 µL numune konulup numune körü tüplerine numune yerine 750 µL numune çözücüsü ilave edildi. Numune pipetlemesi bitince 20 sn arayla önce kontrol tüplerine ardından numune tüplerine 750 µL DPPH çözeltisi ve en son numune körlerine 750 µL DPPH çözücüsü (metanol) pipetlendi ve vorteksledi. 50 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra 20 sn ara olacak şekilde 517 nm'de absorpsiyon değerleri ölçüldü. Ölçüm sonrası elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilip IC₅₀ değerleri (mg/mL) hesaplandı. Bu çalışmada standart olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) kullanıldı ve BHT için aynı işlemler uygulandı.

Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi Tayini

Bitki ekstresinin tirozinaz inhibisyon aktivitesi L-DOPA substratı ile dopakrom metoduna göre belirlendi (24). Mikroplakadaki kuyucuklara 25 µL örnek çözelti, 40 µL tirozinaz çözeltisi (mantar tirozinaz, 30 U, EC 1.14.1.8.1) ve 100 µL fosfat tamponu (pH 6.8) ilave edildi. Bu karışım 25 °C'de 15 dakika bekletildikten sonra 40 µL (10 mM) L-DOPA konuldu. Tirozinaz enzim çözeltisi olmadan hazırlanmış tepkime reaktiflerine örnek çözeltisi eklendi ve kör hazırlandı. Bitki ekstresinin ve körlerin absorpsiyonları 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesinin ardından 492 nm'de okundu. Gerçek absorpsiyonları elde etmek adına körlerin absorpsiyonları örneklerden çıkarıldı ve sonuç olarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

HPLC Çalışmasında Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Bu çalışmada, standart olarak gallik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, klorojenik asit, p-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, ferulik asit, p-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, standart karışımın stok çözeltisi, 5-100 µg/mL konsantrasyon aralığında seyreltilmiştir.

HPLC Koşulları

Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, karışık standartların stok çözeltileri, 5-100 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC analizi [A: 100% metanol; B: su içinde 2% asetik asit (pH: 2,8)], bir HPLC sistemi (Shimadzu Corporation, LC 20AT, Kyoto, Japonya) üzerinde 1.5 mL/dk sabit bir çözücü akış oranında bir ters faz kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Enjeksiyon hacmi 20 µL, sinyaller, 232 °C, 246 °C, 260 °C, 270 °C, 280 °C, 290 °C, 308 °C ve 328 °C'de, 25 °C kolon sıcaklığında DAD dedektörü ile kaydedildi.

HPLC Yöntemiyle Analizlerin Yapılması

HPLC analizinde ayırmalar bir ters faz kolonu olan LiChoCART RP-18 (12,5 cm x 0,4 cm, partikül büyüklüğü 5µm) ile yapıldı. 1 mL/dk akış hızında hareketli faz olarak su-formik asit (19:1) (çözücü A) ve sabit faz olarak metanol (çözücü B) kullanıldı. Martos ve ark. (1997)'nin metoduna göre uygulanan çözücü gradientleri şöyledir: 30% metanol (B) ve çözücü A (gradient uygulanmayan çözücü) 15 dakika boyunca kolondan geçirildi, metanol gradienti dakikalar ilerledikçe oranı artırılarak 41. dakikaya kadar gradientte devam edildi (25). HPLC'ye enjekte edilen örnek ekstraktı için 290 nm ve 340 nm'de kromatogramlar incelendi. Fenolik asitlerin tanınması ve miktarının belirlenmesi için UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırıldı.

Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Antimikrobiyal aktivite testleri agar kuyucuk difüzyon yöntemine göre çalışıldı (26). *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis* bakterileri ve *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* mantarları kullanıldı.

Agar Kuyucuk Difüzyon Metoduyla Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

D. osmanica ekstresinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde ilk olarak agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı. Bu çalışmada, Mueller Hinton agar ve sıvı besiyerleri bakteriler için, Brain heart infusion (BHI) sıvı ve katı besiyeri *M. smegmatis* için, maya ekstreli sıvı besiyeri (YEG) (Difco, Detroit, MI) mantarlar için ve Potato Dextrose agar (PDA) (Difco, Detroit, MI) kullanıldı. Test edilecek bakterilerin bir gece-

lik kültürlerinden, sıvı besiyeri içinde yaklaşık olarak 10^6 kob/mL (koloni oluşturan birim=colony forming unit) şeklinde dilüsyonlar hazır hale getirildi ve katı besiyerlerine yaygın ekimleri yapıldı. Sonrasında steril cam boru ile besiyerleri üzerinde 2 cm aralıklarda, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa ekstrenin 1 mL'sinde hazırlanmış stok çözeltilerden 50 µL damlatıldı. İnkübasyon işlemi bakteriler için 24 saat, mayalar için 48 saat olacak şekilde 36 °C'de petrielerde yapıldı. İnhibisyon zonları bir cetvel yardımı ile ölçüldü. Standard kontrol ilaç olarak ampisilin, flukonazol ve streptomycin kullanıldı.

BULGULAR

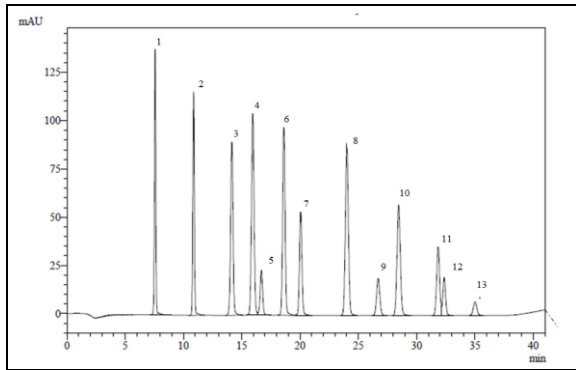
Antioksidan aktivite tayini ile ilgili bulgular Tablo 1 'de özetlenmiştir. *D. osmanica* ekstresi için DPPH yöntemiyle IC_{50} değeri 0.1838 ± 0.0015 mg/mL olarak bulunmuştur. Standart olarak kullanılan BHT ile karşılaştırıldığında IC_{50} değerinin BHT'ye göre daha yüksek çıktığı görülmektedir. FRAP değeri 804 ± 8.6217 µM Troloks/g örnek olarak bulunmuştur. Toplam fenolik içeriğine baktığımızda sonucun 20.6 ± 0.3785 mg/g örnek gallik asit eşdeğerine karşılık geldiği bulunmuştur.

Tablo 1. *Dactylorhiza osmanica* ekstresinin antioksidan aktivitesi.

Test bileşikleri	TPC ¹	FRAP ²	DPPH ³
Ekstre	20.6 ± 0.3785	804 ± 8.6217	0.1838 ± 0.0015
BHT			0.0099 ± 0.0002

¹Total fenolik içeriği (mg gallik asit eşdeğeri/gram), ²FRAP değeri (µM trolox eşdeğeri/gram), ³DPPH değeri (mg/mL), BHT (Bütillenmiş Hidroksitoluen).

HPLC ile fenolik madde içeriğinin incelenmesi sonucunda bitkinin içeriğinde standart bileşiklerden gallik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asit bulunmuştur. Sonuca bakıldığında fenolik içerik bakımından zengin bulunmuştur. Bileşiklerin alıkonma zamanı, piklerin kapladığı alan ve bitkide buldukları konsantrasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir (Şekil 2). Bitkinin kromatogramı Şekil 1'de gösterilmiştir.

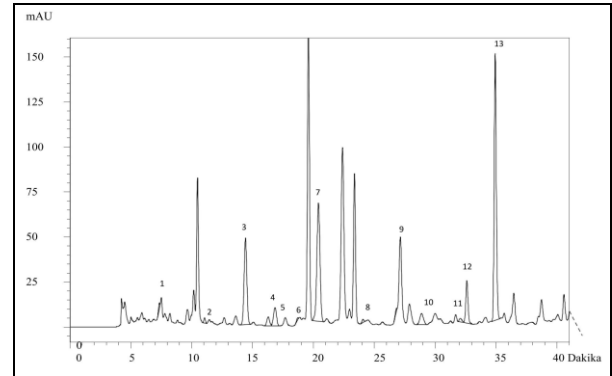


Şekil 1. Fenolik standartların RP-HPLC kromatogramı. Pikler: (1) gallik asit, (2) proto-katekuik asit, (3) proto-katekuik aldehid, (4) p-hidroksi benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanilik asit, (7) kafeik asit, (8) vanilin, (9) şiring aldehid, (10) p-kumarik asit, (11) ferulik acid, (12) sinapik acid, (13) benzoik asit.

Tablo 2. *Dactylorhiza osmanica* ekstresinin fenolik kompozisyonu.

Sıra No	Bileşik	Alıkonma Zamanı	Alan	Konsantrasyon (mg/L)
1	Gallik Asit	7.331	23455	0.911
2	Protokatekuik Asit	11.045	27078	1.006
3	Protokatekuik Aldehit	14.408	763472	14.253
4	p-OH Benzoik Asit	16.274	79103	1.472
5	Klorojenik Asit	16.830	176088	12.296
6	Vanilik Asit	18.702	12102	0.590
7	Kafeik Asit	20.399	1176895	34.394
8	Vanilin	24.059	18584	0.694
9	Şiringaldehit	26.820	20639	1.680
10	p-Kumarik Asit	28.872	133123	3.133
11	Ferulik Asit	32.057	30082	1.503
12	Sinapik Asit	32.589	299541	21.967
13	Benzoik asit	34.918	1800093	289.123

Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonuçları incelendiğinde bitkinin akciğer enfeksiyonu etkenleri olabilen grubu temsil eden *Y. pseudotuberculosis* üzerinde etkisinin olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa* üzerinde düşük de olsa etkisinin görülmesi bitkinin antipseudomonal etki gösterdiğini düşündürmüştür.



Şekil 2. *Dactylorhiza osmanica*'nın RP-HPLC kromatogramı. Pikler: (1) gallik asit, (2) proto-katekuik asit, (3) proto-katekuik aldehid, (4) p-hidroksi benzoik asit, (5) klorojenik asit, (6) vanilik asit, (7) kafeik asit, (8) vanilin, (9) şiring aldehid, (10) p-kumarik asit, (11) ferulik acid, (12) sinapik acid, (13) benzoik asit.

Bitkinin *M. smegmatis* üzerinde de etkili olduğu çalışmalarımız sonucunda belirlenmiştir. *E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* üzerinde etki gözlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. *Dactylorhiza osmanica* ekstresinin antimikrobiyal aktivite taraması (50 µL).

Test edilen bileşikler	Microorganizmalar ve inhibisyon çapı (mm)								
	Ec	Yp	Pa	Sa	Ef	Bc	Ms	Ca	Sc
Ekstre	-	18	10	8	-	8	15	-	-
Ampisillin	10	10	18	10	35	15	-	-	-
Streptomycin							35		
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	25	25

Ec: *E. coli*, Yp: *Y. pseudotuberculosis*, Pa: *P. aeruginosa*, Sa: *S. aureus*, Ef: *E. faecalis*, Bc: *B. cereus*, Ms: *M. smegmatis*, Ca: *C. albicans*, Sc: *S. cerevisiae*, (-) aktivite yok.

Tirozinaz inhibitör aktivite tayini çalışmaları sonuçları incelendiğinde bitkinin IC_{50} değeri anlamlı bulunmuştur.

TARTIŞMA

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (27). Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır ve günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (28). Bunlara devamlı olarak her geçen gün yeni tanımlanan fenolik bileşikler eklenmektedir (29). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövde kısımlarında bulunabilirler (30-32). Geniş bir aile olan fenolik bileşiklerin spesifik bir grubunun ayrı ayrı analizleri mümkün olsa da gıdalardaki toplam fenolik bileşiklerin tayini her zaman tercih edilen bir analizdir. Farklı *Dactylorhiza* türünün antioksidan etkinliği Dalar ve ark.(33)'nın yaptığı çalışmada rapor edilmiştir. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçlarını önceki raporlarla karşılaştırmak olanaksızdır. Bu nedenle çalışma sonuçlarımız farklı *Dactylorhiza* türü ile karşılaştırıldı. Çalışmamızda bitki ekstresindeki toplam fenoliklerin miktarı kolorimetrik olarak tayin edilerek ekstredeki toplam fenolik madde miktarı 20.6 ± 0.3785 mg GAE/g ekstre şeklinde hesaplandı (Tablo 1). Dalar ve ark.(33)'nin yaptığı çalışmada *D. chuhensis*'in yaprak ekstresinde toplam fenolik içeriğinin 44.9 ± 0.8 mg GAE/g kuru ağırlık olduğu bulunmuştur.

D. osmanica ekstresindeki fenolik bileşenler RP-HPLC ile belirlendi. Bu amaçla 13 fenolik asit standardı kullanıldı (Şekil 1). *D. osmanica* ekstresi HPLC analizi ile incelendiğinde gallik asit, protokatekuik asit, protokatekuik aldehit, p-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, vanilin, şiringaldehit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve benzoik asit pikleri belirlendi (Şekil 2) ve miktarları hesaplandı (Tablo 2). Doğal antioksidanlar arasında önemli rol oynayan bitkisel polifenollerin miktar ve içeriği; bitki türü, tarımsal proses, ışık, iklim, hasat zamanı ve depolama şartları göre birçok dış etkenden etkilenebilir (34).

Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen antioksidan kapasiteyi tümüyle yansıtan tek bir metot henüz geliştirilememiştir. Bu nedenle farklı testlerle antioksidan kapasitenin yorumlanması gerekmektedir. Bu noktadan hareketle çalışmamızda farklı antioksidan testler kullanılmıştır.

Bitkilerin antioksidan kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda en az bir serbest radikal kullanılarak bu radikal bitki ekstresi tarafından ne oranda giderildiği bulunmaktadır. Bu radikallerden en yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesi DPPH'dir. Stabil bir radikal olan DPPH mor renkli olup antioksidan moleküllerden bir elektron alarak sarı pikrilhidrazil formuna dönüşmektedir ve spektrofotometrik olarak 517 nm'de takip edilmektedir. Çalışmamızda *D. osmanica*'nın metanolik ekstresinin DPPH radikali giderme kapasiteleri araştırılmış ve Tablo 1'de sunulmuştur. Dalar ve ark.(33)'nin *D. chuhensis* ile yaptığı bir çalışmada

yaprak ekstresinde FRAP değeri 736.8 ± 16.2 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ kuru ağırlık, oksijen radikal yakalama kapasitesi 2715.8 ± 83.5 $\mu\text{mol Trolox E/g}$ kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Bitki ekstresinin indirgeyici gücü onların antioksidan aktiviteleri ile yakından ilişkilidir (35). FRAP değeri ne kadar yüksekse bitki ekstresinin Fe^{+3} indirgeyici kapasitesi de o kadar yüksektir. Çalışmamızda *D. osmanica*'nın metanolik ekstresinin iyi derecede Fe^{+3} indirgeyici kapasitesi ve dolayısıyla elektron verebilme yeteneği olduğu gözlemlendi. Bu özelliğinden dolayı ekstremin reaktif serbest radikal türlerini, daha stabil radikal olmayan türlere dönüştürerek serbest radikal zincirini sonlandırmak suretiyle rol oynayabileceği söylenebilir. Fe^{+3} indirgeyici kapasite ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (36, 37).

Günümüzde farklı faktörlere bağlı olarak çeşitli hastalıklar küresel boyuta ulaşmıştır. Bu bağlamda çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik yeni stratejilerin ortaya konulması önemli hale gelmektedir. Bu stratejiler arasında en çok kabul göreni anahtar enzimlerin inhibisyonu olmuştur. Buna göre hastalıkların patolojisinde rol oynayan anahtar enzimler inhibe edilerek hastalıklardan kaynaklanabilecek semptomların hafifletilmesi sağlanır. Tirozinaz, melanin sentezinin en önemli enzimidir ve bu enzimin inhibe edilmesi deri hastalıklarının kontrolünde önem taşır (38). Bu amaçla tirozinaz için inhibitör olarak sıklıkla kullanılan kojik asit, sentetik olarak üretilmiştir. Bu sentetik inhibitörlerin sindirim sistemi bozukluklarına yol açması ve hepatotoksik özelliklerine sahip olması bunların kullanımlarında sakıncalar meydana getirmiştir (39-41). Bu noktadan yola çıkılarak bitkisel kaynaklı doğal inhibitörlere her geçen gün ilgi artmaktadır. Tirozinaz inhibisyonuna bakıldığında metanol ekstresi tirozinaz üzerine etkili bulunmamıştır.

Son yıllarda çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların artması yüzünden bu mikropların neden olduğu enfeksiyonun tedavisi giderek karmaşık bir sorun haline gelmektedir. Bazı çalışmalar, bitkilerin tedavi edici etkilerinin tek bir etken maddeden ziyade çok sayıda bileşimin sinerjik etkisinden kaynaklandığını göstermektedir. Bu nedenle tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmalara karşı bitkisel bileşimlerin daha etkin bir tedavi sağladığı rapor edilmiştir (42, 43). Bu durum, araştırmacıları bitki özütlerinden elde edilen doğal antimikrobiyal ajanların inhibitör etkisini araştırmaya yöneltmektedir (44). Bitkisel ekstraktlar; flavonoid, polifenolik bileşikler, taninler ve terpenler gibi çok sayıda bileşenden meydana gelmektedir. Mikroorganizmalara karşı yüksek düzeyde antimikrobiyal aktiviteden bu tür bileşiklerin sorumlu olduğu belirtilmiştir (45). Birçok araştırmacı, bitkilerden elde edilen su ekstreslerinin antimikrobiyal aktivitesini metanol, etanol ve n-hekzan ekstreslerine göre daha düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (43). Organik çözücüler kullanı-

larak elde edilen ekstrelerin daha yüksek antimikrobiyal aktiveye sahip olması, elde edilen özütlerin aromatik veya doyurulmuş organik bileşikleri daha yüksek miktarlarda içermesinden olabilir (43). Yaptığımız çalışmada, bitkilerin içerdiği antimikrobiyal maddeleri daha iyi çözdüğü için metanol tercih edildi. Dünyada birçok araştırmacı tarafından pek çok familyaya mensup bitki türlerinden elde edilen özütlerin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini kapsayan çok sayıda çalışma yapılmıştır (46-48). Ancak *D. osmanica*'nın metanolik ekstresinde antimikrobiyal aktivitenin incelendiği çalışmaya rastlanamadı. Çalışmamızda 6 farklı bakteri ve 2 farklı maya kullanılarak *D. osmanica*'nın metanolik ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları standard antibiyotik ilaçlarla karşılaştırdığımızda ekstreminin *Y. pseudotuberculosis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *M. smegmatis*'a karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulundu. Ekstemizin orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermesi *D.*

osmanica'nın içerdiği etken maddelerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde bazı sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceğini gösterdi. Ayrıca bitkimizdeki muhtemel etken maddelerin tespiti ve kimyasal yapısının aydınlatılmasının farmakolojik açıdan önemli olacağı düşünülmektedir.

Günümüzde değişen hayat şartları ve beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak kronik ve dejeneratif hastalıklara yakalanma riski gün geçtikçe artmaktadır. Bu noktadan yola çıkılarak, bu riskin azaltılması bilim dünyasının ana konularından biridir. Bu bağlamda, bitkiler ve onların sergiledikleri biyolojik aktiviteler, yeni ilaç ve gıda formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu temelde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonucunda metanol ekstresi etkin antioksidan, antimikrobiyal, enzim inhibitör etkiler sergilemiştir. Güvenli ve etkin fonksiyonel ajanların tespitinin önemli olduğu günümüzde, *D. osmanica* doğal ajanların önemli bir adayı olarak düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Çığ A, Yılmaz H. Van yöresinde doğal olarak yetişen farklı orkide türlerine ait toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri. Türkiye Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi 2016; 3: 1-8.
2. Yılmaz Ö, Kaynak G. A new record for the flora of Turkey: *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). J Biol Environ Sci 2007; 1: 11-4.
3. Korkmaz M, Karakurt E. An ethnobotanical investigation to determine plants used as folk medicine in Kelkit (Gümüşhane/Turkey). Bio Di Con 2008; 8: 290-303.
4. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Free Radic Biol Med 2004; 36: 718-44.
5. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. Pathophysiology 2006; 13: 129-42.
6. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. Mitochondrial, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system with focus on neurodegenerative disorders. J Neurol Sci 2007; 257: 221-39.
7. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta 2000; 1502: 139-44.
8. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 2000; 13: 135-60.
9. Arteel GE. Oxidants and antioxidants in alcohol induced liver disease. Gastroenterol 2003; 124: 778-90.
10. Ramakrishna BS, Varghese R, Jayakumar S, Mathan M, Balasubramanian KA. Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity. J Gastroenterol Hepatol 1997; 12: 490-4.
11. Hyun DH, Hernandez JO, Mattson MP, de Cabo R. The plasma membrane redox system in aging. Aging Res Rev 2006; 5: 209-20.
12. Upston JM, Kritharides L, Stocker R. The role of vitamin E in atherosclerosis. Prog Lipid Res 2003; 42: 405-22.
13. Alam MN, Bristi NJ, Rafiqzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J 2013; 21: 143-52.
14. Lu X, Wang J, Al-Qadiri HM, et al. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. Food Chem 2011; 129: 637-44.
15. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends In Plant Science, 1997; 2: 152-9.
16. Chang TM. Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. J Biocatal Biotransformation 2012; 1: 2.
17. Gholamhoseinian A, ZohreRazmi Z. Screening the methanolic extracts of some plants for tyrosinase inhibitory activity. Toxicol Environ Chem 2012; 94: 310-8.

18. Cao-Hoang L, Grégoire L, Chaine A, Waché Y. Importance and efficiency of in-depth antimicrobial activity for the control of listeria development with nisin-incorporated sodium caseinate films. *Food Control* 2010; 21: 1227-33.
19. Gyawali R, Ibrahim SA. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 2014; 46: 412-29.
20. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016; 6: 71-9.
21. Singleton VL, Rossi Jr. JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144-58.
22. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın J Sci Technol* 2004; 26: 211-9.
23. Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 1999; 47: 633-6.
24. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 197-201.
25. Martos I, Cossentini M, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 2824-9.
26. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, et al. In Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard, NCCLS document M24-A, 2003; 23: 18.
27. Saldamlı İ. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2007; 463-92.
28. Kafkas E, Bozdoğan A, Burgut A, Türemiş N, Paydaş Kargı S, Cabaroğlu T. Bazı Üzümü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri. II. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu, Tokat, 2006; 309-12.
29. Cemeröglü B. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 2004; 77-88.
30. Bilaloğlu GV, Harmandar M. Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 1999; 334-54.
31. Coşkun F. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2006; 2: 27-33.
32. Aydın SA, Üstün F. Tanenler I kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2007; 33: 21-31.
33. Dalar A, Guo Y, Esim N, Bengu AS, Konczak I. Health attributes of an endemic orchid from Eastern Anatolia, *Dactylorhiza chuhensis* Renz & Taub– In vitro investigations. *J Herb Med* 2015; 5: 77-85.
34. Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Tombelli S, Romani A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1724-9.
35. Blois MS. Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 4617: 1199-200.
36. Juntachote T, Berghofer E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. *Food Chem* 2005; 92: 193-202.
37. Hinneburg I, Dorman Hjd, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected Culinary Herbs and Spices. *Food Chem* 2006; 97: 122-9.
38. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1707-23.
39. Bhat M, Zinjarde SS, Bhargava SY, Ravikumar A, Joshi BN. Antidiabetic Indian plants: A good source of potent amylase inhibitors. *Evid-Based Complement Alternat Med* 2011: 1-6.
40. Gulacti T, Kusman T. Lamiaceae Family Plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease. *Bezmialem Science* 2014; 1: 1-25.
41. Kamagaju L, Morandini R, Bizuru E, et al. Tyrosinase modulation by five Rwandese herbal medicines traditionally used for skin treatment. *J Ethnopharmacol* 2013; 146: 824-34.
42. Shanthi Sree KS, Yasodamma N, Paramageetham CH. Phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Müell. Arg. *The Bioscan* 2010; 5: 173-5.
43. Mohd Nazri NAA, Ahmat N, Adnan A, SyedMohamad SA, Syaripah Ruzaina SA. In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian Table Salad. *Afr J Biotech* 2011; 10, 5728-35.
44. Dash BK, Sultana S, Sultana N. Antibacterial activities of methanol and acetone extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). *Life Sci Med Res* 2011; 27: 1-8.

45. Mojab F, Poursaeed M, Mehrgan H, Pakdaman SH. Antibacterial activity of thymus daenensis methanolic extract. Pak J Pharm Sci 2008; 21: 210-3.
46. Benli M, Güney K, Bingöl U, Geven F. Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. Afr J Biotech 2007; 6: 1774-8.
47. Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, et al. Screening of some Tanzanian Medicinal Plants from Bunda District for antibacterial, antifungal and antiviral activities. J Ethnopharmacol 2008; 119: 58-66.
48. Berber İ, Özgökçe F, Şeker A. Van yöresinde yetişen bazı bitkilerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. YYÜ Fen Bil Derg 2009; 14: 117-21.